

FLAVIO PIRES MOLINA

**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 apresentada à Faculdade
de Odontologia de São José dos
Campos, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do Título de MESTRE
pelo Programa de Pós-Graduação em
BIOPATOLOGIA BUCAL, Área
Biopatologia Bucal**

FLAVIO PIRES MOLINA

**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 apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do Título de MESTRE pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciane Dias de Oliveira

São José dos Campos
2008

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

Bellini AB. Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico. São José dos Campos:FOSJC/UNESP; 2006.

M733A Molina, Flavio Pires
Associação de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Escherichia coli* em canais radiculares e avaliação dos efeitos de extratos naturais sobre os microrganismos e endotoxinas / Flávio Pires Molina; _ São José dos Campos, 2008.
110p. ; il.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, área Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2008.

Orientador: Profª Drª Luciane Dias de Oliveira.

1. Associação microbiana.
2. Irrigantes do canal radicular.
3. Medicação intracanal.
4. Endotoxinas.
5. Extratos naturais.

tD24

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, 19 de maio de 2008

Assinatura:

E-mail: molinafp@yahoo.com.br

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

São José dos Campos, 19 de maio de 2008.

Banca examinadora

1 – Prof^a. Dr^a. Luciane Dias de Oliveira
Faculdade de Odontologia de São José dos campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

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

3 - Prof^a. Dr^a. Sandra Márcia Habitante
Departamento de Odontologia
Universidade de Taubaté – UNITAU

DEDICATÓRIA

Dedicar seria o mesmo que poder oferecer. Portanto ofereço esse trabalho às pessoas que um dia se dedicaram ao meu cuidado. A Deus que me gerou e me dá a força para que eu tenha vida. A minha mulher, Karina, que me oferece amor e sua vida para que eu possa ter a minha. Ao meu filho, Mateus, que dedica sorrisos inesquecíveis numa oportunidade única de eu ser mais homem. Aos meus pais, Neylor e Maria Lúcia, que ofereceram o que havia de melhor neles, o amor.

Ofereço essa dissertação como uma atitude nova em minha vida, onde eu possa ser mais gente, ser capaz de compreender as diferenças e com elas conviver. Que Deus me dê a força necessária para eu tornar meu trabalho mais digno, mais humano.

Aprendi diante dos “materiais e métodos” da vida o quanto se deve dedicar cuidado nos passos da própria vida. Levo comigo essa nova atitude, a de poder cuidar melhor da própria vida e dedicar um pouco do cuidado necessário ao outro.

Ainda que humanamente eu seja incapaz de realizar o cuidado ao outro, ainda assim, vou tentar.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que participaram na realização deste trabalho:

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

- Ao amigo e Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, por sua capacidade, profissionalismo marcantes em seu trabalho. Obrigado por acreditar em minha pessoa e em meu trabalho.

- Ao Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho pela paciência e amizade.

- A Prof^a Dr^a Cristiane Yumi Koga-Ito, pela amizade e atenção no desenvolvimento de minha dissertação.

- A Prof^a Dr^a Juliana Campos Junqueira, pela amizade e convívio no laboratório de microbiologia.

- Ao Prof. Adj. Renato Nishioka pela confiança no meu trabalho como cirurgião-dentista e como amigo.

- Aos colegas de Pós-graduação: Graziela e Édson, pela amizade e por fazerem parte na minha história acadêmica. Sinto-me honrado por ter vocês como amigos.
- A amiga e colega de mestrado, Marta Majewski, por sua amizade e compreensão a mim concedidos.
- Ao amigo Sérgio Alves, por dedicação em seu trabalho e atenção em minha tese.
- A Sílvia Scarpel por toda ajuda, atenção e amizade.
- Às secretárias da Seção de Pós-Graduação Rosemary de Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Lílian Faria das Graças e Maria Aparecida Consiglio de Souza.
- A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio financeiro essencial para realização desta pesquisa.
- A EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiação), pela gentileza e rapidez na esterilização dos materiais.
- Às pessoas que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento como mestre e como homem.
- Aos amigos: Padre Mário, Padre Joãozinho, Padre Luís Fernando e Irmã Laís, pelos aconselhamentos e amizade no decurso desse projeto.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profª Drª Luciane Dias de Oliveira,

pela dedicação ao meu trabalho e em minha formação como mestre,

agradeço a Deus pelo dom que lhe foi concedido, o “dom da palavra e o da ciência, tão solidamente confirmado em você...”

e que Deus abençoe sempre seu lado profissional e agora seu lado mãe, capaz de gerar nova vida e “vida em abundância “

Muito obrigado também pelas vezes que foi compreensiva comigo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Microrganismos nas infecções pulpares e periapicais.....	15
2.2 Endotoxinas - participação nas alterações pulpares e periapicais.....	22
2.3 Agentes irrigantes e medicações intracanaís: ação sobre microrganismos e endotoxinas.....	26
2.4 Extratos naturais – ação antimicrobiana e sobre endotoxinas.....	33
3 PROPOSIÇÃO.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 Preparo dos espécimes.....	40
4.2 Primeira etapa.....	43
4.2.1 Padronização da associação de microrganismos em canais radiculares	43
4.3 Segunda etapa.....	46
4.3.1 Contaminação microbiana dos canais radiculares.....	46

4.3.2	Grupos experimentais.....	48
4.3.3	Coletas do conteúdo do canal radicular.....	51
4.3.4	Avaliação da atividade antimicrobiana – análise microbiológica.....	52
4.3.5	Quantificação de endotoxinas – teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de Limulus (LAL)..	53
5	RESULTADOS.....	57
5.1	Associação microbiana.....	57
5.2	Análise microbiológica.....	57
5.3	Quantificação de endotoxinas.....	67
6	DISCUSSÃO.....	73
6.1	Da metodologia.....	73
6.2	Dos resultados.....	76
6.2.1	Análise microbiológica.....	76
6.2.2	Neutralização de endotoxinas.....	80
7	CONCLUSÕES.....	85
8	REFERÊNCIAS.....	86
	ANEXO.....	108
	<i>ABSTRACT</i>	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI = *Brain Heart infusion* (Infusão de cérebro e coração)

CAPE = componente ativo de própolis

EDTA = ácido etilenodiamino-tetra-acético

EMBRARAD = Empresa Brasileira de Radiação

EU/mL = unidade de endotoxina / mililitros

°C = grau Celsius

h = hora

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

IL = Interleucina

K = lima tipo Kerr

KDO = ácido 2-Keto-3-deoxioctônico

LAL = Lisado de amebócito de Limulus

LPS = Lipopolissacarídeo

MIC = medicação intracanal

mL = mililitro

mm = milímetro (unidade de medida equivalente a 10⁻³m)

nm = nanômetro (equivalente a 10⁻⁹m)

PAF = Fator Ativador de Plaquetas

PCR = reação em cadeia da polimerase

PGE₂ = Prostaglandina E₂

pH = potencial de hidrogênio iônico

PMCc = paramonoclorofenol canforado

PMN = polimorfonuclear

pNa = p-nitroanilina

s = segundo

TNF = Fator de Necrose Tumoral

UFC = Unidade Formadora de Colônia

% = porcentagem

μ = mícron (unidade de medida equivalente a 10^{-6} m)

μ g = micrograma

μ L = microlitro

μ m = micrômetro

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

RESUMO

A proposta desta pesquisa foi padronizar a associação de três microrganismos (*E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli*) em canais radiculares e avaliar a efetividade de extratos naturais como agentes irrigantes e medicação intracanal sobre os microrganismos e endotoxinas. Foram utilizados 60 dentes humanos, unirradiculados, com tamanho padronizado em 16 mm, os quais foram esterilizados e fixados em placas de cultura celular. Na 1ª parte, em 12 espécimes, foi padronizada a associação dos três microrganismos utilizando quatro modelos experimentais diferentes. Após padronização, 48 espécimes foram contaminados com suspensões de *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans*, sendo o período total de contaminação de 28 dias. Após, os canais radiculares foram preparados biomecanicamente, sendo divididos em 4 grupos experimentais (n=12) de acordo com o agente irrigante utilizado: G1) extrato glicólico de própolis; G2) extrato glicólico de sálvia; G3) solução de clorexidina 2% e G4) solução fisiológica (controle). Todos os espécimes receberam como medicação intracanal (MIC) pasta de bardana + hidróxido de cálcio por 14 dias. Foram realizadas quatro coletas do conteúdo do canal radicular. Para todas as coletas foram realizadas análise microbiológica (semeadura em meio de cultura seletivo e contagem de UFC/mL) e quantificação de endotoxinas (lisado de Limulus). Os resultados foram analisados estatisticamente (ANOVA e teste de Tukey, 5% / Kruskal Wallis e Dunn, 5%). Nos grupos G1 (própolis) e G3 (clorexidina) houve eliminação total dos microrganismos após instrumentação, sendo estatisticamente diferente dos grupos G2 e G4 ($p < 0,05$). A sálvia (G2) apresentou melhores resultados que o controle (G4) na 1ª coleta após instrumentação, entretanto, na 2ª coleta foram semelhantes. Após medicação intracanal, em todos os grupos houve eliminação dos três microrganismos ($p > 0,05$). Todos os grupos apresentaram grande quantidade de endotoxinas após instrumentação, principalmente na 2ª coleta ($p > 0,05$). Houve significativa redução de endotoxinas após medicação intracanal ($p > 0,05$). De acordo com os resultados, pode-se concluir que: a) é possível a associação dos três microrganismos em canais radiculares; b) a própolis foi efetiva sobre *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli*, com efeito residual, enquanto a sálvia apresentou menor efetividade, sem efeito residual; c) a MIC (bardana + hidróxido de cálcio) foi efetiva sobre *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli*; d) somente a MIC (bardana + hidróxido de cálcio) foi capaz de neutralizar endotoxinas em canais radiculares.

PALAVRAS-CHAVE: associação microbiana; irrigantes do canal radicular; medicação intracanal; endotoxinas; extratos naturais.

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos e seus produtos exercem um importante papel etiológico no desenvolvimento e manutenção das alterações pulpares e periapicais⁵². De acordo com Sundqvist et al.¹²⁷, a infecção em dentes com necrose pulpar e periodontite apical é induzida por combinações específicas de bactérias anaeróbias facultativas e estritas, sendo que os microrganismos envolvidos na infecção endodôntica primária são predominantemente anaeróbios Gram-negativos²⁷.

A progressão da infecção endodôntica primária geralmente ocorre da seguinte forma: nos estágios iniciais, bactérias facultativas prevalecem; após aproximadamente sete dias, 50% da microbiota é composta por anaeróbios Gram-positivos e Gram-negativos e, em três meses, esta proporção atinge 85%; após seis meses, os anaeróbios estritos constituem mais de 90% da microbiota do canal radicular^{65,80}.

As infecções primárias são geralmente polimicrobianas com predomínio de bactérias anaeróbias^{80,147}. Embora mais de duzentas espécies microbianas tenham sido identificadas de infecções endodônticas, um grupo mais restrito composto por 15 a 30 espécies tem sido considerado como principais patógenos endodônticos¹¹⁸. Dentre os gêneros predominantes, têm-se diversos microrganismos Gram-negativos, como *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter* e *Tannerella*^{34,36,47,80,120}. Em 1994, Tani-Ishii et al.¹²⁹ verificaram predomínio de anaeróbios estritos Gram-negativos nos canais radiculares de ratos durante a fase ativa de desenvolvimento de lesões periapicais. Bactérias Gram-negativas liberam endotoxinas (complexos

lipopolissacarídicos), com potente ação citotóxica, que contribuem para início e manutenção da inflamação pulpar e periapical^{22,43,143}.

Diante da infecção endodôntica, o principal objetivo do tratamento é a eliminação de microrganismos e seus produtos do sistema de canais radiculares por meios mecânicos e químicos¹⁶. Durante a instrumentação do canal radicular, vários agentes antimicrobianos têm sido utilizados como irrigantes endodônticos ou como substância química auxiliar, destacando-se hipoclorito de sódio e clorexidina, em solução ou gel^{20,60,137,146}. Contudo, é possível que microrganismos mais resistentes permaneçam no interior dos canais radiculares após o preparo biomecânico ou, ainda, penetrem no sistema de canais radiculares durante ou após o tratamento endodôntico⁸⁰, especialmente em dentes com falhas no selamento coronário. Nestes casos, os microrganismos podem promover infecções secundárias e/ou persistentes, contribuindo para o insucesso do tratamento.

Nas infecções secundárias e/ou persistentes, a microbiota é geralmente composta por um número bem menor de espécies que as infecções primárias, sendo as bactérias Gram-positivas predominantes^{80,94,128}. Os principais patógenos associados com infecção pulpar secundária e/ou persistente pertencem aos gêneros *Enterococcus*, *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Candida*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas*^{90,128,138}, sendo as espécies *E. faecalis* e *C. albicans* predominantes⁸⁰.

Sabendo-se que as infecções dos canais radiculares são polimicrobianas, os agentes irrigantes utilizados durante o preparo biomecânico devem ter amplo espectro de ação antimicrobiana, além de capacidade de dissolver tecidos, ausência de toxicidade e, ainda, capacidade de inativar endotoxinas^{81,84,111,148}. Dentre as soluções irrigadoras mais freqüentemente utilizadas, o hipoclorito de sódio merece destaque devido a suas propriedades antimicrobianas e capacidade de dissolver tecidos^{49,118,144}, entretanto, é tóxico para os tecidos periapicais,

principalmente em concentrações mais altas, e não tem demonstrado ação efetiva sobre endotoxinas^{69,81}.

A clorexidina, em gel ou solução, também tem sido utilizada como irrigante endodôntico ou substância química auxiliar devido seu amplo espectro de ação antimicrobiana, substantividade e relativa ausência de citotoxicidade^{72,108,133}, entretanto, não apresenta capacidade de dissolver tecidos e tem pouca ou nenhuma ação sobre endotoxinas⁸¹. Assim, a terapia endodôntica precisa ser mais estudada, a fim de conseguir um agente irrigante que preencha todos os requisitos necessários para sua finalidade.

Atualmente, houve um crescente interesse na utilização de substâncias naturais em diferentes áreas biológicas, muitas vezes como métodos alternativos de tratamento. A flora brasileira é muito diversificada e rica, sendo que muitas de suas plantas são usadas na medicina natural⁹², sendo necessárias análises mais específicas para uma possível utilização destas plantas na área odontológica, por exemplo, como soluções irrigadoras alternativas do canal radicular. Estudos têm demonstrado atividade antimicrobiana de chá verde, chá preto, cacau, própolis, tomilho, alho, mamona, bardana, óleos essenciais de sálvia, crótons, capim-limão, orégano e hortelã, entre outros, sobre diferentes microrganismos^{29,30,32,38,53,61,66,84,87}. Assim, torna-se interessante avaliar a ação de extratos naturais sobre microrganismos e endotoxinas freqüentemente encontrados em infecções primárias e secundárias dos canais radiculares, a fim de ampliar ou modificar a terapia endodôntica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microrganismos nas infecções pulpares e periapicais

A infecção do tecido pulpar, que normalmente progride para periodontite apical, é geralmente causada por associações de microrganismos^{11,36}, de modo que o principal foco do tratamento endodôntico é a eliminação dos microrganismos e seus produtos do sistema de canais radiculares antes da obturação endodôntica³⁶.

A microbiota dos canais radiculares infectados está constantemente sendo identificada, sendo que novas espécies microbianas são descobertas, de acordo com a evolução dos métodos de identificação e cultivo dos microrganismos isolados. Até 1970, os microrganismos comumente isolados dos canais radiculares eram facultativos ou aerotolerantes, especialmente *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. e leveduras (*Candida albicans*)⁸⁰. Com o desenvolvimento das técnicas de isolamento e cultivo de anaeróbios estritos, em meados dos anos 70, pôde-se verificar que as infecções da polpa e do periápice eram causadas especialmente por tais microrganismos^{11,80,125}.

Assim, tradicionalmente, os microrganismos têm sido identificados por técnicas de cultura, entretanto, nos últimos anos, a tecnologia da biologia molecular tem sido aplicada na investigação da microbiota endodôntica associada com diferentes formas de periodontite apical^{10,79,114}. Os métodos moleculares podem superar as limitações das

técnicas de cultura, incluindo a identificação de espécies ainda não cultiváveis e a identificação mais segura das espécies cultiváveis¹¹⁴ (Siqueira Junior e Rôças, 2005). Com isso, um grande espectro de espécies microbianas tem sido revelado nas infecções da polpa e periápice^{79,80,114}.

As infecções primárias dos canais radiculares são, geralmente, polimicrobianas com predomínio de bactérias anaeróbias^{36,126,148}. De acordo com Siqueira Junior et al.¹¹⁸, apesar de mais de 200 espécies microbianas terem sido identificadas de infecções endodônticas, um grupo mais restrito composto por 15 a 30 espécies tem sido considerado como principais patógenos endodônticos⁸⁰. A infecção endodôntica primária geralmente inicia com bactérias facultativas, sendo que, normalmente, após sete dias 50% da microbiota é composta por anaeróbios Gram-positivos e Gram-negativos. Após aproximadamente três meses, esta proporção atinge 85% e após seis meses, os anaeróbios estritos constituem mais de 90% da microbiota do canal radicular^{65,80}. Geralmente, os gêneros predominantes são: *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Tannerella*, *Treponema*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces* e *Eubacterium*^{9,34,36,47,80,112,120,142}. Bactérias facultativas e microaerófilas também são freqüentemente encontradas em infecções primárias.

Em 2003, Siqueira Junior e Rôças¹¹³ relataram a importância do sinergismo bacteriano entre algumas espécies de microrganismos na infecção primária do canal radicular. Os autores demonstraram associação positiva de *D. pneumosintes* (bacilo anaeróbio Gram-negativo) com outros microrganismos, principalmente *T. denticola* e *P. endodontalis* em canais radiculares com polpa necrosada e lesão periapical. Estes achados sugeriram que o sinergismo bacteriano tem um papel importante na patogênese de diferentes formas de lesões periapicais. Em 2007, Siqueira Junior et al.¹²¹ confirmaram a natureza polimicrobiana das infecções endodônticas primárias com predomínio de

bactérias anaeróbias. Segundo estes autores, os microrganismos mais prevalentes foram *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Micromonas micros* e estreptococos, sendo que alguns dos isolados eram espécies ainda não caracterizadas e espécies recentemente nomeadas. Vianna et al.¹³⁴ relataram que espécies pertencentes à divisão *Synergistes*, pobremente caracterizadas, têm sido reportadas em infecções endodônticas e podem fazer parte da etiologia das doenças periapicais. Estes autores caracterizaram e quantificaram filotipos de *Synergistes* em 32 canais radiculares infectados, utilizando PCR *real time* e compararam com a quantificação de reconhecidos patógenos endodônticos como *Prevotella intermedia*, *Porphyromona gingivalis* e *Treponema*. Os autores concluíram que a prevalência e quantidade de *Synergistes* ocorreu dentro do nível de outros patógenos analisados, sugerindo sua relevância clínica nas infecções endodônticas. Além disso, a diversidade de *Synergistes* encontrada nos sítios da doença designa canais radiculares infectados como um importante ecossistema humano promovendo vários nichos únicos para este moderno grupo de bactérias. Siqueira Junior e Rôças¹¹⁵ também investigaram a presença e identidade de filotipos não cultivados da divisão *Synergistes* em infecções primárias dos canais radiculares usando protocolo PCR. Os resultados demonstraram que os filotipos *Synergistes* ainda não cultivados estão presentes na microbiota endodôntica e que eles podem representar papel na etiologia das periodontites apicais.

Atualmente, tem-se verificado que a introdução de métodos moleculares na identificação microbiológica permite uma melhor compreensão do perfil microbiano das infecções endodônticas primárias, pois permite a identificação de algumas espécies que foram subestimadas nos estudos de cultura, como *Treponema* spp.^{34,103}, *Filifactor alocis*³⁴, *Tannerella forsythia*^{34,103} e *Enterococcus faecalis*^{103,104}. Desta forma, torna-se de grande importância a utilização de substâncias com efetiva

ação antimicrobiana durante o preparo dos canais radiculares, a fim de garantir o sucesso do tratamento endodôntico, uma vez que no sistema de canais radiculares existem diferentes microrganismos associados e, provavelmente, muitas espécies ainda nem identificadas.

Além da infecção primária dos canais radiculares, é possível que microrganismos mais resistentes permaneçam no interior dos canais radiculares após o preparo biomecânico ou, ainda, penetrem no sistema de canais radiculares durante ou após o tratamento endodôntico, que ocorre geralmente por falhas no selamento coronário. Nestes casos, os microrganismos podem promover infecções secundárias e/ou persistentes, contribuindo para o insucesso do tratamento. Nas infecções secundárias e/ou persistentes, a microbiota é geralmente composta por um número bem menor de espécies que as infecções primárias, sendo bactérias Gram-positivas predominantes^{94,128}. Os principais patógenos associados com estas infecções pertencem aos gêneros *Enterococcus*, *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Candida*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas*^{80,94,128,138}.

Enterococcus faecalis tem sido a espécie mais freqüentemente identificada nos casos de falhas no tratamento endodôntico^{91,128}. Molander et al.⁷³ demonstraram que bactérias do gênero *Enterococcus* foram as mais frequentemente isoladas de canais radiculares obturados e que apresentavam lesões periapicais, sendo isoladas em 78% dos casos. Em 2001, Peciulienė et al.⁹¹ determinaram a ocorrência de *E. faecalis*, leveduras e bacilos entéricos Gram-negativos em 40 canais radiculares com falhas no tratamento endodôntico. Os resultados demonstraram cultura positiva em 33 dos 40 canais radiculares avaliados. Leveduras foram isoladas em seis dentes, três em associação com *E. faecalis*. Bacilos entéricos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*) estavam presentes em três dentes e *E. faecalis* foram isolados em 21 dos 33 canais radiculares avaliados. Pinheiro et al.⁹⁴ identificaram a microbiota em canais radiculares com falhas no tratamento

endodôntico e determinaram a associação de várias espécies. Os resultados demonstraram que das espécies isoladas, 57,4% foram anaeróbios facultativos e 83,3% microrganismos Gram-positivos. Os autores concluíram que a microbiota foi limitada a um pequeno número de espécies microbianas, predominantemente Gram-positivas e que anaeróbios facultativos, especialmente *E. faecalis*, foram os microrganismos mais comumente isolados. Contudo, infecções polimicrobianas e anaeróbios obrigatórios foram freqüentemente encontrados em canais com sintomatologia clínica.

Em 2008, Gomes et al.³⁷ investigaram a presença de nove espécies bacterianas em canais radiculares obturados e que apresentavam lesões periapicais. As amostras foram coletadas após desobturação e analisadas por PCR. De acordo com os resultados, *E. faecalis* foi a espécie mais prevalente, detectada em 77,8%, seguido por *Peptostreptococcus micros*, detectada em 51,1%. *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* foram detectados em 35,6%, 22,2%, 11,1% e 11,1% das amostras, respectivamente. Outras espécies também foram identificadas, como *F. alocis* em 26,7%, *T. denticola* em 24,4% e *T. forsythia* em 4,4% das amostras. Os autores observaram relação sinérgica entre algumas espécies e concluíram que *E. faecalis* foi a espécie mais freqüentemente identificada em dentes com falhas no tratamento endodôntico.

Interações entre *E. faecalis* e outras espécies encontradas nas infecções de canais radiculares podem ser importantes para o desenvolvimento e persistência das alterações periapicais. Johnson et al.⁵¹ investigaram interações entre *E. faecalis* e *P. anaerobius*, *P. oralis*, *F. nucleatum* e *S. anginosus*. Os resultados demonstraram coagregação de *E. faecalis* com *F. nucleatum*, de modo que os autores sugeriram um potencial papel desta combinação nas infecções endodônticas.

O gênero *Enterococcus*, especialmente *E. faecalis*, é bastante importante na microbiota de canais radiculares com falhas no

tratamento endodôntico, pois estes microrganismos também têm demonstrado capacidade de sobreviver em ambiente em que há escassez de nutrientes e em que a comensalidade com outras bactérias é mínima^{12,128}. Assim, nas infecções endodônticas, *E. faecalis* pode sobreviver no canal radicular como organismo único, sem o suporte de outras espécies, e representar um problema para o sucesso do tratamento. Este gênero oferece resistência a várias substâncias antimicrobianas e ainda pode se favorecer por alterações no ecossistema do canal radicular e instituir uma infecção persistente⁸⁰. *E. faecalis* pode invadir os túbulos dentinários em profundidade e, com isso, é provável que as células no interior dos túbulos dentinários que consigam sobreviver à instrumentação química-mecânica e medicação intracanal possam colonizar os túbulos e reinfetar os canais radiculares obturados¹².

Outro microrganismo presente em canais radiculares com falhas no tratamento endodôntico é a levedura do gênero *Candida*, principalmente a espécie *C. albicans*⁸⁰. A incidência de *C. albicans* na infecção endodôntica tem recebido maior atenção, sendo observada tanto nas infecções endodônticas primárias como nas refratárias¹¹⁶. Waltimo et al.¹³⁸ avaliaram a ocorrência de leveduras em 947 amostras de canais radiculares com infecções persistentes e os resultados demonstraram presença de fungos em 7% dos isolados, sendo *C. albicans* a espécie mais comum. Leveduras foram encontradas em cultura pura em seis amostras e em conjunto com outras bactérias em 41 amostras. Bactérias anaeróbias foram isoladas junto com leveduras em 12 canais radiculares, incluindo espécies Gram-positivas como *P. micros* e Gram-negativas como *F. nucleatum*. Os resultados deste estudo indicaram que as leveduras podem ter um importante papel nos casos de periodontites apicais que persistem após tratamento endodôntico convencional.

C. albicans possui uma variedade de fatores de virulência que podem facilitar sua penetração no interior dos túbulos dentinários, como capacidade de adaptação a uma variedade de condições

ambientais, adesão a diferentes superfícies, produção de enzimas hidrolíticas, transição morfológica e formação de biofilme¹¹⁶. Em 2002, Siqueira Junior et al.¹¹⁹ investigaram *in vitro* o padrão de colonização da dentina radicular por cinco espécies fúngicas (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *Saccharomyces cerevisiae*). De acordo com os resultados, *C. albicans* demonstrou habilidade para colonizar dentina, enquanto as outras quatro espécies fúngicas não apresentaram tal capacidade. Os autores relataram que estes resultados podem contribuir para explicar que *C. albicans* é a espécie fúngica mais frequentemente encontrada nas infecções endodônticas. Egan et al.²³ demonstraram presença de leveduras em 10% dos canais radiculares com periodontites apicais, sendo significativamente associada com a presença das leveduras (*C. albicans* e *Rodotorula mucilaginosa*) na saliva dos pacientes avaliados. De acordo com Siqueira Junior e Sen¹¹⁶, *C. albicans* tem sido considerada como microrganismo dentinofílico devido sua afinidade invasiva à dentina. Assim, sua habilidade de invadir os túbulos dentinários e sua resistência aos medicamentos intracanais comumente utilizados podem ajudar a explicar porque *C. albicans* tem sido associada com casos de infecções persistentes dos canais radiculares.

De acordo com esta revisão, pode-se verificar que diferentes microrganismos estão presentes nas infecções dos canais radiculares e que novas espécies vêm sendo identificadas como importantes patógenos endodônticos, além disso, muitos microrganismos oferecem resistência ao tratamento endodôntico convencional, podendo prejudicar seu sucesso. Desta forma, torna-se de grande importância ampliar os estudos da terapêutica endodôntica a fim de viabilizar soluções irrigadoras e medicações intracanais com maior espectro de ação antimicrobiana e com maior efeito residual, incluindo substâncias naturais.

2.2 Endotoxinas: participação nas alterações pulpares e periapicais

Nas infecções primárias dos canais radiculares, dentre os gêneros predominantes, destacam-se diversos microrganismos Gram-negativos, como *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter* e *Tannerella*^{34,36,47,120}. Em 1994, Tani-Ishii et al.¹²⁹ verificaram predomínio de anaeróbios estritos Gram-negativos nos canais radiculares durante o desenvolvimento de lesões periapicais em ratos, especialmente na fase de destruição óssea ativa e expansão das lesões.

Muitos estudos têm demonstrado que existe uma relação entre a infecção polimicrobiana dos canais radiculares, principalmente espécies anaeróbias Gram-negativas, e sinais e sintomas clínicos, como dor espontânea, dor à palpação, edema e exsudato purulento^{33,35,36,41,47}. Em 2007, Gomes et al.³⁵ avaliaram a correlação entre sinais e sintomas endodônticos e a presença de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia* em infecções primárias de canais radiculares com polpa necrosada. Os autores verificaram alta prevalência de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia* nas amostras avaliadas, sugerindo que estas bactérias estão relacionadas com a etiologia de doenças periapicais sintomáticas. De acordo com Tomazinho e Ávila-Campos¹³², bactérias anaeróbias Gram-negativas, como *Prevotella* spp. e *Porphyromonas* spp., estão envolvidas na etiologia e manutenção das infecções endodônticas.

Outros estudos também têm revelado presença de bactérias Gram-negativas produtoras de pigmentos negros (gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella*) em cerca de 30% das infecções pulpares e periapicais, sendo geralmente relacionadas à presença de sinais e sintomas agudos das patologias endodônticas^{11,124,127}. Em infecções purulentas, a presença destas bactérias produtoras de pigmentos negros pode variar entre 50%^{11,36} a 70% dos casos¹²⁷. Segundo Gomes et al.³⁵, as infecções purulentas estão associadas principalmente com:

Porphyromonas gingivalis, *Porphyromonas endodontalis*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus sanguis*. Em abscessos periapicais agudos, muitos microrganismos predominantes são Gram-negativos pertencentes aos gêneros *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Tannerella*^{80,120}.

Assim, pode-se verificar que as bactérias Gram-negativas têm grande importância na infecção primária dos canais radiculares, participando efetivamente na indução das alterações pulpares e periapicais. Bactérias Gram-negativas liberam endotoxinas (complexos lipopolissacarídicos, LPS) da parede celular durante a multiplicação ou morte bacteriana⁹³, causando diversos efeitos biológicos importantes que promovem reação inflamatória e reabsorção óssea periapical^{110,139}. Em 1975, Schein e Schilder¹⁰⁶ relataram a presença de grande quantidade de endotoxina em canais radiculares, sendo que dentes com polpas necrosadas apresentaram concentração mais alta de endotoxina que dentes com polpas vitais e dentes com sintomatologia também apresentaram mais endotoxinas que os assintomáticos. Estes autores demonstraram uma correlação positiva entre o aumento de endotoxinas e sintomatologia clínica. Jacinto et al.⁴⁶ quantificaram endotoxinas em canais radiculares com polpas necrosadas com e sem sintomatologia clínica e também verificaram níveis altos de endotoxinas em canais radiculares de dentes sintomáticos, havendo correlação positiva entre a concentração de endotoxina no canal radicular e a presença de sinais e sintomas endodônticos. Estes autores discutiram, ainda, que a alta concentração de endotoxinas em canais radiculares de dentes com dor espontânea, dor à palpação e percussão e com exsudatos purulentos indica que LPS é um fator biológico para o desenvolvimento de inflamação periapical aguda, sendo necessário durante o tratamento endodôntico a utilização de substâncias que atuem não somente como agentes antimicrobianos, mas que também apresentem capacidade de inativar endotoxinas. Outros estudos também demonstraram relação entre

sintomatologia clínica e maiores concentrações de endotoxinas em canais radiculares^{45,69}.

Desde 1975, diversos estudos, utilizando diferentes metodologias, têm verificado a presença de endotoxinas em canais radiculares. Dhalén e Bergenholtz¹⁹ observaram que a presença de endotoxina nas amostras de canais radiculares de dentes com polpas necrosadas estava correlacionada com a presença e o número de bactérias Gram-negativas. Horiba et al.⁴⁴ detectaram níveis maiores de endotoxinas em dentes com sintomatologia, com áreas radiolúcidas periapicais e com exsudação do que em dentes sem essas características. Khabbaz et al.⁵⁴ detectaram quantidade significativamente maior de endotoxina em lesões cariosas de dentes sintomáticos em comparação com os assintomáticos. Khabbaz et al.⁵⁵ também verificaram maior conteúdo de endotoxina nos tecidos pulpare de dentes sintomáticos, sugerindo que a endotoxina representa importante papel na patogênese da doença pulpar e que é possível uma associação dos níveis de endotoxina com severidade de dor pulpar. Segundo Seltzer & Farber¹⁰⁷, endotoxinas podem provocar dor pela ativação do fator Hageman, que leva a produção de bradicinina, ou por propriedades neurotóxicas ao agir nas terminações nervosas pré-sinápticas.

Muitos autores consideram a endotoxina como um dos principais fatores etiológicos envolvidos na patogênese e na manutenção da inflamação periapical, incluindo reabsorção óssea^{22,43,47,71,74,77,95,110,111,131,143}. A endotoxina causa importantes efeitos biológicos inflamatórios, como ativação do sistema complemento, quimiotaxia de polimorfonucleares, indução de febre, leucopenia, hipotensão e choque, coagulação intravascular, ativação policlonal de linfócitos B e produção de anticorpos não-específicos^{75,81,82}. Além disso, LPS ativa macrófagos, induzindo a síntese e liberação de mediadores da resposta inflamatória (prostaglandinas e leucotrienos)^{48,70} e citocinas,

como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL-1 α e IL-1 β)^{43,75,97}.

Essas substâncias químicas são ativadoras de osteoclastos, participando, portanto, do processo de reabsorção óssea, com conseqüente desenvolvimento da lesão periapical^{74,140}. Em diversos estudos, que avaliaram a utilização de soluções irrigadoras e medicações intracanais sobre LPS, a inoculação de endotoxinas em canais radiculares de cães induziu potente reabsorção óssea periapical em todos os grupos avaliados^{77,109,110,131}. Rogers et al.⁹⁷ relataram que LPS pode iniciar a perda óssea inflamatória pela indução da liberação de citocinas inflamatórias do hospedeiro. Estes autores demonstraram que injeções orais de LPS derivado de *A. actinomycetemcomitans* podem induzir severa perda óssea alveolar e produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) em ratos, por até oito semanas.

De acordo com a literatura, pode-se verificar que endotoxina (LPS) é um importante fator de virulência das bactérias Gram-negativas, determinando efeitos biológicos que resultam na amplificação da reação inflamatória periapical, incluindo reabsorção óssea^{22,43,47,71,95}. Com isso, torna-se bastante interessante sua eliminação ou neutralização durante o tratamento endodôntico, utilizando substâncias que tenham não apenas atividade sobre microrganismos como também capacidade de inativar endotoxinas, pois sua permanência no sistema de canais radiculares pode prejudicar o sucesso do tratamento, iniciando ou mantendo um processo inflamatório periapical.

2.3 Agentes irrigantes e medicações intracanais: ação sobre microrganismos e endotoxinas

Um dos principais fatores para o sucesso do tratamento endodôntico é a eliminação de microrganismos e seus produtos do sistema de canais radiculares^{7,36,82,137} e dentre os procedimentos envolvidos no controle da infecção endodôntica, a instrumentação e irrigação são agentes muito importantes^{98,108}. Desde 1981, com o estudo de Byström e Sundqvist¹⁵, tem-se verificado que somente o ato mecânico da instrumentação utilizando soro fisiológico não é suficiente para remover os microrganismos presentes nos canais radiculares, devido à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares e presença de restos orgânicos e inorgânicos. Com isso, a instrumentação deve ser realizada utilizando soluções irrigadoras ou substâncias químicas auxiliares que apresentem efetiva ação antimicrobiana. Desta forma, os agentes irrigantes ideais devem apresentar as seguintes características: amplo espectro de ação antimicrobiana, capacidade de dissolver tecidos necrosados, ausência de toxicidade aos tecidos periapicais e capacidade de inativar endotoxinas^{24,49,62,82,148}.

Dentre os vários irrigantes utilizados na endodontia, dois deles merecem destaque: hipoclorito de sódio e clorexidina^{28,49}. O hipoclorito de sódio é o irrigante endodôntico mais popular, o qual tem sido usado por mais de quatro décadas²⁸. Apesar de ser um efetivo agente antimicrobiano e um excelente solvente orgânico^{28,49,144}, o hipoclorito de sódio é irritante aos tecidos periapicais, principalmente em altas concentrações²⁵. Assim, devido a este efeito citotóxico, que prejudica sua utilização principalmente nos casos de dentes com rizogênese incompleta ou em pacientes alérgicos^{24,148}, outros irrigantes com menor potencial para induzir efeitos adversos têm sido preconizados,

especialmente a clorexidina²⁸, em função da sua biocompatibilidade e substantividade^{8,20,21,28,49,135}.

Delany et al.²¹ demonstraram *in vitro* ação antimicrobiana da solução de clorexidina 0,2% como irrigante endodôntico e sugeriram sua utilização na endodontia. A clorexidina é frequentemente utilizada como anti-séptico no controle químico do biofilme na cavidade bucal, nas concentrações de 0,1% a 0,2%, no entanto, como agente irrigante, a concentração 2% é a mais recomendada, na forma líquida ou em gel^{20,28,137}.

A clorexidina apresenta uma importante característica para um irrigante endodôntico que é a substantividade. Em 1999, Leonardo et al.⁶¹ demonstraram clinicamente que a solução de clorexidina 2% apresenta efeitos residuais no sistema de canais radiculares até 48 horas. Rosenthal et al.⁹⁸ avaliaram a substantividade da clorexidina no sistema de canais radiculares e concluíram que a clorexidina é retida na dentina radicular com efetiva ação antimicrobiana até doze semanas. Outros autores têm demonstrado substantividade da clorexidina nos canais radiculares por até três semanas⁵⁷.

A clorexidina apresenta amplo espectro de ação antimicrobiana^{20,25,34,72,108,148}, de modo que seu efeito antimicrobiano é devido a sua capacidade de se ligar a regiões eletronegativas da bactéria e de atacar a membrana citoplasmática bacteriana causando perda do equilíbrio osmótico e liberação do material intracelular. Assim, a clorexidina afeta a integridade da membrana citoplasmática dos microrganismos, causando prejuízos na bicamada de fosfolípidios e, dependendo da sua concentração, pode causar aglutinação do citoplasma¹³⁶. A clorexidina pode também se ligar à hidroxiapatita e aos tecidos moles, competindo com a aderência bacteriana⁴².

Os efeitos antimicrobianos da clorexidina 2% são semelhantes ou superiores aos obtidos pelo hipoclorito de sódio 5,25%^{20,25,49,78,86,135}. Dametto et al.²⁰ avaliaram *in vitro* a atividade

antimicrobiana do gel de clorexidina 2% sobre *E. faecalis* em comparação com a solução de clorexidina 2% e hipoclorito de sódio 5,25% e verificaram que a clorexidina 2%, em gel ou solução, foi mais efetiva que o hipoclorito de sódio 5,25% em manter a redução de *E. faecalis* por sete dias após o preparo biomecânico dos espécimes. Oliveira et al.⁷⁸ avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio 1,5%, 5,25% e da clorexidina gel 2% sobre *E. faecalis* em canais radiculares e verificaram que o hipoclorito de sódio 5,25% e a clorexidina gel 2% apresentaram efetividade similar na redução microbiana, sendo superior ao hipoclorito de sódio 1,5%. Siqueira Junior et al.¹²² compararam a eficácia do hipoclorito de sódio 2,5% e da solução de clorexidina 0,12% na redução bacteriana de 32 canais radiculares com necrose pulpar e periodontite apical e verificaram semelhantes efeitos antimicrobianos das soluções utilizadas.

Contudo, de acordo com a literatura, pode-se verificar que a clorexidina apresenta importantes propriedades para um irrigante ideal: amplo espectro de ação antimicrobiana^{20,25,34,72,108,148}, substantividade^{8,20,61,98} e baixa toxicidade^{24,130}. Por outro lado, não apresenta capacidade de dissolver tecidos^{20,24,49}.

Embora o hipoclorito de sódio e a clorexidina apresentem importante ação antimicrobiana nos canais radiculares, os poucos estudos que avaliam seus efeitos sobre endotoxinas (LPS) têm demonstrado efeitos mínimos ou ausentes^{1,81,110,131}. Aibel e Stevens¹ analisaram a capacidade da clorexidina 1,2% em inativar LPS, utilizando método de produção de IL-6 em cultura de macrófagos estimulados por LPS e LPS tratado com clorexidina 1,2% por 40 min. Os resultados demonstraram que a clorexidina 1,2% causou pouca ou nenhuma inativação do LPS. Buck et al.¹⁴ demonstraram que os seguintes irrigantes: água, EDTA, etanol, clorexidina 0,12%, clorexidina 0,12% associada a hipoclorito de sódio 2,6% e hipoclorito de sódio 2,6% demonstraram pequeno ou nenhum efeito sobre LPS. Por outro lado, o hidróxido de cálcio (como

medicação de demora) e a associação de clorexidina 0,12%, etanol 95% e hipoclorito de sódio 2,6% detoxificaram LPS pela hidrólise de ligações éster das cadeias de ácidos graxos.

Tanomaru et al.¹³¹ verificaram que diferentes soluções irrigadoras (hipoclorito de sódio 1%, 2,5%, 5% e clorexidina 2%) utilizadas durante o preparo biomecânico do canal radicular não inativaram os efeitos da endotoxina em induzir resposta inflamatória com reabsorção óssea na região periapical de cães. Em 2004, Silva et al.¹¹⁰ inocularam endotoxinas nos canais radiculares de cães e realizaram preparo biomecânico com diferentes agentes irrigantes: hipoclorito de sódio 1%, 2,5%, 5%, clorexidina 2% e solução fisiológica. Após sessenta dias, os resultados demonstraram que o infiltrado inflamatório no periápice foi estatisticamente menos intenso nos canais radiculares irrigados com hipoclorito de sódio 5% e clorexidina 2%, entretanto, nenhum dos irrigantes conseguiram inativar completamente os efeitos do LPS. Vianna et al.¹³⁷ demonstraram *in vivo* que a ação do preparo químico-mecânico (instrumentação com clorexidina gel e irrigação com solução fisiológica) foi o responsável pela maior remoção de endotoxinas, em média 44,4%, dos canais radiculares com infecção primária e lesões periapicais. De acordo com os autores, esta redução foi provavelmente resultado da remoção mecânica de *debris* dos canais radiculares durante a limpeza, auxiliada pela irrigação com solução fisiológica, do que ação da clorexidina gel 2% em neutralizar endotoxinas. Oliveira et al.⁸¹ demonstraram *in vitro* que as soluções de hipoclorito de sódio 2,5% e 5,25% e clorexidina 2% não foram capazes de inativar LPS em canais radiculares. Por outro lado, estes autores demonstraram que a utilização de solução de hidróxido de cálcio (água de cal) e polimixina B, como agentes irrigantes, reduziram significativamente o nível de endotoxinas nos canais radiculares. Em 2008, Martinho e Gomes⁶⁹ demonstraram *in vivo* que o preparo químico-mecânico utilizando hipoclorito de sódio 2,5%

como irrigante promoveu redução de apenas 59,99% nos níveis de endotoxinas presentes nos canais radiculares.

Com base nesta revisão, pode-se verificar que os agentes irrigantes mais utilizados durante o preparo biomecânico dos canais radiculares (hipoclorito de sódio e clorexidina) apresentaram pouca ou nenhuma capacidade de inativar endotoxinas, tornando-se importante ampliar os estudos com outras substâncias, como extratos naturais, a fim adicionar aos irrigantes a capacidade de neutralizar endotoxinas.

Com relação à medicação intracanal, o hidróxido de cálcio tem seu uso consagrado por diversos autores em variadas situações clínicas, como necrose pulpar e periodontites apicais, processo de apicificação, tratamento de reabsorção radicular, entre outras¹⁴¹. O hidróxido de cálcio dissocia-se em íons cálcio e hidroxila e o efeito destes íons sobre tecidos e microrganismos é responsável pelo sucesso clínico do hidróxido de cálcio, pois promove meio ambiente favorável à deposição de tecido duro⁶⁰, levando à reparação das lesões periapicais¹⁴¹.

Muitos estudos demonstraram efetiva ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio sobre microrganismos presentes em canais radiculares infectados^{26,72}, principalmente sobre bactérias anaeróbias Gram-negativas. Entretanto, algumas espécies microbianas como *E. faecalis* e *C. albicans*, associadas aos casos de insucessos do tratamento endodôntico, podem apresentar resistência ao hidróxido de cálcio^{24,34,138}. Em 2007, Siqueira Junior et al.¹²² verificaram que, utilizando um protocolo de instrumentação com hipoclorito de sódio 2,5% e medicação intracanal com hidróxido de cálcio por 7 dias, houve ausência de bactérias cultiváveis em 9 dos 11 canais radiculares com polpa necrosada e periodontite apical. No entanto, de acordo com Sathorn et al.¹⁰⁵, o hidróxido de cálcio apresenta uma eficácia limitada na eliminação de microrganismos dos canais radiculares, de modo que sua utilização deveria ser associada com outras substâncias que apresentem maior ação antimicrobiana.

Assim, sabendo-se que a clorexidina apresenta importante efetividade sobre *E. faecalis* e *C. albicans*⁸, tem-se preconizado nos últimos a associação do hidróxido de cálcio com clorexidina, em gel 2% ou em solução a 2%^{8,25,68} a fim de ampliar o espectro de ação antimicrobiana da medicação intracanal.

O aumento ou não das propriedades antimicrobianas do hidróxido de cálcio em associação com a clorexidina tem sido bastante discutido na literatura. Em 2003, Haeni et al.⁴⁰ afirmaram que esta associação não promoveu aumento na atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio sobre *E. faecalis* e *C. albicans*. Por outro lado, diversos estudos afirmaram que esta associação aumentou significativamente a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio em relação à pasta convencional (hidróxido de cálcio + soro ou água)^{34,149}. Outros autores têm afirmado, ainda, que a atividade antimicrobiana da clorexidina é diminuída quando associada ao hidróxido de cálcio^{5,34}. E ainda, recentemente, Manzur et al.⁶⁸ avaliaram a ação antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio (manipulada com solução salina estéril), clorexidina gel 2% e a associação de ambos, como medicação intracanal por uma semana em dentes com necrose pulpar e periodontite apical crônica e concluíram que a eficácia antibacteriana de todas as medicações avaliadas foi semelhante.

Com isso, apesar de muitos estudos demonstrarem a eficácia antimicrobiana da associação do hidróxido de cálcio com clorexidina, novas associações do hidróxido de cálcio devem ser avaliadas, por exemplo com substâncias naturais, a fim de tentar ampliar sua ação antimicrobiana no sistema de canais radiculares.

Já com relação às endotoxinas (LPS), o hidróxido de cálcio apresenta grande capacidade de neutralizar seus efeitos tóxicos^{6,77,81,82,99,100,111,131}. Em 1993, Safavi e Nichols⁹⁹ demonstraram que o hidróxido de cálcio promove hidrólise da porção lipídica da endotoxina, liberando ácidos graxos livres, e que esta degradação do LPS pode ter

grande importância nos efeitos benéficos obtidos o uso do hidróxido de cálcio na endodontia. Desde então, outros estudos também têm demonstrado a ação do hidróxido de cálcio sobre endotoxinas^{6,14,83}.

Safavi e Nichols¹⁰⁰ comprovaram a atividade do hidróxido de cálcio em alterar a capacidade do LPS em estimular a liberação de prostaglandina E₂ por monócitos. Barthel et al.⁶ verificaram que o hidróxido de cálcio pode eliminar a capacidade indutora do LPS de *E. coli* em estimular a produção de TNF- α por monócitos. Olsen et al.⁸³ demonstraram que o tratamento de LPS com hidróxido de cálcio reduziu significativamente a liberação de IL-1 β por monócitos. Outros autores avaliaram o efeito da endotoxina, associada ou não ao hidróxido de cálcio, sobre os tecidos periapicais de cães e verificaram que a endotoxina sozinha induziu lesão periapical e que o hidróxido de cálcio neutralizou seus efeitos tóxicos^{77,111}. Em 2003, Tanomaru et al.¹³¹ também verificaram que o hidróxido de cálcio como medicação de demora por sessenta dias inativou os efeitos induzidos pela endotoxina na região periapical de cães. Jiang et al.⁵⁰ estudaram os efeitos diretos do LPS e do LPS tratado com hidróxido de cálcio na gênese de osteoclastos e observaram que hidróxido de cálcio reduziu significativamente a capacidade do LPS em ativar a diferenciação de osteoclastos. Em 2005, Oliveira et al.⁸² verificaram *in vitro* que o hidróxido de cálcio como medicação intracanal por 7 dias foi eficiente na neutralização de endotoxinas, alterando a atividade imunológica do LPS em estimular ativação policlonal de linfócitos B.

Assim, sabendo-se que as endotoxinas apresentam importante papel no desenvolvimento e manutenção das lesões periapicais e que o hidróxido de cálcio consegue neutralizar seus efeitos tóxicos, torna-se importante seu uso como medicação intracanal. Por outro lado, como abordado anteriormente, o hidróxido de cálcio não é efetivo sobre todos os microrganismos presentes na infecção endodôntica, de modo que os estudos nesta área devem ser ampliados,

com o intuito de obter uma associação positiva ao hidróxido de cálcio, que aumente seu espectro de ação antimicrobiana e mantenha sua ação sobre endotoxinas. Uma das associações que deve ser mais profundamente avaliada é a do hidróxido de cálcio com diferentes extratos naturais, pois há poucos estudos na literatura.

2.4 Extratos naturais: ação antimicrobiana e sobre endotoxinas

Além dos agentes irrigantes utilizados frequentemente no tratamento endodôntico, como a clorexidina e o hipoclorito de sódio, substâncias naturais também podem ser utilizadas para esta finalidade. Nos últimos anos houve um crescente interesse na utilização de fitoterápicos em diferentes áreas biológicas, muitas vezes como métodos alternativos de tratamento. A flora brasileira é muito diversificada e rica, sendo que muitas de suas plantas são usadas na medicina natural⁹². Assim a utilização destas plantas na área odontológica, por exemplo, como soluções irrigadoras do canal radicular ou como medicação de demora, representa importante área de pesquisa.

A literatura relata ação antimicrobiana de diferentes substâncias naturais, como chá verde, chá preto, cacau, própolis, tomilho, alho, mamona, bardana, óleos essenciais de sálvia, crótons, capim-limão, orégano e hortelã, entre outros, sobre diferentes microrganismos^{29,30,32,38,53,61,66,87,92}. Araújo et al.⁴ verificaram que o óleo essencial de *Melissa officinalis* apresentou importante efetividade contra diferentes espécies de leveduras. Kalemba e Kunika⁵³ revisaram as propriedades antibacterianas e antifúngicas de muitos óleos essenciais e verificaram que os óleos essenciais de temperos e ervas (tomilho, orégano, hortelã, canela, cravo-da-índia e sálvia) possuem fortes efeitos antimicrobianos. Pereira et al.⁹² avaliaram a atividade antimicrobiana de

óleos essenciais de ervas medicinais (*Ocimum gartissimum*, *Cytopogum citratus* e *Salvia officinalis*) frente a cem cepas de bactérias isoladas de indivíduos com diagnóstico de infecção urinária. Os resultados demonstraram que *Salvia officinalis* apresentou ação inibitória superior aos outros fitoterápicos, tendo eficácia de 100% em espécies de *Enterobacter* e *Klebsiella*, 96% em *Escherichia coli*, 83% contra *Proteus mirabilis* e 75% em *Morganella morganii*.

Ozcan et al.⁸⁸ relataram que óleos essenciais de sálvia, tomilho, orégano, hortelã e cominho foram efetivos contra várias espécies de *Bacillus*. Em 2006, Sonboli et al.¹²³ avaliaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de três espécies de sálvia (*S. santolinifolia*, *S. hydrangea* e *S. myrzayanii*) e verificaram que atividade antimicrobiana do óleo de *S. myrzayanii* foi superior aos outros. Yousefzadi et al.¹⁴⁶ também analisaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de diferentes espécies de sálvia (*S. multicaulis*, *S. sclarea* e *S. verticillata*) contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumulis*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*) e três fungos (*C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*). Os resultados da atividade antibacteriana demonstraram que todas as amostras apresentaram moderada a alta atividade contra as bactérias testadas, exceto para *P. aeruginosa* que foi totalmente resistente. Por outro lado, os óleos apresentaram fraca ou nenhuma atividade antifúngica, sendo que somente o óleo de *S. multicaulis* demonstrou atividade sobre *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Estes estudos demonstraram que os óleos essenciais de sálvia apresentaram importante ação antimicrobiana, devendo ampliar os estudos para avaliar a ação de extratos glicólicos de sálvia sobre diferentes microrganismos presentes na infecção endodôntica e sobre endotoxinas.

Além dos óleos essenciais, muitos extratos naturais também apresentam efetividade antimicrobiana. Alves et al.³ analisaram extratos de aroeira-do-sertão, malva e goiabeira sobre microrganismos do biofilme dentário (*S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus casei*) e cepas de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stelatoidea* e *C. krusei*). Os autores concluíram que todos os extratos apresentaram potencialidade de inibição do crescimento de microrganismos do biofilme dentário, bem como de leveduras do gênero *Candida*, sugerindo utilização futura dessas substâncias naturais, como meio alternativo de baixo custo, nas indicações terapêuticas na odontologia. Navas et al.⁷⁶ verificaram que o chá de tomilho foi efetivo em inibir a aderência de *C. albicans* em resina acrílica, porém, não apresentou efeito em inibir a aderência de *S. mutans* em esmalte humano.

Outro extrato que tem apresentado importante atividade antimicrobiana é a própolis, geralmente avaliada na forma de extrato alcoólico. Muitas propriedades têm sido descritas para a própolis, incluindo atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica²⁹. Lu et al.⁶⁶ demonstraram que o extrato alcoólico de própolis apresentou diferentes graus de atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*, dependendo da concentração, local de extração e tempo. Koo et al.⁵⁸ estudaram a atividade antimicrobiana da própolis e *Arnica montana* sobre diferentes patógenos bucais e concluíram que o extrato de própolis demonstrou *in vitro* atividade antimicrobiana, inibição da aderência de células em superfícies de vidro e inibiu a formação de glicanos insolúveis, enquanto o extrato de *Arnica* foi apenas ligeiramente ativo nessas três condições. Santos et al.¹⁰² verificaram que extrato alcoólico de própolis foi efetivo no tratamento de candidose oral em pacientes com próteses totais. Samet et al.¹⁰¹ demonstraram que a própolis foi efetiva na diminuição de estomatite aftosa recorrente, diminuindo o número de recorrências e melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

Mais especificamente na endodontia, Gafar et al.³¹ analisaram medicações intracanaís de extrato alcoólico de própolis em infecções dos canais radiculares e verificaram melhores resultados que paramonoclorofenol canforado (PMCC). Em 1998, Bretz et al.¹³ utilizaram extrato alcoólico de própolis para capeamento pulpar e verificaram que a própolis induziu a formação de pontes de tecido duro semelhante ao obtido pela administração com hidróxido de cálcio. Silva et al.¹⁰⁹ avaliaram na região dorsal de ratos o potencial irritativo de própolis, Otosporin e soro fisiológico (controle), como medicamentos utilizados em endodontia. Os autores concluíram que a própolis foi o medicamento que apresentou menor potencial irritativo, sugerindo a própolis como boa alternativa para medicação intracanal. Al-Shaher et al.² avaliaram a tolerância de fibroblastos do ligamento periodontal e polpa dentária a própolis, em comparação com hidróxido de cálcio, e verificaram que a exposição das células a própolis resultou em mais de 75% de células viáveis, enquanto que o hidróxido de cálcio resultou em menos de 25% de viabilidade celular.

Ferreira et al.²⁹ analisaram os efeitos antimicrobianos do extrato alcoólico de própolis e medicações intracanaís (hidróxido de cálcio, PMCC e formocresol) contra diferentes patógenos endodônticos: *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces israelii*, *Clostridium perfringens* e *Enterococcus faecalis*. Os resultados demonstraram que todas as substâncias, incluindo própolis, foram efetivas para todas as cepas, sem diferenças estatísticas. *E. faecalis* foi a cepa menos suscetível aos efeitos das substâncias avaliadas, sem diferença significativa. Os autores concluíram ainda que o álcool não influenciou no efeito antimicrobiano da própolis. Koru et al.⁵⁹ avaliaram a atividade antimicrobiana de 5 diferentes amostras de extratos alcoólicos de própolis sobre 9 bactérias anaeróbias (*Peptostreptococcus anaerobius*, *P. micros*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella oralis*, *P. melaninogenica*,

Fusobacterium nucleatum, *Veillonella parvula*). Os extratos de própolis foram efetivos contra todos os microrganismos avaliados, entretanto, houve diferença entre as concentrações inibitórias mínimas, concentrações bactericidas mínimas e o tempo de ação. Os autores verificaram que as amostras de própolis foram mais efetivas sobre bactérias Gram-positivas. Desta forma, novas investigações devem ser realizadas a fim de verificar uma alternativa possível de própolis como agente antimicrobiano intracanal, focando principalmente os extratos livres de álcool, que poderia trazer benefícios alternativos para o tratamento endodôntico.

Outro extrato natural também interessante é a bardana (*Arctium lappa*). Em 1993, Lima Neto et al.⁶⁴ demonstraram efeito antimicrobiano de extratos hidroalcoólicos de diferentes plantas naturais, incluindo a bardana, sobre *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Pereira et al.⁹² verificaram que constituintes da bardana apresentaram potente inibição microbiana contra patógenos endodônticos (*E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *C. albicans*). Gentil et al.³² avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana da bardana como medicação de demora em canais radiculares contaminados com *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*, em comparação com hidróxido de cálcio. Os resultados demonstraram eficácia da bardana sobre todos os microrganismos avaliados. Com isso, a utilização do extrato da bardana nos canais radiculares pode trazer importantes benefícios à terapêutica endodôntica, sendo necessário ampliar os estudos nesta área.

Com relação aos efeitos de extratos naturais sobre endotoxinas (LPS), ainda são poucos os estudos abordados na literatura. Em 2005, Koksel et al.⁵⁸ avaliaram os efeitos de um componente ativo de própolis (CAPE) sobre as injúrias pulmonares causadas por LPS em ratos e concluíram que CAPE foi eficiente em reduzir inflamação e prejuízos

teciduais ao pulmão induzidos por LPS em ratos. Wan et al.¹³⁹ demonstraram que *Salvia miltiorrhiza*, usada no tratamento de várias infecções sistêmicas e cirúrgicas em hospitais da China, foi capaz de bloquear a toxicidade letal do LPS em camundongos via supressão da liberação de TNF- α . Estes autores relataram, ainda, a aplicação clínica da *Salvia miltiorrhiza* na prevenção de doenças inflamatórias causadas por bactérias Gram-negativas. Guo et al.³⁹ investigaram os efeitos de componentes de *Salvia miltiorrhiza* sobre o distúrbio circulatório causado por LPS e verificaram que estes componentes melhoraram significativamente os distúrbios microcirculatórios induzidos por LPS em ratos e inibiram a produção de H₂O₂ causada por LPS em neutrófilos. Chen et al.¹⁷ demonstraram que um derivado de *Salvia miltiorrhiza* inibiu a expressão de óxido nítrico induzida por LPS em macrófagos. Park et al.⁸⁹ demonstraram que constituintes da bardana apresentaram capacidade de inibir os efeitos de LPS na indução de óxido nítrico em macrófagos. Assim, tem-se verificado um crescente aumento no estudo da ação de substâncias naturais sobre endotoxinas, especialmente na área médica, com importantes resultados. No entanto, como são muitas as diferentes espécies de plantas, há necessidade de ampliar os estudos nesta área, priorizando, principalmente, como foco a área endodôntica.

Com base nesta revisão, pode-se verificar que plantas medicinais constituem uma fonte fitoterápica promissora, de modo que o crescente estudo de substâncias naturais na odontologia sugere a necessidade de verificar a ação destas substâncias sobre diferentes patógenos presentes nas infecções dos canais radiculares, a fim de promover terapia endodôntica cada vez mais eficiente no combate aos microrganismos e seus subprodutos.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste projeto foram:

- a) padronizar a associação de três microrganismos (*Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Escherichia coli*) em canais radiculares;
- b) avaliar a atividade antimicrobiana de extratos glicólicos naturais (própolis e sálvia), como soluções irrigadoras, em comparação com clorexidina 2%, sobre três microrganismos associados (*E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli*) e sobre endotoxinas em canais radiculares;
- c) avaliar a atividade antimicrobiana da bardana associada ao hidróxido de cálcio, como medicação intracanal, sobre microrganismos (*E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli*) e endotoxinas em canais radiculares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (UNESP) (processo nº 083/2006-PH/CEP – Anexo A).

4.1 Preparo dos espécimes

Foram utilizados 60 dentes humanos unirradiculados, recém-extraídos por indicações clínicas diversas e com prévia autorização dos pacientes por meio do consentimento livre e esclarecido. Os dentes foram limpos e imersos em solução fisiológica até o momento do uso. A seleção dos dentes foi feita baseada nas dimensões e similaridade morfológica da raiz, sendo os dentes radiografados para comprovação da presença de um único canal reto. As coroas foram seccionadas com disco de carborundum (Carbodont Gysi S.A., Buenos Aires, Argentina) padronizando o tamanho dos espécimes em 16 mm (Figura 1).



FIGURA 1 – Secção da coroa e padronização do tamanho dos espécimes em 16 mm.

A instrumentação inicial dos canais radiculares foi realizada em toda a sua extensão, desde seu diâmetro anatômico até a lima tipo Kerr (Maillefer, Michigan, USA) número 30. Os canais foram irrigados com solução de hipoclorito de sódio a 1% (Farmácia de Manipulação Aqua Marina, São José dos Campos, SP, Brasil) a cada troca de instrumento e, após, foram preenchidos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA- Iodotec, Porto Alegre, RS) a 17%, o qual foi agitado com uma lima durante 3 min. A irrigação final foi realizada com 10 mL de solução fisiológica. Em seguida, os canais radiculares foram secos com cones de papel nº 30, foi feito vedamento da região apical utilizando-se resina composta fotopolimerizável Z-100 (3M, Dental Products, St Paul, USA) e as raízes foram impermeabilizadas externamente com duas camadas de adesivo epóxi ARALDITE (Brascola, São Paulo, SP, Brasil), exceto a região da abertura cervical⁸¹ (Figura 2).



FIGURA 2 - Espécime com vedamento apical (resina composta) e impermeabilização externa da raiz (adesivo epóxi).

Todos os espécimes foram colocados em frascos de vidro contendo solução fisiológica e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min. Em seguida, para realização da primeira etapa do projeto

(padronização da associação de três microrganismos em canais radiculares), em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar), 12 espécimes foram distribuídos aleatoriamente em 4 placas de cultura celular de 24 poços, com 3 dentes em cada, os quais foram fixados com resina acrílica quimicamente ativada (aproximadamente 5 mm de altura).

Para realização da segunda etapa do projeto (avaliação da atividade antimicrobiana e sobre endotoxinas de extratos naturais em canais radiculares), 48 espécimes foram distribuídos aleatoriamente em 4 placas de cultura celular de 24 poços (TPP, Switzerland), com 12 dentes em cada (Figura 3). Estas placas e todos os materiais utilizados (limas, pinças, gaze, algodão, tesouras, exploradores, luvas e ponteiras, entre outros) foram esterilizados por radiação gama com cobalto 60 (20 KGy por 6 horas) pela empresa brasileira de radiação (EMBRARAD), para neutralizar endotoxinas pré-existent¹⁸.



FIGURA 3 – Distribuição e fixação dos espécimes em placas de cultura celular.

4.2 Primeira etapa

4.2.1 Padronização da associação de microrganismos em canais radiculares

Foram utilizados os seguintes microrganismos: *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Para realizar a associação destes microrganismos em canais radiculares, foram propostos quatro diferentes modelos experimentais.

No modelo 1, em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar), os canais radiculares de três espécimes foram contaminados com os três microrganismos, de modo que cada canal recebeu 5 µL de uma suspensão contendo *E. faecalis*, 5 µL de uma suspensão contendo *C. albicans* e 5 µL de uma suspensão contendo *E. coli*. Todas as suspensões foram padronizadas (10^6 céls/mL) em espectrofotômetro. Os canais receberam ainda 15 µL de caldo infuso cérebro e coração (BHI, Himedia Laboratories, Mumbai, Índia). Na entrada dos canais, foi colocada uma bolinha de algodão apirogênica embebida no caldo BHI. Os espécimes foram mantidos em estufa a $37\pm 1^\circ\text{C}$, em umidade relativa, por 21 dias⁷², sendo que a cada 2 dias, foram adicionados 20 µL de meio de cultura (caldo BHI) no interior dos canais radiculares.

Após o período de 21 dias, foi realizada coleta nos três espécimes para confirmação da contaminação dos canais radiculares. Para tanto, os canais foram preenchidos com solução fisiológica apirogênica, a qual foi agitada com uma lima tipo Kerr nº 30, e foram coletados 100 µL do conteúdo do canal radicular, os quais foram transferidos para microtubos tipo Eppendorf (Axygen Scientific, CA, USA), apirogênicos, contendo 900 µL de soro apirogênico. A seguir, foram

realizadas diluições e alíquotas de 100 µL foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar Enterococcosel (B.D., Le Pont de Claix, França), ágar Sabouraud Dextrose (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) com cloranfenicol (0,01 g/ 100 mL) (Vixmicina – União química Farmacêutica Nacional S.A, Embu-Guaçu, SP) e ágar MacConkey (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia), para analisar a presença de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli*, respectivamente. As placas foram incubadas a 37±1°C por 48 horas, para verificação do crescimento microbiano.

Os resultados deste modelo não demonstraram sucesso na associação dos três microrganismos, pois houve crescimento apenas de *E. faecalis*. Com isso, foi proposto um 2º modelo experimental para associação microbiana no canal radicular.

No modelo 2, os canais radiculares de três espécimes foram inicialmente contaminados com 5 µL de uma suspensão contendo *E. faecalis* (10⁶ céls/mL), 5 µL de uma suspensão contendo *C. albicans* (10⁶ céls/mL) e mais 10 µL de caldo BHI. Na entrada dos canais foi colocada uma bolinha de algodão embebida no caldo BHI. Os espécimes foram mantidos em estufa a 37±1°C, em umidade relativa, por 7 dias. Após, foram adicionados nos canais radiculares 5 µL de uma suspensão contendo *E. coli* (10⁶ céls/mL) e mais 10 µL de caldo BHI. Os canais foram selados com bolinha de algodão embebida em caldo BHI e foram mantidos em estufa a 37±1°C por mais 14 dias, totalizando 21 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 contaminação, foi realizada a coleta dos canais radiculares para confirmação da contaminação microbiana e semeadura em meios de cultura seletivos para cada microrganismo, como detalhado no modelo 1.

Os resultados obtidos no modelo 2 também não apresentaram sucesso, pois não houve crescimento de *E. coli* em nenhum dos espécimes avaliados.

Para tanto, foi proposto o modelo 3. Neste modelo, os canais radiculares foram contaminados primeiramente com 5 µL de uma suspensão contendo *E. coli* (10^6 céls/mL), 5 µL de uma suspensão contendo *C. albicans* (10^6 céls/mL) e mais 10 µL de caldo BHI. Na entrada dos canais foi colocada uma bolinha de algodão embebida no caldo BHI. Os espécimes foram mantidos em estufa a $37\pm 1^\circ\text{C}$, em umidade relativa, por 7 dias. Após, foram adicionados nos canais radiculares 5 µL de uma suspensão contendo *E. faecalis* (10^6 céls/mL) mais 10 µL de caldo BHI. Os canais foram selados com bolinha de algodão embebida em caldo BHI e foram mantidos em estufa a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por mais 14 dias, totalizando 21 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 contaminação, foi realizada a coleta dos canais radiculares para confirmação da contaminação microbiana e semeadura em meios de cultura seletivos para cada microrganismo, como detalhado no modelo 1.

Os resultados obtidos no modelo 3 também não demonstraram crescimento de *E. coli* em nenhum dos espécimes avaliados, somente *C. albicans* e *E. faecalis*.

De acordo com os resultados obtidos até o momento, foi proposto o 4º modelo experimental. Neste modelo, os canais radiculares de três espécimes foram inicialmente contaminados com 10 µL de uma suspensão contendo *E. coli* (10^6 céls/mL) e receberam mais 10 µL de caldo BHI. Na entrada dos canais foi colocada uma bolinha de algodão embebida no caldo BHI. Os espécimes foram mantidos em estufa a $37\pm 1^\circ\text{C}$, em umidade relativa, por 7 dias. Após, foram adicionados nos

canais radiculares 5 μL de uma suspensão contendo *E. faecalis* (10^6 céls/mL), 5 μL de uma suspensão contendo *C. albicans* (10^6 céls/mL) e mais 10 μL de caldo BHI. Os canais foram selados com bolinha de algodão embebida em caldo BHI e foram mantidos em estufa a $37\pm 1^\circ\text{C}$ 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 contaminação, foi realizada a coleta dos canais radiculares para confirmação da contaminação microbiana e semeadura em meios de cultura seletivos para cada microrganismo, como detalhado no modelo 1.

Os resultados obtidos no modelo 4 demonstraram sucesso na associação dos três microrganismos nos canais radiculares, de modo que houve intenso crescimento dos diferentes microrganismos (*E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli*) nos três espécimes avaliados.

Com isso, o modelo 4 foi padronizado para associação dos três microrganismos em canais radiculares, sendo utilizado na 2ª etapa deste projeto.

4.3 Segunda etapa

4.3.1 Contaminação microbiana dos canais radiculares

Os canais radiculares dos 48 espécimes foram primeiramente contaminados com 10 μL de suspensão contendo *E. coli* (10^6 células/mL) em solução fisiológica apirogênica (Aster Produtos Médicos LTDA, Sorocaba, SP), padronizada com a utilização de espectrofotômetro (Figura 4). Os canais receberam mais 10 μL de caldo

BHI e foram selados com bolinha de algodão aprotogênica embebida no caldo BHI. Os espécimes foram mantidos em estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, em umidade relativa, por 7 dias. Após, foram adicionados nos canais radiculares $5\ \mu\text{L}$ de uma suspensão contendo *E. faecalis* (10^6 céls/mL), $5\ \mu\text{L}$ de uma suspensão contendo *C. albicans* (10^6 céls/mL) e mais $10\ \mu\text{L}$ de caldo BHI. Os canais foram novamente selados com bolinha de algodão embebida em caldo BHI e foram mantidos em estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por mais 21 dias, totalizando 28 dias de contaminação (Figura 5). Durante este período, foram adicionados $20\ \mu\text{L}$ de meio de cultura (caldo BHI) no interior dos canais radiculares a cada 2 dias.

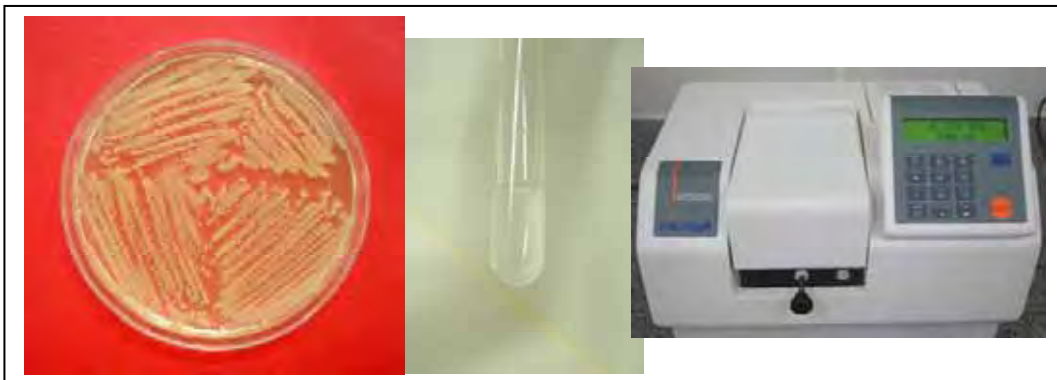


FIGURA 4 – Semeadura de *E. coli* por esgotamento e padronização da suspensão em espectrofotômetro.



FIGURA 5 – Contaminação dos espécimes e selamento com bolinha de algodão embebida em caldo BHI.

Após o período de contaminação, foi realizada coleta de todas as amostras para confirmação da contaminação dos canais radiculares. Para tanto, os canais foram preenchidos com solução fisiológica apirogênica, a qual foi agitada com uma lima tipo Kerr nº 30, e foram coletados 100 µL do conteúdo do canal radicular, sendo transferidos para tubos tipo Eppendorf, apirogênicos, contendo 900 µL de solução fisiológica apirogênica (Figura 6). A seguir, foram realizadas diluições e alíquotas de 100 µL foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar Enterococcosel, ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol e ágar MacConkey, para analisar a presença de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli*, respectivamente. As placas foram incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, para verificação do crescimento dos três microrganismos.

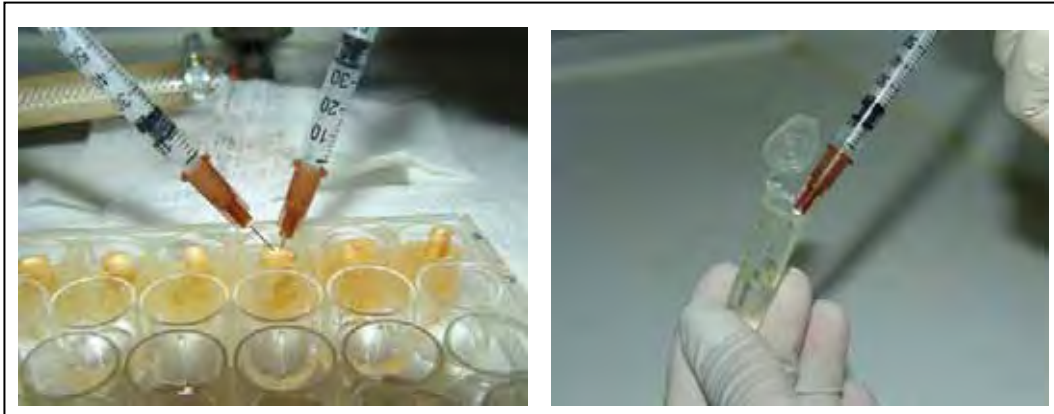


FIGURA 6 – Coleta do conteúdo do canal radicular em um dos espécimes.

4.3.2 Grupos experimentais

Após a confirmação da contaminação, todos os espécimes foram instrumentados até a lima tipo K nº 50 e escalonados

até a lima K nº 80, utilizando-se 3 mL do agente irrigante a cada troca de instrumento, sendo a irrigação e aspiração realizada com auxílio de seringas apirogênicas de 5 mL e agulhas apirogênicas 20 x 5,5 mm (Injex, SP, Brasil) (Figura 7). Desta forma, os espécimes foram divididos em 4 grupos experimentais (n=12), de acordo com a solução irrigadora utilizada (Quadro 1): grupo G1) extrato glicólico de própolis 12% (Apis Flora, Ribeirão Preto, SP) (Figura 8); grupo G2) extrato glicólico de sálvia 40% (*Salvia divinorum*) (Byofórmula Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP) (Figura 8); grupo G3) solução de clorexidina 2% (Byofórmula Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP); grupo G4 (controle): solução fisiológica (NaCl a 0,9%) apirogênica (Aster).



FIGURA 7 – Instrumentação de um dos espécimes, seguida de irrigação e aspiração.



Figura 8 – Extratos naturais: a) extrato glicólico de própolis (Apis Flora); b) extrato glicólico de sálvia (Byofórmula).

Após preparo biomecânico, foram realizadas duas coletas do conteúdo do canal radicular: uma imediatamente após a instrumentação e outra após 7 dias. Em seguida, todos os espécimes foram inundados com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA - Iodontec, Porto Alegre, RS) a 17%, o qual foi agitado com uma lima por 3 minutos e foi removido com 10 mL de solução fisiológica estéril e apirogênica (Aster). Após a aplicação do EDTA, os espécimes receberam como medicação de demora uma pasta contendo extrato glicólico de bardana 40% (*Arctium lappa*) (Byofórmula Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP) e hidróxido de cálcio P.A. (Iodontec, Porto Alegre, RS), com a consistência de pasta dental (Quadro 1) (Figura 9).



Figura 9 – a) Extrato glicólico de bardana; b) Hidróxido de cálcio; c) Pasta de bardana + hidróxido de cálcio

Após o preenchimento dos canais radiculares com a medicação de demora, estes permaneceram em estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por catorze dias. Após o período de ação da medicação intracanal, também foram realizadas duas coletas do conteúdo do canal radicular: imediata e após sete dias.

Quadro 1 - Distribuição dos espécimes nos grupos experimentais, de acordo com a solução irrigadora e medicação intracanal.

GRUPOS	AGENTE IRRIGANTE	MEDICAÇÃO INTRACANAL
G1 (n=12)	extrato glicólico de própolis	extrato glicólico de bardana + Ca(OH)_2
G2 (n=12)	extrato glicólico da sálvia	extrato glicólico de bardana + Ca(OH)_2
G3 (n=12)	solução de clorexidina 2%	extrato glicólico de bardana + Ca(OH)_2
G4 (n=12)	solução fisiológica aprotrogênica	extrato glicólico de bardana + Ca(OH)_2

4.3.3 Coletas do conteúdo do canal radicular

Foram realizadas 4 coletas do conteúdo do canal radicular durante o tratamento: 1^a) imediatamente após a instrumentação, 2^a) após 7 dias da instrumentação, 3^a) imediatamente após o período de ação da medicação intracanal; 4^a) após 7 dias do período de ação da medicação intracanal. Todas as coletas dos canais radiculares foram realizadas da mesma forma, conforme descrito na coleta de confirmação (item 4.3.1).

Entre a coleta imediata e após 7 dias (tanto para os irrigantes como para a medicação de demora), os dentes foram

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

Para todas as coletas, foram realizados testes microbiológicos e quantificação de endotoxinas nos canais radiculares.

4.3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana – análise microbiológica

Em todas as coletas, alíquotas (100 μL) das diluições do conteúdo coletado do canal radicular foram semeadas em duplicata em placas contendo meio de cultura seletivo para cada microrganismo.

As placas foram mantidas em estufa $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, para avaliação do crescimento microbiano. A atividade antimicrobiana dos agentes irrigantes e medicação intracanal utilizados foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* em ágar Enterococcosel, ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e ágar MacConkey, respectivamente.

Os resultados foram submetidos à análise estatística ANOVA e teste de Tukey, com significância de 5%.

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

Para todas as coletas dos canais radiculares, foi realizado o teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (análise quantitativa) (cinético QCL – LAL, Cambrex Bio Science, MD, USA) (Figura 10) para verificar a neutralização de endotoxinas nos canais radiculares após os diferentes tratamentos.

O *Limulus* é constituído por um lisado dos amebócitos circulantes do caranguejo ferradura da família *Limulus polyphemus* que, quando exposto a quantidades pequenas de endotoxinas, aumenta sua opacidade bem como sua viscosidade, tornando-se um gel duro⁶³. Estes autores demonstraram que a formação do coágulo era resultado de uma reação enzimática entre a endotoxina e uma proteína coagulável presente na circulação do amebócito de *Limulus*. Assim, pelo método QCL cinético do LAL, a endotoxina da bactéria Gram-negativa catalisa a ativação de uma pré-enzima em enzima. A enzima ativada catalisa a clivagem do substrato sintético Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNa em peptídeo (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg) e p-nitroanilina (pNa), de coloração amarela. A pNa transformada durante a reação é medida fotometricamente a 405 nm, continuamente, durante o período de incubação (37°C). 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 das coletas (imediatamente após o preparo biomecânico e após 7 dias e imediatamente após a remoção da medicação e após 7 dias), foram realizadas diluições da endotoxina padrão de *E. coli* em diferentes concentrações que representaram os padrões de comparação das amostras (curva-padrão). Os testes para

cada amostra foram realizados em quadruplicata, sendo uma duplicata utilizada como controle positivo (amostra do conteúdo do canal radicular adicionada de uma quantidade conhecida de endotoxina) para verificar possíveis interferentes.

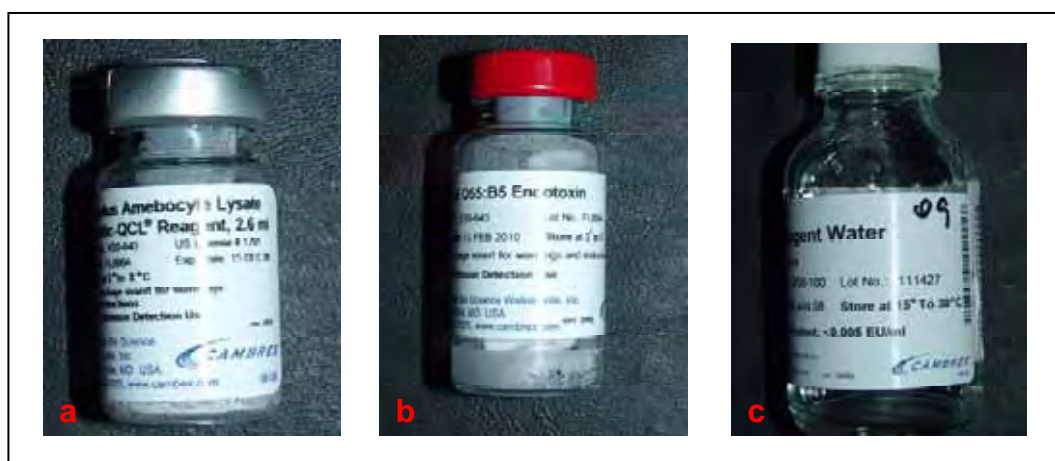


FIGURA 10 - Reagentes do teste cinético cromogênico: a) lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL); b) endotoxina padrão de *E. coli*; c) água apirogênica.

Em uma microplaca apirogênica de 96 poços (Costar Corning, New York, USA), foram adicionados 100 μ L de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas do canal radicular e os controles positivos (Figura 11). Os testes foram realizados em quadruplicata. A placa foi incubada no leitor cinético QCL (Cambrex Bio Science, MD, USA) (Figura 12) a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 min, o qual estava acoplado a um microcomputador com *software* Wink QCL específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios.



FIGURA 11 – Distribuição das amostras, em quadruplicata, em placas de 96 poços, de acordo com o preenchimento do software. Os poços marcados em amarelo representam os controles positivos das amostras.



FIGURA 12 – Incubação da placa no leitor cinético QCL acoplado ao microcomputador.

Após, foram adicionados em cada poço da placa 100 μ L do reagente cinético cromogênico do LAL, com uma multipipeta de 8 canais e ponteiros apirogênicos (Figura 13). Após o início do ensaio cinético, o *software* da leitora de microplacas monitorou, de forma contínua durante todo o ensaio, a absorvância a 405 nm em cada poço da microplaca. O leitor determinou o tempo necessário para aumentar a absorvância de cada poço a 0,2 unidades de absorvância, 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.

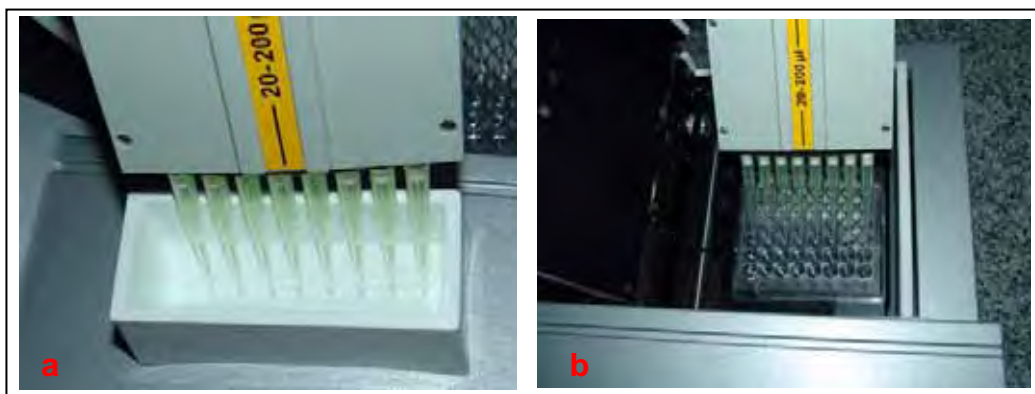


FIGURA 13 – a) Reservatório contendo substrato cromogênico ressuspendido;
b) Adição do substrato cromogênico nos poços da microplaca.

Os resultados deste teste foram avaliados estatisticamente pelo testes de Kruskal Wallis e Dunn, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Associação microbiana

No modelo experimental 1, não houve crescimento de *E. coli* e *C. albicans*, somente de *E. faecalis*. Nos modelos experimentais 2 e 3, não houve crescimento de *E. coli*. Somente no modelo experimental 4, houve crescimento dos três microrganismos (*E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli*) após período total de contaminação de 28 dias.

5.2 Análise microbiológica

Após coleta de confirmação microbiana, foi observado crescimento de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* em todos os espécimes (Figura 14). Os valores médios de log de UFC/mL obtidos em cada espécime dos grupos experimentais, na coleta de confirmação, após preparo biomecânico e medicação intracanal, estão demonstrados nas Tabelas 1 a 4.

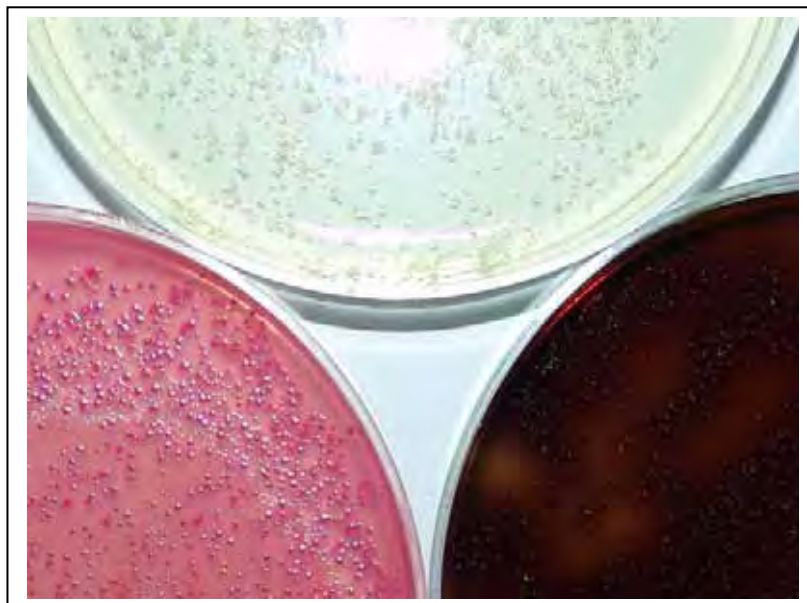


FIGURA 14 - Crescimento microbiano (*E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli*) na coleta de confirmação de um dos espécimes do grupo G3 (diluição 10^{-2}).

Tabela 1 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* obtidos por cada espécime do grupo G1 (própolis, n=12) em todas as coletas*

	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
<i>Enterococcus faecalis</i>					
1	6,431	0,00	0,00	0,00	0,00
2	6,204	0,00	0,00	0,00	0,00
3	5,602	0,00	0,00	0,00	0,00
4	6,380	0,00	0,00	0,00	0,00
5	6,113	0,00	0,00	0,00	0,00
6	5,623	0,00	0,00	0,00	0,00
7	5,255	0,00	0,00	0,00	0,00
8	5,740	0,00	0,00	0,00	0,00
9	6,397	0,00	0,00	0,00	0,00
10	5,732	0,00	0,00	0,00	0,00
11	5,518	0,00	0,00	0,00	0,00
12	6	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Candida albicans</i>					
1	2,60	0,00	0,00	0,00	0,00
2	5,643	0,00	0,00	0,00	0,00
3	3,230	0,00	0,00	0,00	0,00
4	6	0,00	0,00	0,00	0,00
5	4,857	0,00	0,00	0,00	0,00
6	4,963	0,00	0,00	0,00	0,00
7	2	0,00	0,00	0,00	0,00
8	5,778	0,00	0,00	0,00	0,00
9	5,799	0,00	0,00	0,00	0,00
10	3,556	0,00	0,00	0,00	0,00
11	5,505	0,00	0,00	0,00	0,00
12	5,763	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Escherichia coli</i>					
1	3,716	0,00	0,00	0,00	0,00
2	5,401	0,00	0,00	0,00	0,00
3	5,531	0,00	0,00	0,00	0,00
4	6,326	0,00	0,00	0,00	0,00
5	6,465	0,00	0,00	0,00	0,00
6	5,260	0,00	0,00	0,00	0,00
7	3,963	0,00	0,00	0,00	0,00
8	6,235	0,00	0,00	0,00	0,00
9	4,637	0,00	0,00	0,00	0,00
10	6,372	0,00	0,00	0,00	0,00
11	5,903	0,00	0,00	0,00	0,00
12	4,531	0,00	0,00	0,00	0,00

***1ª coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª coleta:** imediatamente após remoção da MIC; **4ª coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

Tabela 2 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* obtidos por cada espécime do grupo G2 (sálvia, n=12) em todas as coletas*

	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
	<i>Enterococcus faecalis</i>				
1	5,763	3,623	4,546	0,00	0,00
2	5,698	4,170	4,643	0,00	0,00
3	6,380	3,113	4,079	0,00	0,00
4	6,296	3,778	4,619	0,00	0,00
5	6,133	4,017	4,702	0,00	0,00
6	6,792	4,318	4,850	0,00	0,00
7	5,722	3,447	5,401	0,00	0,00
8	6,352	2,954	4,494	0,00	0,00
9	5,444	3,556	4,546	0,00	0,00
10	5,505	3,176	4,447	0,00	0,00
11	5,944	3,041	4,741	0,00	0,00
12	6,544	3,880	4,593	0,00	0,00
	<i>Candida albicans</i>				
1	4,763	0,00	4,260	0,00	0,00
2	5,434	2,944	4,716	0,00	0,00
3	5,431	3,681	4,695	0,00	0,00
4	5,651	3,647	3,949	0,00	0,00
5	3,903	0,00	4,332	0,00	0,00
6	3,477	2,301	4,167	0,00	0,00
7	4,812	0,00	3,414	0,00	0,00
8	5,447	0,00	3,531	0,00	0,00
9	5,394	0,00	4,660	0,00	0,00
10	5,673	0,00	3,397	0,00	0,00
11	5,651	0,00	4,579	0,00	0,00
12	5,643	0,00	4,276	0,00	0,00
	<i>Escherichia coli</i>				
1	5,666	0,00	4,089	0,00	0,00
2	5,698	0,00	4,411	0,00	0,00
3	5,792	2,698	5,414	0,00	0,00
4	5,584	0,00	4,511	0,00	0,00
5	4,903	0,00	3,079	0,00	0,00
6	5,146	3,204	4,164	0,00	0,00
7	6,350	0,00	3,939	0,00	0,00
8	5,477	0,00	3,732	0,00	0,00
9	6,021	0,00	3,146	0,00	0,00
10	6,401	2,361	5,556	0,00	0,00
11	5,707	2,397	4,060	0,00	0,00
12	5,695	2,643	4,408	0,00	0,00

*1ª coleta: imediatamente após instrumentação; 2ª coleta: após 7 dias da instrumentação; 3ª coleta: imediatamente após remoção da MIC; 4ª coleta: após 7 dias da remoção da MIC.

Tabela 3 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* obtidos por cada espécime do grupo G3 (clorexidina, n=12) em todas as coletas*

	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
<i>Enterococcus faecalis</i>					
1	6,602	0,00	0,00	0,00	0,00
2	6,301	0,00	0,00	0,00	0,00
3	7,255	0,00	0,00	0,00	0,00
4	7,107	0,00	0,00	0,00	0,00
5	6,204	0,00	0,00	0,00	0,00
6	6,662	0,00	0,00	0,00	0,00
7	5,380	0,00	0,00	0,00	0,00
8	7,176	0,00	0,00	0,00	0,00
9	5,602	0,00	0,00	0,00	0,00
10	6,740	0,00	0,00	0,00	0,00
11	5,342	0,00	0,00	0,00	0,00
12	6,322	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Candida albicans</i>					
1	5,623	0,00	0,00	0,00	0,00
2	6,193	0,00	0,00	0,00	0,00
3	4,857	0,00	0,00	0,00	0,00
4	4,064	0,00	0,00	0,00	0,00
5	6,017	0,00	0,00	0,00	0,00
6	5,806	0,00	0,00	0,00	0,00
7	4,235	0,00	0,00	0,00	0,00
8	4,515	0,00	0,00	0,00	0,00
9	4,133	0,00	0,00	0,00	0,00
10	4,049	0,00	0,00	0,00	0,00
11	5,880	0,00	0,00	0,00	0,00
12	6,107	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Escherichia coli</i>					
1	6,079	0,00	0,00	0,00	0,00
2	6,681	0,00	0,00	0,00	0,00
3	6,735	0,00	0,00	0,00	0,00
4	5,357	0,00	0,00	0,00	0,00
5	4,309	0,00	0,00	0,00	0,00
6	4,551	0,00	0,00	0,00	0,00
7	4,401	0,00	0,00	0,00	0,00
8	6,662	0,00	0,00	0,00	0,00
9	6,944	0,00	0,00	0,00	0,00
10	6,924	0,00	0,00	0,00	0,00
11	4,681	0,00	0,00	0,00	0,00
12	6,079	0,00	0,00	0,00	0,00

***1ª coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª coleta:** imediatamente após remoção da MIC; **4ª coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

Tabela 4 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* obtidos por cada espécime do grupo G4 (controle – soro fisiológico, n=12) em todas as coletas*.

	Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
<i>Enterococcus faecalis</i>					
1	6,477	4,477	4,494	0,00	0,00
2	5,691	4,380	4,380	0,00	0,00
3	5,593	4,342	4,702	0,00	0,00
4	6,702	4,499	4,301	0,00	0,00
5	6,255	5,511	4,158	0,00	0,00
6	6,745	4,357	5,711	0,00	0,00
7	6,688	4,553	4,593	0,00	0,00
8	6,725	4,513	4,695	0,00	0,00
9	6,447	5,460	4,944	0,00	0,00
10	6,342	4,459	4,546	0,00	0,00
11	5,440	4,394	4,885	0,00	0,00
12	6,688	4,551	4,732	0,00	0,00
<i>Candida albicans</i>					
1	4,414	3,505	4,217	0,00	0,00
2	5,482	3,963	4,416	0,00	0,00
3	5,702	4,643	4,350	0,00	0,00
4	4,591	3,531	2,954	0,00	0,00
5	5,283	3,826	4,127	0,00	0,00
6	5,324	3,903	4,579	0,00	0,00
7	5,597	3,591	4,575	0,00	0,00
8	4,681	4,515	4,558	0,00	0,00
9	5,017	3,041	4,591	0,00	0,00
10	5,093	4,093	4,575	0,00	0,00
11	4,602	3,763	4,033	0,00	0,00
12	5,346	3,982	4,434	0,00	0,00
<i>Escherichia coli</i>					
1	5,841	3,511	5,131	0,00	0,00
2	5,688	4,735	4,352	0,00	0,00
3	6,357	4,093	4,170	0,00	0,00
4	6,494	4,107	5,100	0,00	0,00
5	5,691	4,832	4,447	0,00	0,00
6	6,383	4,792	5,334	0,00	0,00
7	6,290	4,411	4,096	0,00	0,00
8	5,916	4,752	4,167	0,00	0,00
9	5,511	4,411	5,355	0,00	0,00
10	6,096	4,326	4,173	0,00	0,00
11	6,561	4,494	3,939	0,00	0,00
12	6,877	4,712	4,243	0,00	0,00

*1ª coleta: imediatamente após instrumentação; 2ª coleta: após 7 dias da instrumentação; 3ª coleta: imediatamente após remoção da MIC; 4ª coleta: após 7 dias da remoção da MIC.

Os valores médios de UFC/mL (log10) de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* obtidos por cada grupo na coleta de confirmação, os

desvios-padrão e a formação de grupos homogêneos estão apresentados na Tabela 5 e representados na Figura 15.

Tabela 5 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* ± desvio-padrão obtidos por cada grupo experimental (n=12) na coleta de confirmação e formação de grupos homogêneos*

	Média	Desvio-padrão	Grupos homogêneos*
<i>Enterococcus faecalis</i>			
G1	5,916	0,391	A
G2	6,047	0,431	A
G3	6,391	0,668	A
G4	6,316	0,477	A
<i>Candida albicans</i>			
G1	4,641	1,412	A
G2	5,106	0,733	A
G3	5,123	0,888	A
G4	5,094	0,432	A
<i>Escherichia coli</i>			
G1	5,316	0,960	A
G2	5,703	0,429	A
G3	5,783	1,057	A
G4	6,142	0,417	A

G1: própolis; G2: sálvia; G3: clorexidina; G4: soro (controle);

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Após análise estatística, pode-se verificar que não houve diferença significativa na coleta de confirmação entre os grupos para os três microrganismos avaliados ($p > 0,05$).

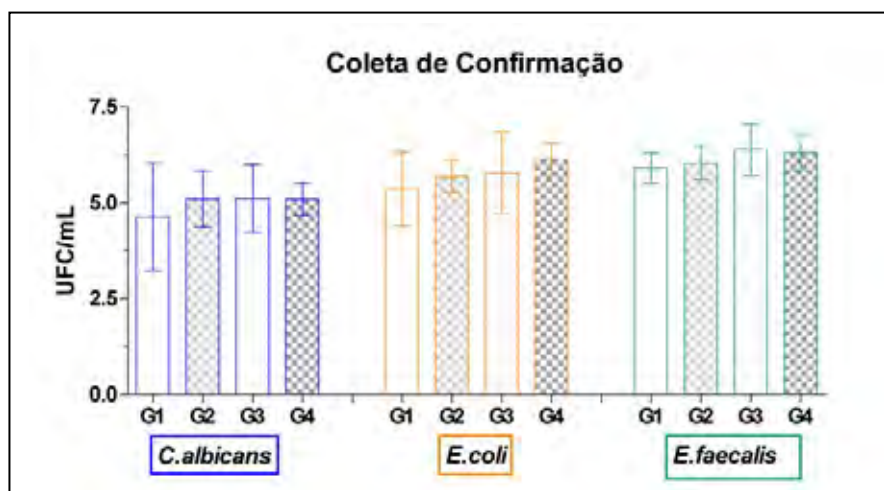


FIGURA 15 – Representação gráfica dos valores médios \pm desvios-padrão de UFC/mL de cada microrganismo obtidos pelos grupos na coleta de confirmação.

Os valores médios de UFC/mL (\log_{10}) de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* obtidos por cada grupo na 1ª coleta imediatamente após instrumentação, os desvios-padrão e a formação de grupos homogêneos estão apresentados na Tabela 6 e representados na Figura 16.

Tabela 6 – Valores médios de UFC/mL (\log_{10}) de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* \pm desvio-padrão obtidos por cada grupo experimental ($n=12$) na 1ª coleta após instrumentação e formação de grupos homogêneos*

	Média	Desvio-padrão	Grupos homogêneos*	
<i>Enterococcus faecalis</i>				
G1	0,00	0,00	A	
G2	3,589	0,45		B
G3	0,00	0,00	A	
G4	4,625	0,40		C
<i>Candida albicans</i>				
G1	0,00	0,00	A	
G2	1,05	1,59		B
G3	0,00	0,00	A	
G4	3,863	0,43		C
<i>Escherichia coli</i>				
G1	0,00	0,00	A	
G2	1,11	1,39		B
G3	0,00	0,00	A	
G4	4,431	0,387		C

G1: própolis; G2: sálvia; G3: clorexidina; G4: soro (controle);

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

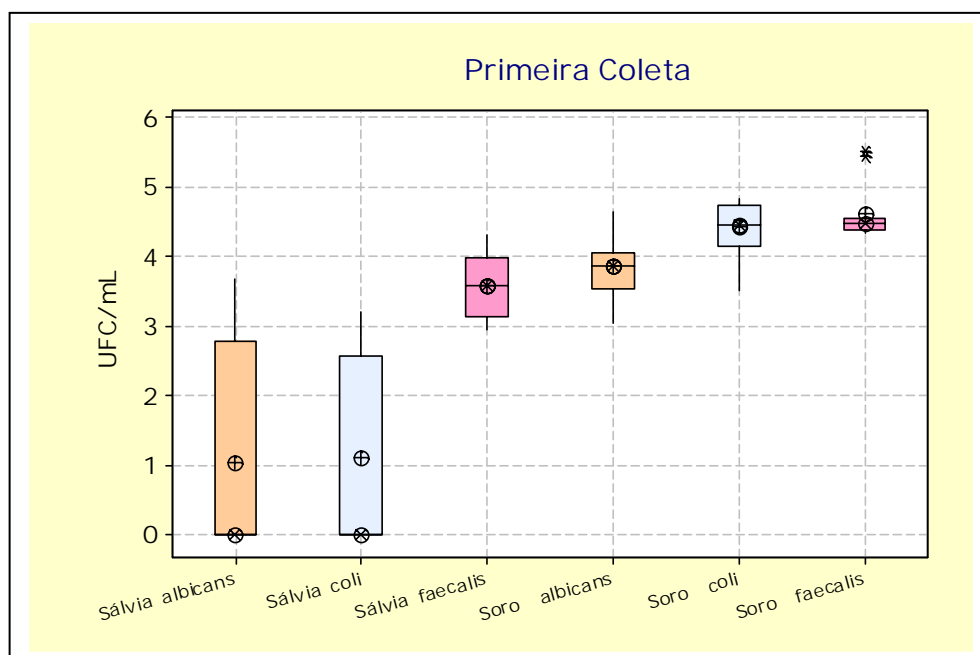


FIGURA 16– Representação gráfica dos valores médios de UFC/mL (log10) de cada microrganismo obtidos pelos grupos sálvia (G2) e controle (G4) após a primeira coleta da instrumentação.

Após análise dos resultados, pode-se verificar que no grupo G1 (extrato glicólico de própolis) e no grupo G3 (solução de clorexidina) houve ausência de crescimento microbiano (*E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli*) na coleta imediatamente após instrumentação, sendo semelhantes entre si ($p > 0,05$) e diferentes dos demais grupos. O grupo G2 (extrato glicólico de sálvia) apresentou valores intermediários de UFC/mL para os três microrganismos avaliados, com valores significativamente maiores que os grupos G1 (própolis) e G3 (clorexidina) ($p < 0,05$) e menores que o grupo controle (G4) ($p < 0,05$). O grupo G4 apresentou os maiores valores de UFC/mL para todos os microrganismos, sendo diferente de todos os grupos experimentais ($p < 0,05$).

Os valores médios de UFC/mL (log10) de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* obtidos por cada grupo na 2ª coleta após instrumentação, os desvios-padrão e a formação de grupos homogêneos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* ± desvio-padrão obtidos por cada grupo experimental (n=12) na 2ª coleta após instrumentação e formação de grupos homogêneos*

	Média	Desvio-padrão	Grupos homogêneos*	
<i>Enterococcus faecalis</i>				
G1	0,00	0,00	A	
G2	4,638	0,306		B
G3	0,00	0,00	A	
G4	4,678	0,398		B
<i>Candida albicans</i>				
G1	0,00	0,00	A	
G2	4,165	0,491		B
G3	0,00	0,00	A	
G4	4,284	0,460		B
<i>Escherichia coli</i>				
G1	0,00	0,00	A	
G2	4,209	0,750		B
G3	0,00	0,00	A	
G4	4,542	0,527		B

G1: própolis; G2: sálvia; G3: clorexidina; G4: soro (controle);

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Após análise dos resultados, pode-se verificar que no grupo G1 (extrato glicólico de própolis) e no grupo G3 (solução de clorexidina) também houve ausência de crescimento microbiano (*E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli*) na 2ª coleta após instrumentação, sendo semelhantes entre si ($p > 0,05$) e diferentes dos demais grupos ($p < 0,05$). No grupo G2 (extrato glicólico de sálvia), foi observado aumento nas contagens de UFC/mL para os três microrganismos avaliados, sendo estes resultados estatisticamente semelhantes ao grupo controle G4 ($p > 0,05$) e diferentes dos grupos G1 (própolis) e G3 (clorexidina).

Com relação à medicação intracanal, foi observada ausência de crescimento microbiano em todos os grupos experimentais.

5.3 Quantificação de endotoxinas

Os valores médios de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL) obtidos em cada espécime dos grupos experimentais, após preparo biomecânico e medicação intracanal, estão demonstrados nas Tabelas 8 a 11.

Tabela 8 – Valores médios obtidos da quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL) em cada espécime do grupo G1* (própolis, n=12) nas 4 coletas.

	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
1	468	3100	13,7	12,8
2	160	2930	19,4	15,9
3	1560	8450	29,5	22,5
4	356	3490	15,1	21,4
5	2070	1110	41,8	19,5
6	827	3480	17,5	8,77
7	277	1680	9,89	11,4
8	923	2640	13,6	16,3
9	857	2380	10,2	20,8
10	806	1260	12,3	15,6
11	363	1350	12,7	14,2
12	354	1250	11,2	14,6

***1ª coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª coleta:** imediatamente após remoção da MIC; **4ª coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

Tabela 9 – Valores médios obtidos da quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL) em cada espécime do grupo G2* (sálvia, n=12) nas 4 coletas.

	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
1	603	3040	8,75	11,4
2	1050	13700	17,70	14,0
3	3540	17700	36,60	14,8
4	685	12800	25,70	13,6
5	1590	3580	20,80	12,7
6	1370	6130	14,50	19,7
7	880	1320	22,5	27,9
8	330	2770	12,80	19,5
9	448	2370	17,1	18,4
10	756	20400	17,1	10,3
11	1810	11900	35,7	31,2
12	336	7920	68,0	11,7

***1ª coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª coleta:** imediatamente após remoção da MIC; **4ª coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

Tabela 10 – Valores médios obtidos da quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL) em cada espécime do grupo G3* (clorexidina, n=12) nas 4 coletas.

	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
1	525	3080	20,0	11,7
2	429	2210	11,6	9,75
3	338	4190	13,4	8,22
4	1150	6850	11,0	25,8
5	570	3680	12,7	22,0
6	445	4470	9,77	10,6
7	213	1600	10,3	16,7
8	599	4450	11,1	15,3
9	495	7570	9,70	15,6
10	332	1320	12,5	14,9
11	1030	3530	16,3	12,9
12	279	2850	13,7	16,8

***1ª coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª coleta:** imediatamente após remoção da MIC; **4ª coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

Tabela 11 – Valores médios obtidos da quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL) em cada espécime do grupo G4* (controle - soro, n=12) nas 4 coletas.

	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
1	7780	10700	16,6	14,3
2	1490	9880	73,3	14,8
3	1150	4070	6,74	38,2
4	568	4836	8,03	16,0
5	1340	1080	6,96	18,9
6	880	6760	5,95	15,0
7	1760	7830	8,14	14,6
8	3470	14740	10,6	29,3
9	11000	14100	10,4	15,8
10	769	27300	18,5	15,5
11	623	3620	11,6	22,4
12	1200	6830	8,44	53,7

*1ª coleta: imediatamente após instrumentação; 2ª coleta: após 7 dias da instrumentação; 3ª coleta: imediatamente após remoção da MIC; 4ª coleta: após 7 dias da remoção da MIC.

Os valores médios de endotoxinas (EU/mL), desvios-padrão, posto médio e formação de grupos homogêneos obtidos por cada grupo nas 4 coletas estão apresentados nas Tabelas 12 a 15.

Tabela 12 – Valores médios de endotoxinas (EU/mL), desvios-padrão, posto médio e formação de grupos homogêneos obtidos por cada grupo na 1ª coleta*

	Média	Desvio-padrão	Posto médio	Grupos homogêneos	
G1	752	569	20,417	A	B
G2	1117	902	27,042	A	B
G3	533,8	285,9	15,292		B
G4	2669	3303	35,250	A	

G1: própolis; G2: sálvia; G3: clorexidina; G4: soro (controle);

*1ª coleta: imediatamente após instrumentação.

Analisando os resultados, pode-se verificar que os grupos G1 (própolis) e G2 (sálvia) apresentaram valores intermediários de endotoxinas, sendo semelhantes aos grupos G3 (clorexidina) e G4 (controle, soro) ($p > 0,05$). O grupo G3 (clorexidina) apresentou valores

semelhantes de endotoxinas aos grupos G1 e G2 ($p>0,05$), entretanto, foi estatisticamente menor que o grupo controle G4 ($p<0,05$). O grupo G4 (controle) apresentou os maiores valores médios, sendo semelhante aos grupos G1 e G2 ($p>0,05$) e diferente de G3 ($p<0,05$).

Tabela 13 – Valores médios de endotoxinas (EU/mL), desvios-padrão, posto médio e formação de grupos homogêneos obtidos por cada grupo na 2ª coleta*

	Média	Desvio-padrão	Posto médio	Grupos homogêneos	
G1	2760	2003	13,667		B
G2	8636	6502	29,792	A	
G3	3817	1896	21,375	A	B
G4	9312	7011	33,167	A	

G1: própolis; G2: sálvia; G3: clorexidina; G4: soro (controle);

* **2ª coleta:** após 7 dias da instrumentação.

Analisando os resultados, pode-se verificar que houve aumento de endotoxinas em todos os grupos em relação à primeira coleta após instrumentação. O grupo G1 (própolis) apresentou o menor valor médio de endotoxinas, sendo semelhante ao grupo G3 (clorexidina) ($p>0,05$) e diferente dos grupos G2 (sálvia) e G4 (controle, soro) ($p<0,05$). O grupo G3 (clorexidina) apresentou valores intermediários de endotoxinas, sendo semelhante a todos os grupos ($p>0,05$). Os grupos G2 (sálvia) e G4 (controle) apresentaram os maiores valores de endotoxinas, sendo semelhantes entre si, semelhantes ao grupo G3 ($p>0,05$) e diferentes do grupo G1 ($p<0,05$).

Tabela 14 – Valores médios de endotoxinas (EU/mL), desvios-padrão, posto médio e formação de grupos homogêneos obtidos por cada grupo na 3ª coleta*

	Média	Desvio-padrão	Posto médio	Grupos homogêneos	
G1	17,24	9,41	21,167	A	B
G2	24,77	16,02	35,167	A	
G3	12,673	2,981	20,375	A	B
G4	15,44	18,63	15,292		B

G1: própolis; G2: sálvia; G3: clorexidina; G4: soro (controle);

*3ª coleta: imediatamente após remoção da MIC.

Após a remoção da medicação intracanal, pode-se verificar significativa redução de endotoxinas em todos os grupos avaliados. O grupo G2 (sálvia/bardana + hidróxido de cálcio) apresentou os maiores valores, sendo semelhantes aos grupos G1 e G3 ($p > 0,05$).

Tabela 15 – Valores médios de endotoxinas (EU/mL), desvios-padrão, posto médio e formação de grupos homogêneos obtidos por cada grupo na 4ª coleta*

	média	desvio-padrão	posto médio	grupos homogêneos
G1	16,15	4,22	24,167	A
G2	17,10	6,63	22,583	A
G3	15,02	5,05	20,417	A
G4	22,38	12,29	30,833	A

G1: própolis; G2: sálvia; G3: clorexidina; G4: soro (controle);

*4ª coleta: após 7 dias da remoção da MIC.

Analisando os resultados, pode-se verificar que após 7 dias da remoção da medicação intracanal, todos os grupos continuaram apresentando baixos valores de endotoxinas, sem diferença estatística entre eles ($p > 0,05$).

Os valores de endotoxinas (EU/mL) obtidos pelos grupos nas 4 coletas estão representados pelos gráficos de pontos nas Figuras 17 e 18.

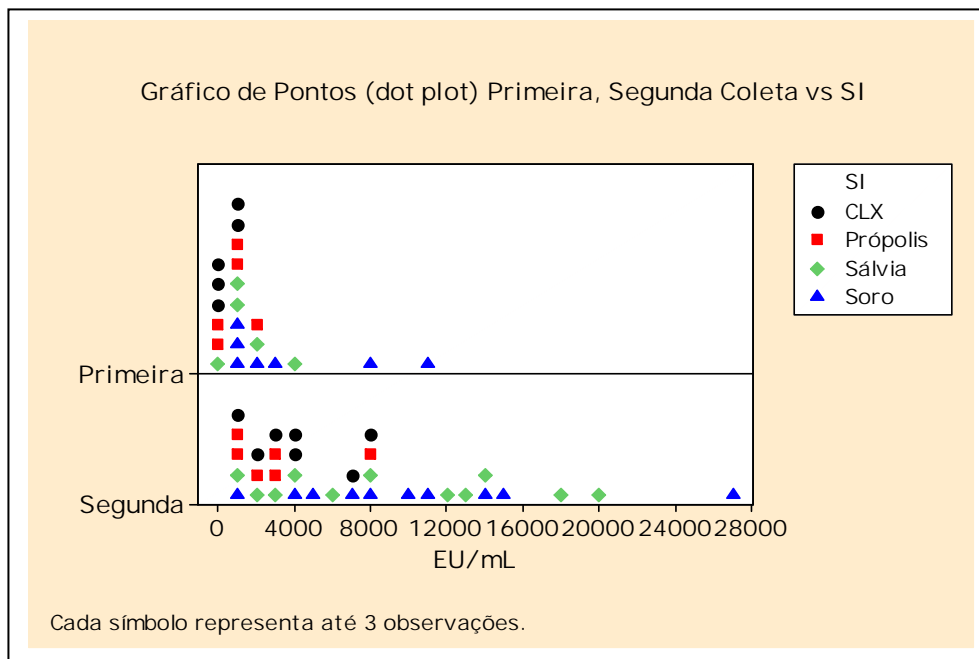


FIGURA 17– Representação gráfica dos valores de EU/mL obtidos pelos grupos após a primeira e segunda coletas.

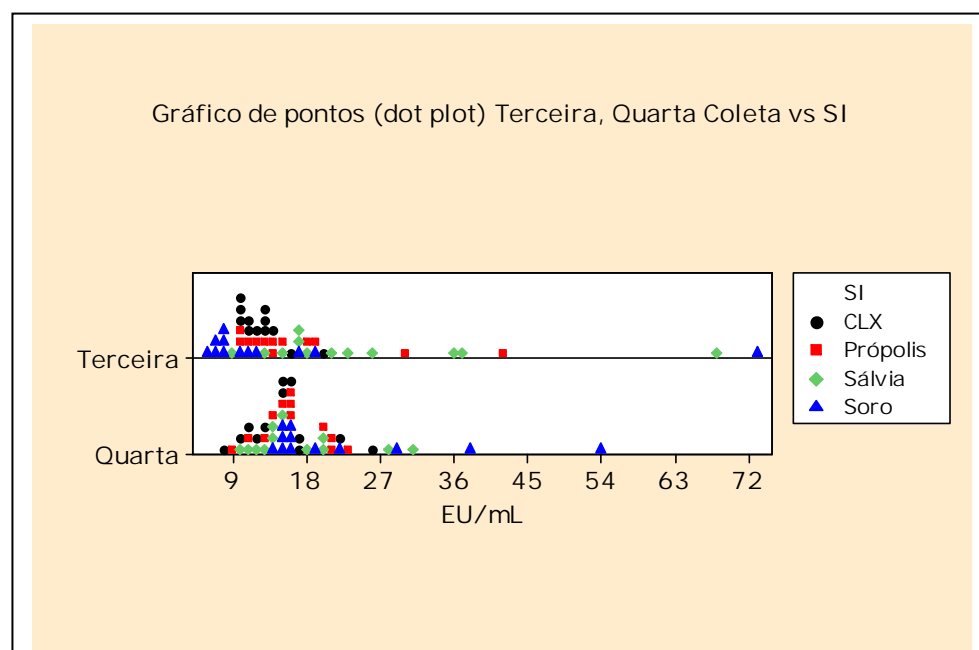


FIGURA 18– Representação gráfica dos valores de EU/mL obtidos pelos grupos após a terceira e quarta coletas.

6 DISCUSSÃO

6.1 Da metodologia

De acordo com Oliveira⁸², tem-se verificado que a utilização de dentes humanos em pesquisas *in vitro* enfrenta dificuldades em relação à questão ética, à dificuldade de obtenção dos mesmos e à padronização da amostra. Este estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da FOSJC (Anexo A), sendo que os dentes utilizados nesta pesquisa foram extraídos em clínicas odontológicas particulares, por motivos diversos e com prévia autorização dos pacientes por meio do consentimento livre e esclarecido. Com relação à padronização da amostra, as coroas foram seccionadas padronizando o tamanho da raiz em 16 mm⁶⁷ e os espécimes foram inicialmente instrumentados até lima Kerr nº 30 para padronizar o diâmetro inicial do canal radicular⁸¹. Foi realizada vedação da região apical com resina composta fotopolimerizável e impermeabilização externa da raiz com adesivo apóxi para impossibilitar a saída dos microrganismos e suas endotoxinas, e também dos agentes irrigantes e medicação intracanal⁸¹.

Para eliminar endotoxinas pré-existentes, os espécimes e todos os materiais utilizados na pesquisa (limas, bolinhas de algodão, ponteiros, microtubos, gaze, luvas) foram submetidos à radiação gama cobalto 60⁸¹. Em 1983, Csako et al.¹⁸ demonstraram que a radiação tem vários efeitos sobre LPS, incluindo destruição da porção polissacarídica e alteração do lipídio A, principal responsável pela toxicidade da endotoxina (LPS). A radiação gama cobalto 60 foi realizada seguindo protocolo (20 Kgy / 6 h) da empresa EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiação).

A distribuição dos espécimes em placas de cultura de células e fixação com resina acrílica foi realizada de acordo com Oliveira et al.⁷⁹ para facilitar a instrumentação dos espécimes e diminuir o risco de contaminação.

O tempo de contaminação foi estabelecido em 28 dias para *E. coli*, pois de acordo com as tentativas de associação, foi observada a necessidade de inocular *E. coli* antes dos demais microrganismos. De acordo com Menezes et al.⁷², o tempo necessário para *C. albicans* e *E. faecalis* penetrar em profundidade nos túbulos dentinários é de 21 dias (observado em microscopia eletrônica de varredura). Com isso, para associação microbiana estabeleceu-se o seguinte período de contaminação: 28 dias para *E. coli* e 21 dias para *C. albicans* e *E. faecalis*.

C. albicans e *E. faecalis* foram selecionados neste estudo, pois são microrganismos freqüentemente presentes nas infecções persistentes dos canais radiculares^{37,80,91}. *E. coli* não é uma bactéria comumente encontrada no interior dos canais radiculares com polpa necrosada, embora Peciulienė et al.⁹¹ tenha verificado a presença de *E. coli* em canais radiculares com falhas no tratamento endodôntico. No entanto, a inclusão de *E. coli* neste estudo foi, principalmente, para verificar a ação dos agentes irrigantes e medicação intracanal sobre endotoxinas, pois embora *E. coli* não seja uma bactéria frequente nas infecções endodônticas, sua endotoxina apresenta a estrutura básica do componente lipídico, que representa o centro ativo responsável pelas propriedades tóxicas do LPS¹⁴⁴. Além disso, a endotoxina de *E. coli* é uma endotoxina padrão, utilizada na maioria dos trabalhos relatados na literatura^{6,50,81,82,93,111,131}. As endotoxinas são lipopolissacarídeos que consistem de três partes distintas: o componente lipídico apolar (lipídio A), um corpo oligossacarídico e outro heteropolissacarídico, representado pelo antígeno O de superfície⁹³. O lipídio A é o principal responsável pela

atividade endotóxica do LPS e sua estrutura primária é bem conservada entre as diferentes espécies de bactérias Gram-negativas¹⁴⁴. Desta forma, pode-se verificar se os agentes irrigantes e medicação intracanal apresentam capacidade de destruir a bactéria Gram-negativa e também de neutralizar suas endotoxinas liberadas.

Para detectar a presença de endotoxinas nos canais radiculares, foi utilizado o teste cinético cromogênico do lisado de amebócito de *Limulus* (LAL), pois este é o método mais sensível, com capacidade para detectar a partir de 0,005 unidades de endotoxinas. Como este teste é quantitativo, possibilita maior precisão na determinação da quantidade de endotoxina presente nos canais radiculares. Assim, conseqüentemente, também permite verificar de forma mais confiável o agente irrigante ou medicação intracanal mais efetivo sobre LPS. O método cromogênico do LAL foi usado por diversos autores^{45,54,55,136}. Existem no mercado outros métodos para detectar endotoxina, como o de geleificação do LAL, usado em pesquisas anteriores^{81,82}, que também apresenta importante sensibilidade, entretanto, é um teste semiquantitativo, que não permite quantificação precisa de endotoxinas.

O teste do LAL pode sofrer interferência de algumas substâncias, promovendo resultados falso negativos ou falso positivos. Para identificar possíveis interferentes da reação nas amostras coletadas do canal radicular, o teste foi realizado em quadruplicata para cada amostra, sendo que uma duplicata foi usada como controle positivo, ou seja, foi contaminada com uma concentração conhecida de endotoxina padrão de *E. coli*, de modo que o resultado deste controle positivo indicava se a amostra possuía ou não interferentes. Uma interferência possível é alteração do pH, para tanto, este teste possui uma solução tampão apirogênica, que pode ser utilizada nas amostras com pH muito básico ou muito ácido. No presente estudo, todas as amostras

apresentaram resultados confiáveis, pois os controles positivos não apresentaram interferentes.

6.2 Dos resultados

6.2.1 Análise microbiológica

Em todos os grupos foi observada significativa redução dos três microrganismos entre a coleta de confirmação e a primeira coleta após instrumentação. Estes resultados demonstraram que a instrumentação associada com irrigação e aspiração removeu grande quantidade dos microrganismos presentes nos canais radiculares, independente do irrigante utilizado, inclusive solução fisiológica. Estes resultados concordaram com o estudo de Byström e Sundqvist¹⁵. No entanto, essa redução microbiana obtida pelo preparo biomecânico não é suficiente, pois os microrganismos restantes podem se proliferar no interior dos túbulos dentinários e na luz do canal radicular, de modo que torna-se necessária a utilização de substâncias irrigadoras com atividade antimicrobiana, a fim de eliminar, se possível completamente, os microrganismos e seus produtos presentes nos canais radiculares.

No presente estudo, o extrato glicólico de própolis foi efetivo sobre os três microrganismos avaliados (*E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli*) tanto na primeira como na segunda coleta após instrumentação. Estes resultados concordaram com diversos estudos que avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes extratos de própolis, principalmente extrato alcoólico^{29,58,66,102}. De acordo com Ferreira et al.²⁹, a própolis brasileira é caracterizada por uma baixa concentração de flavonóides e

ésteres de ácido fenólicos, que são compostos antimicrobianos típicos de regiões temperadas, por outro lado, possui alta concentração de ácido dihidrocinâmico, acetofenones fenilados e terpenóides específicos, os quais também apresentam atividade antimicrobiana. Ferreira et al.²⁹ verificaram em suas amostras de própolis altos níveis de ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico, de modo que os autores sugeriram que este deva ser o componente antimicrobiano principal da própolis brasileira. De acordo com o fabricante (Apis flora), o extrato glicólico de própolis utilizado neste estudo apresentou 5,63 mg/mL de flavonóides totais e 2,07% de fenóis totais, dentre outros compostos. A própolis, em geral, é composta por 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de várias outras substâncias, incluindo restos orgânicos dependendo do local e tempo da coleta. Assim, os componentes da própolis variam muito de acordo com clima, estação, local e ano. Na presente pesquisa foi avaliada a ação antimicrobiana do extrato glicólico de própolis como um todo, e pode-se verificar que este extrato, produzido em Julho de 2007 pela empresa Apis Flora (Lote:006/07) apresentou importante efeito antimicrobiano sobre microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos em canais radiculares, demonstrando inclusive importante efeito residual.

Estes resultados concordaram com o estudo de Koo et al.⁵⁸, que, utilizando diferente metodologia (método de difusão em ágar), verificaram que o extrato alcoólico de própolis apresentou importante atividade antimicrobiana sobre vários microrganismos, incluindo *C. albicans*, *E. faecalis*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *Prevotella denticola*, *A. naeslundii* e *S. aureus*. Em 2006, Onçaag et al.⁸⁵ verificaram que a própolis apresentou boa atividade antibacteriana sobre *E. faecalis* em canais radiculares, sugerindo seu uso como um medicamento intracanal alternativo. Com base nos resultados do atual estudo, o extrato glicólico de própolis tem potencial para ser utilizado como irrigante dos canais

radiculares, demonstrando importante atividade sobre microrganismos presentes em infecções endodônticas persistentes.

Os resultados obtidos com o extrato de própolis foram semelhantes aos da clorexidina 2%. Na presente pesquisa, a clorexidina apresentou efeito antimicrobiano sobre os três microrganismos avaliados e também apresentou efeito residual, concordando com os inúmeros trabalhos relatados na literatura^{8,20,25,34,62,72,98,108,148}. De acordo com Vianna et al.¹³⁷, o efeito antimicrobiano da clorexidina é devido a sua capacidade de se ligar a regiões eletronegativas da bactéria e de atacar a membrana citoplasmática bacteriana causando prejuízos na bicamada de fosfolípidios, perda do equilíbrio osmótico e liberação do material intracelular. Além disso, a clorexidina tem capacidade de se adsorver aos tecidos duros dentários com graduada e prolongada liberação em níveis terapêuticos, promovendo efeito residual no sistema de canais radiculares²⁰.

Já com relação a sálvia, pode-se verificar no presente estudo que o extrato glicólico de sálvia apresentou atividade antimicrobiana significativamente menor que a própolis e clorexidina. Por outro lado, apresentou efeito antimicrobiano superior ao grupo controle (soro fisiológico), principalmente sobre *E. coli* e *C. albicans*, apresentando ausência de crescimento microbiano em 58,3% e 66,7% dos espécimes, respectivamente, na primeira coleta após instrumentação. Na segunda coleta, verificou-se aumento de crescimento microbiano em todos os espécimes, demonstrando ausência de efeito residual. Estes resultados discordaram de vários trabalhos relatados na literatura, entretanto, estes estudos verificaram a ação antimicrobiana de óleos essenciais de sálvia. Pereira et al.⁹² demonstraram que o óleo essencial de *Salvia officinalis* apresentou ação inibitória superior a outros fitoterápicos, tendo eficácia de 100% em espécies de *Enterobacter* e *Klebsiella*, 96% em *Escherichia coli*, 83% em *Proteus mirabilis* e 75% em *Morganella morganii*. Ozcan et al.⁸⁸

relataram que vários óleos essenciais, incluindo de sálvia, foram efetivos contra várias espécies de *Bacillus*. Já em 2007, Yousefzadi et al.¹⁴⁶ verificaram que os óleos essenciais de diferentes espécies de sálvia (*S. multicaulis*, *S. sclarea* e *S. verticillata*) apresentaram moderada a alta atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumulis*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*), exceto para *P. aeruginosa* que foi totalmente resistente. Por outro lado, os óleos apresentaram fraca ou nenhuma atividade antifúngica (*C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*), sendo que somente o óleo de *S. multicaulis* demonstrou atividade sobre *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Em um estudo paralelo ao apresentado, o óleo essencial de *Sálvia sclarea* apresentou efetiva ação sobre *E. coli*, quando usado como agente irrigante em canais radiculares, com ausência de crescimento antimicrobiano na primeira coleta após instrumentação em todos os 30 espécimes avaliados. Assim, pode-se verificar que as propriedades antimicrobianas do óleo essencial são parcialmente perdidas quando da utilização de extratos. Com isso, seria interessante avaliar extratos com maior concentração do princípio ativo. Na presente pesquisa, o extrato glicólico de sálvia utilizado estava na concentração de 40%.

Com relação à medicação intracanal, a pasta de extrato glicólico de bardana com hidróxido de cálcio demonstrou efetiva ação antimicrobiana sobre *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli*, com ausência de crescimento microbiano em todos os espécimes, mesmo após sete dias da remoção da medicação, o que demonstrou também que a medicação teve ação no sistema de canais radiculares atuando em profundidade nos túbulos dentinários, com importante efeito residual. A literatura tem demonstrado que somente a utilização de hidróxido de cálcio como medicação de demora não é suficiente para eliminar todos os microrganismos presentes na infecção endodôntica, de modo que algumas espécies oferecem maior resistência ao hidróxido de cálcio,

como *E. faecalis* e *C. albicans*^{24,34,138}. De acordo com os resultados do atual estudo, pode-se verificar que a associação do extrato de bardana ao hidróxido de cálcio foi benéfica, provavelmente aumentando o espectro de ação antimicrobiana da medicação. Estes resultados concordaram com os estudos de Pereira et al.⁹² e Gentil et al.³². Pereira et al.⁹² verificaram, utilizando o método de difusão em ágar, que constituintes da bardana apresentaram potente inibição microbiana contra diferentes patógenos endodônticos, incluindo *E. faecalis* e *C. albicans*. Gentil et al.³² demonstraram importante ação da bardana, em comparação ao hidróxido de cálcio, como medicação intracanal por 14 e 30 dias sobre *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *S. mutans* e *L. acidophilus*, inibindo o crescimento de todos os microrganismos avaliados. Assim, com base nos resultados da atual pesquisa, a pasta de bardana e hidróxido de cálcio pode ser promissora como medicação intracanal. Esta associação pode trazer benefícios à terapêutica endodôntica, assim como a associação do hidróxido de cálcio com clorexidina, que, de acordo com muitos autores^{34,85,149}, promoveu aumento significativo da atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio em relação à pasta convencional. No entanto, novos estudos avaliando a ação da pasta de bardana com hidróxido de cálcio sobre outros microrganismos envolvidos na infecção endodôntica devem ser realizados.

6.2.2 Neutralização de endotoxinas

Em todos os grupos avaliados, pode-se verificar que na segunda coleta após instrumentação a quantidade de endotoxina foi significativamente maior que na primeira coleta. Isso pode ser explicado, pois durante o preparo biomecânico, o processo de instrumentar, irrigar e aspirar remove parte das endotoxinas presentes na luz do canal. Estes resultados concordaram com Vianna et al.¹³⁶, que verificaram que a ação

do preparo químico-mecânico foi o responsável pela redução, em média, de 44,4% de endotoxinas. Entretanto, endotoxinas presentes também no interior dos túbulos dentinários podem retornar à luz do canal e ser detectada na coleta após 7 dias.

Com relação à ação dos agentes irrigantes sobre endotoxinas, pode-se verificar que nenhum grupo conseguiu promover baixos valores de endotoxinas durante a instrumentação. Na primeira coleta, somente a clorexidina apresentou valores significativamente inferiores ao grupo controle, entretanto, seus resultados foram semelhantes aos obtidos com os extratos de própolis e sálvia, não havendo diferença entre os grupos experimentais. Embora os grupos da clorexidina e própolis tenham promovido eliminação total de *E. coli* dos canais radiculares, em todos os espécimes foi detectada presença de endotoxinas, com valores médios superiores a 500 EU/mL. Estes resultados concordaram com os estudos de Vianna et al.¹³⁶ e Martinho & Gomes⁶⁹, que verificaram que o preparo químico-mecânico com clorexidina e hipoclorito de sódio promoveu ação efetiva sobre microrganismos em canais radiculares, entretanto, endotoxinas foram detectadas em todas as amostras após instrumentação. Em 2007, Oliveira et al.⁸¹ verificaram que as soluções de hipoclorito de sódio (2,5% e 5,25%) e clorexidina 2% não apresentaram capacidade de neutralizar endotoxinas em canais radiculares.

Durante a duplicação celular, as bactérias também liberam grande quantidade de endotoxinas⁹³, assim, o grupo controle apresentou os maiores níveis de LPS, pois neste grupo houve intenso crescimento de *E. coli* em todos os espécimes.

Na segunda coleta após instrumentação, pode-se verificar aumento significativo de endotoxinas em todos os grupos, especialmente no grupo G2 (sálvia) e G4 (controle), pois nestes grupos houve também intenso crescimento microbiano. Os grupos G1 (própolis) e G3

(clorexidina), embora também tenham promovido ausência de *E. coli* na segunda coleta, apresentaram níveis altos de endotoxinas, com valores médios acima de 2.700 EU/mL. Assim, pode-se verificar que os agentes irrigantes utilizados na atual pesquisa não apresentaram capacidade de neutralizar endotoxinas em canais radiculares. Estes resultados concordaram com os estudos da literatura que avaliaram a ação de agentes irrigantes sobre LPS^{1,69,81,110,131,136}.

Por outro lado, discordaram de alguns estudos que apontaram os efeitos de componentes de própolis e sálvia sobre LPS. Koksel et al.⁵⁷ verificaram que um componente ativo de própolis (CAPE) foi eficiente em reduzir inflamação e prejuízos teciduais ao pulmão causados por LPS em ratos. Wan et al.¹³⁹ demonstraram que *Salvia miltiorrhiza* foi capaz de bloquear a toxicidade letal do LPS em camundongos via supressão da liberação de TNF- α . Estes autores relataram, ainda, a aplicação clínica da *Salvia miltiorrhiza* na prevenção de doenças inflamatórias causadas por bactérias Gram-negativas. Guo et al.³⁹ verificaram que componentes de *Salvia miltiorrhiza* melhoraram significativamente os distúrbios microcirculatórios induzidos por LPS em ratos e inibiram a produção de H₂O₂ causada por LPS em neutrófilos. Chen et al.¹⁷ demonstraram que um derivado de *Salvia miltiorrhiza* inibiu a expressão de óxido nítrico induzida por LPS em macrófagos. No entanto, estes diversos estudos utilizaram outra espécie de sálvia, *Salvia miltiorrhiza*, e não *Salvia divinorum*, como na presente pesquisa. Assim, como são muitas as espécies de sálvia (*S. multicaulis*, *S. sclarea*, *S. verticillata*, *Salvia miltiorrhiza*, *S. officinalis*, *S. aramiensis*, *S. divinorum*), provavelmente os variados constituintes apresentam diferentes comportamentos frente ao LPS.

Com isso, os resultados do presente estudo são importantes e contribuem para os avanços das pesquisas envolvendo substâncias naturais, como a própolis e a sálvia, pois dentro do mesmo

gênero, diferentes espécies de plantas apresentam diferentes atividades, assim, como a própolis de diferentes regiões, clima e período. Desta forma, as pesquisas envolvendo substâncias naturais têm um amplo campo de estudo a ser traçado diante da sua grande diversidade.

Com relação à medicação intracanal, a pasta de bardana com hidróxido de cálcio promoveu significativa redução de endotoxinas em todos os espécimes, apresentando baixos valores de endotoxinas, mesmo em canais radiculares que apresentavam mais de 20.000 EU/mL antes da colocação da medicação. Estes resultados estão de acordo com os diversos estudos que demonstraram efetiva ação do hidróxido de cálcio em neutralizar LPS^{6,81,82,99,100}. Estudos *in vivo* demonstraram importante ação do hidróxido de cálcio, como medicação de demora, em neutralizar endotoxinas, inibindo sua capacidade de causar lesões periapicais em cães^{77,111,131}.

Safavi e Nichols⁹⁹ demonstraram que o tratamento do LPS com hidróxido de cálcio promove hidrólise da porção lipídica da endotoxina, liberando quantidades elevadas de ácidos graxos livres e que esta degradação pode ser uma importante causa dos efeitos benéficos do uso do hidróxido de cálcio na prática endodôntica. De acordo com estes autores, as propriedades biológicas do LPS requerem a presença de ácidos graxos hidroxilados ligados à junção éster e estas ligações são rompidas pelo tratamento com o hidróxido de cálcio. Assim, com os resultados obtidos neste estudo, pode-se verificar que o hidróxido de cálcio quando associado a bardana não perdeu sua capacidade de neutralizar LPS. Em 2007, Park et al.⁸⁹ demonstraram que constituintes da bardana apresentaram capacidade de inibir os efeitos de LPS na indução de óxido nítrico em macrófagos.

Os resultados da atual pesquisa discordaram do estudo de Vianna et al.¹³⁶, que verificaram *in vivo* que a utilização de medicações intracanaís (clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio e hidróxido de cálcio +

clorexidina gel 2%) por 7 dias promoveu redução de apenas 1,4% da quantidade de endotoxinas em canais radiculares quando comparado com a coleta após o preparo químico-mecânico, de modo que estes autores relataram que nenhuma melhoria foi alcançada com a utilização das medicações intracanaís por 7 dias. Em nosso estudo, o tempo de avaliação da medicação foi de 14 dias, o que pode ter promovido uma ação maior em profundidade nos túbulos dentinários.

Contudo, a associação da bardana com hidróxido de cálcio como medicação intracanal por 14 dias apresentou importantes resultados na neutralização de endotoxinas nos canais radiculares, demonstrando baixos nível de LPS mesmo na coleta após 7 dias da remoção da medicação. Desta forma, esta associação pode trazer benefícios à terapêutica endodôntica, necessitando ampliar os estudos nesta área, especialmente com pesquisas *in vivo*.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- a) foi possível a associação de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* em canais radiculares, com período de contaminação de 28 dias;
- b) o extrato glicólico de própolis foi eficaz na eliminação de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* em canais radiculares, com efeito residual por sete dias, sendo semelhante a solução de clorexidina 2%;
- c) o extrato glicólico de sálvia apresentou menor eficácia que a própolis e clorexidina na eliminação de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* em canais radiculares, sem efeito residual;
- d) a pasta de bardana com hidróxido de cálcio, como medicação de demora, promoveu eliminação de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* em canais radiculares, com efeito residual por sete dias;
- e) nenhum agente irrigante promoveu neutralização significativa de endotoxinas durante a instrumentação dos canais radiculares;
- f) somente a medicação intracanal (bardana + hidróxido de cálcio) foi capaz de neutralizar endotoxinas em canais radiculares.

8 REFERÊNCIAS*

- 1 Aibel K, Stevens R. Effect of chlorhexidine on IL-6 induction by LPS. *J Endod.* 1999;25(4):282.
- 2 Al-Shafer A, Wallace J, Agarwal S, Brets W, Baugh D. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *J Endod.* 2004;30(5):359-61.
- 3 Alves PM, Leite PHAS, Pereira LF, Araújo CRF, Higino JS, Pereira JV et al. Atividade antimicrobiana, antifúngica e antiaderente *in vitro* de plantas brasileiras sobre biofilme dental e *Candida*. *Braz Oral Res.* 2006;20(suppl):224 (Pb127).
- 4 Araújo C, Sousa MJ, Ferreira MF, Leao C. Activity of essential oils from Mediterranean Lamiaceae species against food spoilage yeasts. *J Food Prot.* 2003;66(4):625-32.
- 5 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.

* Baseado em:

Internacional Comitê of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referents [homepage na Internet]. Bethesda: US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar]. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/bds/uniformrequirements.html>

- 6 Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod J.* 1997;30(3):155-9.
- 7 Basrani BR, Manek S, Sodhi RNS, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod.* 2007;33(8):966-69.
- 8 Basrani BR, Santos JM, Tjaderhane L, Grad H, Gorduyusus O, Huang J et al..Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(2):240-5.
- 9 Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, XIA T. Identification of spirochetes (Treponemes) in endodontic infections. *J Endod.* 2003;29:794-7.
- 10 Baumgartner JC, Siqueira Jr JF, Xia T, Rôças IN. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. *J Endod.* 2004;30:141-4.
- 11 Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infection. *J Endod.* 1999;25(6):413-5
- 12 Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vainna ME, Ferraz CC, Zaia AA et al. 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.

- 13 Bretz WA, Chiego DJ, Marcucci MC, Cunha I, Custódio A, Schneider LG. Preliminary report on the effects of própolis on wound healing in the dental pulp. *Z Naturforsch* 1998;53(11-12):1045-8 [abstract on line]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>.
- 14 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.
- 15 Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res*. 1981;89:321-8.
- 16 Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol*. 1985;1(5):170-5.
- 17 Chen TH, Hsu YT, Chen CH, Kao SH, Lee HM. Tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* induces heme oxygenase-1 expression and inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide expression in RAW 264.7 cells. *Mitochondrion* 2007;7(1-2):101-5 [abstract on line]. Disponível em : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>.
- 18 Csako G, Elin RJ, Hochstein HD, Tsai CM. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infect Immunol*. 1983;41(1):190-6.
- 19 Dahlén G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res*. 1980;59(6):1033-40.

- 20 Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BPA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;99(6):768-72.
- 21 Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW.. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod. 1982;53(5):518-23.
- 22 Dwyer GT, Torabinejad M. Radiographic and histologic evaluation of the effect on the periapical tissues of the cat. J Endod. 1981;7(1):31-5.
- 23 Egan MW, Spratt DA, Ng YL, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. Int Endod J. 2002;35(4):321-9.
- 24 El-Karim I, Kenndy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;103(4):560-9;
- 25 Ercan E, Orzekinci C, Atakul F, Gul K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. J Endod. 2004;30(2):84-7.
- 26 Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pécora JD. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. Int Endod J. 2001;34(5):341-5.

- 27 Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Möller AJ. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scan J Dent Res*. 1982;90(3):200-6.
- 28 Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Filho JS. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod*. 2001;27(7):452-55.
- 29 Ferreira FBA, Torres SA, Rosa OPS, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC, et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Endod*. 2007;104:709-16.
- 30 Fontenelle RO, Morais SM, Brito EH, Brilhante RS, Cordeiro SA, Nascimento NS et al. Antifungal activity of essential oils of Croton species from the Brazilian Caatinga biome. *J Appl Microbiol*. In Press. 2008
- 31 Gafar M, Sacalus A, David E, David N. Tratamentul gangrenei pulpare simple cu produsul apiterapic "propolis". *Stomatol*. 1986;33:115-17 [abstract on line]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>.
- 32 Gentil M, Pereira JV, Sousa YT, Pietro R, NetoMD, Vansan LP, Castro Franca S. In vitro evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressings. *Phytoter Res*. 2006;20(3):184-6.
- 33 Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J*. 1996;29(2):69-75.

- 34 Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FB. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. J Endod. 2006;32(10):937-40.
- 35 Gomes BPFA, Montanger F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Polymerase chain reduction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. J Endod. 2007;33(9):1049-52.
- 36 Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA et al. Microbiological examination of infected dental in root canals. Oral Microbiol Immunol. 2004;19(2):71-6.
- 37 Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. J Endod. In Press. 2008.
- 38 Groppo FC, Ramacciato JC, Motta RH, Ferraresi PM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic against oral streptococci. Int J Dent Hyg. 2007;5(2):109-15.
- 39 Guo J, Sun K, Wang CS, Fang SP, Horie Y, Yang JY et al. Protective effects of dihydroxyphenyl lactic acid and salvianolic acid B on LPS-induced mesenteric microcirculatory disturbance in rats. Shock 2007;19 [abstract on line]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>.

- 40 Haenni S, Schmidlin PR, Mueller B, Sener B, Zehnder M. Chemical and antimicrobial properties of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Int Endod J.* 2003;36:100-5.
- 41 Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiba N, Nakamura H. The relationship between clinical symptoms and anerobic bacteria from infected root canals. *J Endod.* 1992;18(11):558-61.
- 42 Heling I, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J.* 1998;31(1):8-14.
- 43 Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM et al. The role of lipopolysaccharide in infections bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med.* 2004;33(3):162-9.
- 44 Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1991;71(4):492-95.
- 45 Jacinto RC; Gomes BOFA. Relação da sintomatologia com bactérias e endotoxinas em canais radiculares com necrose e E-test de bactérias anaeróbias [abstract Pc094]. *Braz Oral Res.* 2007;21(sp.iss.):395.
- 46 Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol.* 2005;54:777-83.

- 47 Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza Filho FB. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *Int Endod J*. 2006;39(1):62-70.
- 48 Janeway CA. et al. *Imunologia: o sistema imunológico na saúde e na doença*. Trad. D. C. Machado et al. 4.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul; 2000. 634p.
- 49 Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod*. 1994;20(6):276-8.
- 50 Jiang J, Zuo J, Chen SH, Holliday LS. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95(3):348-54.
- 51 Johnson EM, Flannagan SE, Sedgley CM. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. *J Endod*. 2006;32(10):946-50.
- 52 Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965;20:340-9.
- 53 Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem*. 2003;10(10):813-29.

- 54 Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in caries: association with pulpal pain. *Int Endod J*. 2000;33(2):132-7.
- 55 Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulpl of human carious teeth: association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;91(5):587-93.
- 56 Koksel O, Ozdulger A, Tamer L, Cinel L, Ercil M, Degirmenci U et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. *Pulm Pharmacol Ther*. 2006;19(2):90-5 [abstract on line]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>.
- 57 Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *J Endod*. 2000;26:315-7.
- 58 Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YY, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica Montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol*. 2000;45(2):141-8.
- 59 Koru O, Toksoy F, Acikel CH, Tunca YM, Baysallar M, Uskudar Guclu A et al. *In vitro* antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe* 2007;13(3-4):140-5 [abstract on line]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>.
- 60 Leonardo MR, Leal J.M. Endodontia: tratamento de canais radiculares. 3.ed. São Paulo: Panamericana, 1998. 908p.

- 61 Leonardo MR, Silva LA, Tanomaru-Filho M, Bonifacio KC, Ito IY. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. J Endod. 2001;27(12):717-9.
- 62 Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, Silva LAB, Nelson-Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. J Endod. 1999;25(3):167-71
- 63 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.
- 64 Lima Neto DA. Atividade microbiana das plantas arnica, bardana e tanchagem. Folha Méd. 1993;106(3):59-62.
- 65 Lopes HP, Siqueira Jr JF. Endodontia Biologia e Técnica. Rio de Janeiro: Medsi; 1999. 650p.
- 66 Lu LC, Chen YW, Chou CC. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. Int J Food Microbiol. 2005;102(2):213-20 [abstract on line]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>.
- 67 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, Universidade Estadual Paulista;2007.

- 68 Manzur A, Gonzales AM, Pozos A, Silva-Herzoq D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod.* 2007;33(2):114-8.
- 69 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;34:268-72.
- 70 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.
- 71 Mattison GD, Haddix JE, Kehoe JC, Proquleske-Fox A. The effect of *Eikenella corrodens* endotoxin on periapical bone. *J Endod.* 1987;13(12):559-65.
- 72 Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MNG. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J.* 2004;37(5):311-9.
- 73 Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998;31:1-7.

- 74 Murakami Y, Hanazawa S, Tanaka S, Iwahashi H, Yamamoto Y, Fujisawa S. A possible mechanism of maxillofacial abscess formation: involvement of *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide via the expression of inflammatory cytokines. *Oral Microbiol Immunol*. 2001;16:321-5.
- 75 Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(6):348-81.
- 76 Navas EAFA, Carreto CFP, Paradilla TC, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. Efeitos do chá de tomillo sobre a aderência de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* [abstract Pa133]. *Braz Oral Res*. 2006;20(sp.iss.):167.
- 77 Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LA, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod*. 2002;28(10):694-6.
- 78 Oliveira DP, Barbizam JV, Trope M, Teixeira FB. In vitro antibacterial efficacy of endodontics irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103(5):702-6.
- 79 Oliveira JCM, Gama TGV, Siqueira Jr JF, Rôças IN, Peixoto RS, Rosado AS. On the use of denaturing gradient gel electrophoresis approach for bacterial identification in endodontic infections. *Clin Oral Invest*. 2007;11:127-32.
- 80 Oliveira LD, Carvalho CAT, Jorge AOC. Microrganismos causadores de infecções pulpares e peripicais. In: Jorge AOC *Microbiologia bucal*. 3.ed. São Paulo:Santos; 2007. Cap.9. p.127-42.

- 81 Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CA, 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.
- 82 Oliveira LD, Leão MVP, Carvalho CAT, Camargo CHR, Valera MC, Jorge AOC et al. In vitro effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. *J Dent.* 2005;33:107-14.
- 83 Olsen MH. The effects of calcium hydroxide inhibition on LPS induced release IL-1 β from human monocytes in whole blood. *J Endod.* 1999 Apr.;25(4):289.
- 84 Onawunmi GO, Ogunlana EO. A study of the antibacterial activity of the essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citrates*). *Int J Crude Drug Res* 1986;24:64-8 [abstract on line]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>.
- 85 Önçaag O, Gogulu D, Uzel A. Efficacy of various intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* in primary teeth: an in vivo study. *J Clin Pediatr Dent.* 2006;30(3):233-7.
- 86 Önçaag Ö, Hosgor M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J.* 2003;36(6):423-32.
- 87 Osawa K, Miyazaki K, Shimura S, Okuda J, Matsumoto M, Ooshima T. Identification of cariostatic substances in the cacao bean husk: their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities. *J Dent Res.* 2001;80(11):2000-4.

- 88 Ozcan MM, Saqdic O, Ozkan G. Inhibitory effects of spice essential oils on the growth of *Bacillus* species. *J Med Food*. 2006;9(3):418-21, 2006.
- 89 Park SY, Hong SS, Han XH, Hwang JS, Lee D, Ro JS. Lignans from *Arctium lappa* and their inhibition of LPS-induced nitric oxide production. *Chem Pharm Bull* 2007;55(1):150-2 [abstract on line]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>.
- 90 Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in Lithuanian population. *J Endod*. 2000;26(10):593-5.
- 91 Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J*. 2001;34:429-34.
- 92 Pereira RS, Sumita TC, Furlan MR, Jorge AOC, Ueno M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. *Rev. Saúde Pública* 2004;38(2):1-4.
- 93 Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol*. 2000;76(2):97-119.
- 94 Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18:100-3.
- 95 Pitts DL, Williams BL, Morton JTH. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. *J Endod*. 1982;8(1):10-8.

- 96 Röças IN, Siqueira Junior JF. Culture-independent detection of *Eikenella corrodens* and *Veillonella parvula* in primary endodontic infections. *J Endod.* 2006; 32(6):509-12.
- 97 Rogers JE, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, Giannobile WV et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2007;78(3):550-8.
- 98 Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;98:488-92.
- 99 Safavi KE, Nichols FC. Effects of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod.* 1993;19(2):76-8.
- 100 Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide. *J Endod.* 1994;20(3):127-9.
- 101 Samet N, Laurent C, Susaria SM, Samet-Rubsinsteen N. The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: a pilot study. *Clin Oral Invest.* 2007;11:143-7.
- 102 Santos VR, Pimenta FJ, Aguiar MC, do Carmo MA, Naves MD, Mesquita RA. Oral candidiasis treatment with brazilian ethanol própolis extract. *Phytother Res.* 2005;19:652-4 [abstract on line]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>.
- 103 Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Guerra R, Figueiredo L, Fidel SR et al. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. *J Endod.* In Press. 2008.

- 104 Sassone LM, Fidel RA, Figueiredo L, Fidel SR, Faveri M, Feres M. Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using checkerboard DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22:390-7.
- 105 Sathorn C, Parashos P, Messer H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2007;40(1):2-10.
- 106 Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod.* 1975;1(1):19-21.
- 107 Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1994;78(5):634-45.
- 108 Sena NT, Gomes BPF, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J.* 2006;39(11):878-85.
- 109 Silva FB, Almeida JM, Sousa SMG. Natural medicaments in endodontics – a comparative study of the anti-inflammatory action. *Braz Oral Res.* 2004;18(2):174-9.
- 110 Silva LA, Leonardo MR, Assed D, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J.* 2004;15(2):109-14.
- 111 Silva L, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod.* 2002;28(2):94-8.

- 112 Siqueira Junior JF. Taxonomic changes of bacteria associated with endodontic infections. *J Endod.* 2003;29:619-23.
- 113 Siqueira Junior JF, Rôças IN. Positive and negative bacterial associations involving *Dialister pneumosintes* in primary endodontic infections. *J Endod.* 2003;29(7):438-41.
- 114 Siqueira Junior JR JF, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: part I – current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod.* 2005;31:411-23.
- 115 Siqueira Junior JF, Roças IN. Molecular detection and identification of *Synergistes* phylotypes in primary endodontic infections. *Oral Dis.* 2007;13:398-401.
- 116 Siqueira Junior JR JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(5):632-41.
- 117 Siqueira JF, Guimarães-Pinto T, Roças IN. 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):800-5.
- 118 Siqueira Junior JF, Batista MM, Fraga RC, Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod.* 1998;24(6):414-6.
- 119 Siqueira Junior Jr JF, Rôças IN, Lopes HP, Elias CN, Uzeda M. Fungal infection of the radicular dentin. *J Endod.* 28(11):770-3.

- 120 Siqueira Junior JR, Rôças IN, Moraes SR, Santos KR. Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. *Int Endod J*. 2002;35:345-51.
- 121 Siqueira JF, Rôças IN, Paiva SS, Magalhães KM, Guimarães-Pinto T. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22(4):266-71.
- 122 Siqueira Junior JF, Rôças In, Paiva SS, Guimarães-Pinto T, Magalhães KM, Lima KC. Bacteriological investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;104(1):122-30.
- 123 Sonboli A, Babakhani B, Mehrabian AR. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Z Naturforsch* 2006;61(3-4):160-4 [abstract on line]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>.
- 124 Sousa ELR. Bacteriological study of root canals associated with periapical abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;96:332-9.
- 125 Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol*. 1992;7:257-62.
- 126 Sundqvist G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1994;78:522-30.

- 127 Sundqvist G, Johansson E, Sjogren U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod.* 1989;15(1):13-9.
- 128 Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 1998;85(1):86-93.
- 129 Tani-Ishii N, Wang CY, Tanner A, Stashenko P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1994;9(2):129-35.
- 130 Tanomaru-Filho M, Leonardo MR, Silva LAB, Anibal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J.* 2002; 35(9):735-9.
- 131 Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho RM, Bonetti Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J.* 2003;36(11):733-9.
- 132 Tomazinho LF, Ávila-Campos MJ. Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in chronic endodontic infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103(2):285-8.
- 133 Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules *in vitro*. *Endod Dent Traumatol.* 1993;9(6):243-8.

- 134 Vianna ME, Conrads G, Gomes BPFA, Horz HP. Quantification and characterization of *Synergistes* in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22:206-5.
- 135 Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(1):79-84.
- 136 Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22(6):411-8.
- 137 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.
- 138 Waltimo TMT, Siren EK, Torkko HL, Olsen I, Haapasalo MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997;30(2):96-101.
- 139 Wan JM, Sit WH, Lee CL, Fu KH, Chan DK. Protection of lethal toxicity of endotoxin by *Salvia miltiorrhiza* BUNGE is via reduction in tumor necrosis factor alpha release and liver injury. *Int Immunopharmacol* 2006 May;6(5):750-8 [abstract on line]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>.
- 140 Wang C, Stashenko P. The role of interleukin-1 α in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. *Oral Microbiol Immunol.* 1993;8(1):50-6.

- 141 Weiger R, Rosendahl R, Lost C. Influence of calcium hydroxide intracanal dressings on the prognosis of teeth with endodontically induced periapical lesions. *Int Endod J*. 2000;33:219-26.
- 142 Williams JC, Gharbia SE, Gulabivala K, Rajendram D, Mehta N, Huttson R et al. Noncultivable microbial communities in dentine and cementum: a molecular analytical approach. *Clin Infect Dis*. 1997;25:233-4.
- 143 Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M, Hashioka K, Horiba N, Nakamura H. Endotoxin and Gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. *J Endod*. 1992;18(10):501-4.
- 144 Yelsilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod*. 1995;21(10):513-5.
- 145 Yin N, Marshall RL, Matheson S, Savage PB. Synthesis of lipid A derivatives and their interactions with polymyxin B and polynyxin B nonapeptide. *J Am Chem Soc*. 2003;125:2426-35.
- 146 Yousefzadi M, Sonboli A, Karimic F, Ebrahimi SN, Asqhari B, Zeinalia A. Antimicrobial activity of some *Salvia* species essential oils from Iran. *Z Naturforsch* 2007;62(7-8):514-8 [abstract on line]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>.
- 147 Zamany A, Safavi K, Spangber LS. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003; 96(5):578-81.
- 148 Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod*. 2006;32(5):389-98, 2006.

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

Molina FP. Association of *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* and *Escherichia coli* in root canals and evaluation of the effects of natural extracts on microorganisms and endotoxin [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2008.

ABSTRACT

The proposal of this research was to standardize the association of three microorganisms (*E. faecalis*, *C. albicans* and *E. coli*) in endodontic root canal and evaluate the effectiveness of natural extracts as irrigating agents and intracanal medication on the microorganisms and endotoxin. There have been used sixty humans teeth, unirradiculated sized 16 mm, which were sterilized and fixed to cellular cultured plaques. In the first part, in 12 specimen, the association of three microorganisms was standardized using 4 different experimental samples. After standardizing, 48 specimen were contaminated with suspensions of *E. faecalis*, *C. albicans* and *E. coli*, and 28 days was the period of contamination. After that, the root canal were biomedically prepared, being divided into 4 experimental groups (n=12) according to the irrigating agent used: G1) propolis extract in glycolic solution; G2) salvia extract in glycolic solution; G3) Chlorhexidine solution 2%; G4) physiologic solution (control). All the specimen have been treated with intracanal medication of *Arctium lappa* + calcium hydroxide paste for 14 days. There have been collected 4 samples of the root canal content. For all the collections, microbiological analysis (sowing of selective culture media and UFC/mL countable) and endotoxin (Limulus Amebocyte Lysate) were done. The results were statistically (ANOVA and Tukey test, 5%/ Kruskal Wallis and Dunn test). In the groups G1, G3 there was total elimination of the microorganisms after instrumentations being statistically different from the G2 and G4 groups ($p < 0,05$). In G2 groups, presented better results than the control (G4) in the first collection after instrumentation, however, in the second collection they were similar after intracanal medication, there was the elimination of the three microorganisms in all the groups ($p > 0,05$). All the groups presented a great quantity of endotoxin after instrumentation, mainly in the second collection ($p > 0,05$). There was a significanty reduction of the endotoxin after intracanal medication ($p > 0,05$). According to the results it has been conclude that: a) the association of three microorganisms in root canal is possible; b) propolis was effective on *E. faecalis*, *C. albicans* and *E. coli*, with residual effect, while salvia should little effectiveness, with no residual effect; c) Intracanal medication (*Arctium lappa* + calcium hydroxide paste), was effective on *E. faecalis*, *C. albicans* and *E. coli*; d) only intracanal medication was able to neutralize endotoxin in root canals.

KEY WORDS: microbial association; root canal irrigants; intracanal medication; endotoxin; natural extracts.