

LILIAN EIKO MAEKAWA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS
AUXILIARES E MEDICAÇÕES INTRACANAIS SOBRE *Escherichia*
Coli E SUA ENDOTOXINA EM CANAIS RADICULARES**

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
Odontologia Restauradora,
Especialidade em Endodontia

LILIAN EIKO MAEKAWA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS
AUXILIARES E MEDICAÇÕES INTRACANAIS SOBRE *Escherichia*
Coli E SUA ENDOTOXINA EM CANAIS RADICULARES**

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 Odontologia Restauradora, Especialidade em Endodontia.

Orientadora Prof^{fa}. Adj. Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2007

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.

Maekawa, Lilian Eiko

Avaliação *in vitro* da ação de substâncias químicas auxiliares e medicações intracanaís sobre *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares / Lilian Eiko Maekawa; orientadora Marcia Carneiro Valera. __ São José dos Campos, 2007.

Maekawa, Lilian Eiko

106 ; IL.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora – Especialidade em Endodontia – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista) 2007.

1. *Escherichia coli* - 2. Endotoxina - 3. Hipoclorito de sódio - 4. Clorexidina
5. Hidróxido de cálcio - 6. Polimixina B

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, 12/06/2007.

Assinatura :

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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Marcos e Iracema**, vocês que sempre estiveram ao meu lado nas horas que chorei e nas horas que sorri, nas horas que me lamentei e nas horas que, de uma forma ou de outra, demonstrei total alegria. Ensinaram-me que o mais importante na vida é o crescimento interior e buscar sempre o que desejar, porque tudo se torna possível quando se tem vontade e coragem para lutar. Obrigada por acreditar em mim quando eu mesma achei difícil acreditar. Minha eterna admiração e gratidão, porque devo tudo de mim e tudo que sou a vocês.

À minha irmã e amiga **Carla**, com quem posso contar nas horas mais difíceis. Seus incansáveis conselhos de incentivo e conforto quando necessários foram imprescindíveis no meu crescimento como pessoa. Ao meu irmão e amigo **Sadão**, que embora residindo no Japão, seus esclarecimentos, incentivo, otimismo e atenção nas longas conversas ao telefone, dispondo de horas de descanso para me ajudar, fizeram com que a distância entre nós fosse bem menor.

Muito obrigada pelo cuidado, amor e respeito com que cuidaram e cuidam de mim e pela amizade, compreensão e companheirismo que nos une até hoje.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof^a. Adj. **Marcia Carneiro Valera**, professora, educadora, orientadora e amiga, pela sua boa vontade em orientar me mostrando o que é ser uma verdadeira orientadora. Obrigada pela confiança depositada em mim e pela compreensão, conforto e otimismo nas horas mais difíceis durante o curso de Mestrado. Minha eterna admiração e gratidão por tê-la como orientadora.

À **Luciane Dias Oliveira**, antes colega, hoje amiga, com quem posso contar tanto nas horas boas como nas horas mais aflitas. Sua incansável boa vontade em ensinar e incentivar foram imprescindíveis no decorrer deste trabalho; e ao Prof. Dr. **Cláudio Antonio Talge de Carvalho**, pelos conselhos, esclarecimentos e principalmente incentivo com muito bom-humor durante o curso de Mestrado.

Muito obrigada pela amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos Profs. da Disciplina de Endodontia do curso de Odontologia da UMC,
Eliane Dalben, Jaime Carlik, Maria Renata Giazzi Nassri, Neivaldo José Alves de Souza, por fazerem despertar em mim o gosto pela Endodontia. Pelos ensinamentos, conselhos, incentivo desde a época da graduação, e pela amizade e companheirismo que hoje compartilhamos, meus sinceros agradecimentos.

Às amigas, **Alessandra Sverberi Carvalho, Elaine Faga Iglecias, Giovana Ribeiro Martins, Lecy Schwantes Iório, Manuela Bafini Fonseca, Mariana Pretti Nakáo, Paula Elaine Cardoso e Selma Maria dos Santos Moura Brito**, cada uma com seu jeitinho especial de ser, sabe em que momento me deu apoio, incentivo e força durante o curso de Mestrado. Conseguimos formar uma turma com uma convivência muito agradável, que sentirei falta quando nos separarmos. Obrigada pela amizade de cada uma de vocês, em especial a Alessandra e Selma por terem acompanhado de perto todas as minhas alegrias e aflições durante todo o curso e a Giovana e a Paula Elaine pelo companheirismo na fase final deste trabalho.

Ao **Sérgio Dimas**, pessoa que em pouco tempo se tornou tão especial pra mim. Obrigada pelo cuidado, amor, respeito e principalmente pela paciência e companheirismo na fase final deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, na pessoa do Diretor, Prof. Dr. Paulo Villela Santos Araújo e do Vice-Diretor, José Roberto Rodrigues.

Ao Prof. Dr. Clóvis Pagani, Coordenador do curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, pela amizade e incentivo constantes.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Ribeiro Camargo e Samira Esteves Afonso, pela amizade, atenção e conselhos durante o curso de Mestrado.

Aos Profs. Dr. Ana Paula Martins Gomes, Simone Helena Gonçalves de Oliveira e Alberto Siqueira e Silva pela convivência durante o curso.

Aos Profs. Dr. Lafayette Nogueira Jr, Carlos Augusto Pavanelli e Eduardo Uemura, pela amizade e agradável convivência durante o estágio na disciplina de Prótese Parcial Removível e pelos incansáveis conselhos na minha vida tanto profissional como pessoal.

Ao Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge e à Prof^a. Dra. Juliana Campos Junqueira pelas orientações, ensinamentos, incentivo e apoio durante a execução deste trabalho.

À Prof^a. Dra. Cristiane Yumi Koga-Ito, pela disponibilidade de ajudar e ensinar. Pela amizade, boa vontade, incentivo e principalmente otimismo nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Ivan Balducci, pela paciência e colaboração na análise estatística dos dados deste trabalho.

Às secretárias do Departamento de Odontologia Restauradora, Nair e Rosângela, que sempre se mostraram dispostas a ajudar.

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

À Ângela de Brito Bellini, pela colaboração e apoio na revisão das normas de apresentação deste trabalho.

À Maria das Dores Nogueira, pela compreensão, apoio e paciência nas horas aflitas na biblioteca atrás de artigos pedidos pelo COMUT.

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

Ao técnico de laboratório Sérgio, pela amizade, compreensão e companheirismo durante a fase experimental deste trabalho.

Ao técnico de laboratório Walter Cruz pela colaboração na fase experimental deste trabalho.

Aos amigos Gisela Castanho, Fernanda Mollica, Alessandro Caldas Travassos, Daniel Maranha da Rocha, João Maurício Ferraz da Silva, Juliana Gonçalves e Ângela Regina Kimie Marimoto, pela amizade e convívio durante o curso de Mestrado.

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

Ao amigo Sidnei Marcacci, pela amizade e incentivo durante o estágio de Prótese Parcial Removível e curso de Mestrado.

À amiga Eliane Rye Otani (Pin), pela amizade e companheirismo, sempre com muito bom humor, nesses cinco anos de convivência.

Aos amigos Júlio Murakami e Fabio Matuda pela colaboração e paciência durante o curso, principalmente no crédito de Periodontia.

Às alunas e ex-alunas Adriana Chung, Ana Carolina Salvia, Eddy Liem, Érika Shigey, Raquel Vargas, Katy Godinho, Rachel Toyama, Mariana Maneschy e Alana Salustiano pelo agradável convívio durante os trabalhos de Iniciação Científica, acrescentando-me coisas boas na vida, tanto na profissional como na pessoal.

Aos alunos da Pós-graduação em Biopatologia Bucal pelo agradável convívio no laboratório de Microbiologia.

À amiga Cintia Salles pela amizade, apoio, incentivo e otimismo na minha vida pessoal.

Ao Carlos Alberto Guedes, pelas orientações e pela paciência nos projetos e relatórios da FAPESP e FUNDUNESP durante o curso de Mestrado.

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

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

MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
RESUMO.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Endotoxina (Lipopolissacarídeo).....	20
2.2 Substâncias químicas auxiliares: hipoclorito de sódio e clorexidina.....	30
2.3 Medicações intracanaís: hidróxido de cálcio e clorexidina.....	39
2.4 Polimixina B.....	46
3 PROPOSIÇÃO.....	51
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.1 Preparo dos espécimes.....	52
4.2 Contaminação dos espécimes.....	54
4.3 Divisão dos grupos experimentais.....	57
4.4 Coletas do conteúdo do canal radicular.....	61
4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	62
4.6 Verificação da neutralização de endotoxinas.....	63
5 RESULTADOS.....	66

5.1	Análise microbiológica.....	66
5.2	Quantificação de endotoxinas.....	72
6	DISCUSSÃO.....	82
6.1	Da metodologia.....	82
6.2	Dos resultados.....	88
7	CONCLUSÃO.....	94
8	REFERÊNCIAS.....	95
	ANEXO.....	105
	<i>ABSTRACT</i>	106

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Preparo inicial dos espécimes: a) padronização das raízes; b) seqüência da instrumentação inicial.....	53
FIGURA 2	Impermeabilização das raízes: a) selamento do ápice; b) impermeabilização externa com resina epóxi; c) raiz após impermeabilização externa.....	53
FIGURA 3	Raízes incluídas com resina acrílica na placa de contagem de células: a) distribuição dos 12 espécimes na placa; b) detalhe dos dentes incuídos.....	54
FIGURA 4	Preparo da suspensão de <i>E. coli</i> : a) <i>E. coli</i> em ágar BHI; b) <i>E. coli</i> em ágar EMB; c) leitura da suspensão em espectrofotômetro.....	55
FIGURA 5	Fotomicrografias em MEV dos espécimes do estudo piloto para avaliação após 14 dias da inoculação com <i>E. coli</i> : a e b) Aumento de 5000x, c) aumento de 10000x....	56
FIGURA 6	Medicação intracanal dos espécimes do subgrupo A: a) Pasta Calen; b) Colocação da pasta de hidróxido de cálcio (Pasta Calen).....	59
FIGURA 7	Medicação intracanal do subgrupo B: a) Polimixina B; b) Colocação da Polimixina B com auxílio de seringas de 1 ml.....	60
FIGURA 8	Medicação intracanal do subgrupo C: a) Hidróxido de cálcio P.A.; b) clorexidina gel 2%; c) colocação da associação Ca(OH)_2 + CLX com auxílio de uma lima K 50.....	60

FIGURA 9	Coletas das amostras do canal radicular.....	62
FIGURA 10	Substâncias utilizadas como padrão: a) Água apirrogênica; b) Endotoxina padrão de <i>E. coli</i> ; c) Reagente LAL.....	64
FIGURA 11	Leitor Cinético QCL.....	65
FIGURA 12	Coleta de confirmação em ágar BHI.....	66
FIGURA 13	Microplaca de 96 poços após a realização do teste cromogênico.....	72
FIGURA 14	Diagrama de pontos (Dotplot) dos valores de endotoxina obtidos na primeira coleta.....	77
FIGURA 15	Diagrama de pontos (Dotplot) dos valores de endotoxina obtidos na segunda coleta.....	77
FIGURA 16	Diagrama de pontos (Dotplot) dos valores de endotoxina obtidos na terceira coleta.....	78
FIGURA 17	Diagrama de pontos (Dotplot) dos valores de endotoxina obtidos na terceira coleta.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS = absorbância

BHI = Brain and Heart Infusion (Infusão de cérebro e coração)

C. albicans = *Candida albicans*

Ca(OH)₂ = hidróxido de cálcio

CLX = clorexidina

E. coli = *Escherichia coli*

E. faecalis = *Enterococcus faecalis*

EDTA = ácido etilenodiamino-tetra-acético

ELISA = ensaio imunoabsorvente ligado à enzima

EU = Unidade de Endotoxina

EMB = ágar Eosina Azul de Metileno

EMBRARAD = Empresa Brasileira de Radiação

°C = grau Celsius

h = hora

IgM = Imunoglobulina M

IL = interleucina

K = lima tipo Kerr

KDO = ácido 2-keto-3-deoxioctônico

KGy = KiloGray (unidade de medida Kilojoule/Kilograma)

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

MCF = mínima concentração fungicida

min = minuto

ml = mililitro

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

NaOCl = hipoclorito de sódio

ng = nanograma (equivalente a 10⁻⁹ g)

nm = nanometro (equivalente a 10^{-9} m)

LAL = Lisado do amebócito de *Limulus*

LPS = Lipopolissacarídeo

MDP = muramil dipeptídeo

P.A. = pró-análise

pg = picograma (equivalente a 10^{-12} g)

PMCC = paramonoclorofenol canforado

QCL = Teste cinético Quantitativo Cromogênico Lisado

r.p.m. = rotações por minuto

TNF = Fator de Necrose Tumoral

UFC = Unidade Formadora de Colônia

UI = Unidade Internacional

% = porcentagem

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

μ g = micrograma

μ l = microlitro

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.

RESUMO

A proposta deste trabalho foi avaliar a efetividade de substâncias químicas auxiliares e medicações intracanaís sobre *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares. Foram utilizados 120 dentes unirradiculados que após secção das coroas as raízes foram impermeabilizadas e esterilizadas. Os canais foram contaminados com suspensão de *Escherichia coli* por 14 dias. Após a coleta de confirmação, foram instrumentados até a lima K 50 e escalonados até a K 80. Doze raízes foram utilizadas como controle (G4) e 108 raízes foram divididas em 3 grupos (n=36), de acordo com a substância química auxiliar utilizada: G1) hipoclorito de sódio 2,5%; G2) clorexidina gel 2% (CLX); G3) solução fisiológica apirogênica. Após o preparo biomecânico (PBM) estes grupos foram subdivididos de acordo com a medicação intracanal utilizada (MIC) (n=12): A) hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2), B) polimixina B e C) Ca(OH)_2 + CLX. No grupo G4 foi utilizada solução fisiológica apirogênica sem MIC. Foram realizadas coletas do conteúdo do canal radicular imediatamente após o PBM (1ª coleta), após 7 dias do PBM (2ª coleta), imediatamente após 14 dias da ação da MIC (3ª coleta) e 7 dias após remoção da MIC (4ª coleta). Para todas as coletas foram avaliadas: a) atividade antimicrobiana; b) quantificação de endotoxina pelo teste cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus*. As substâncias químicas auxiliares e as MICs utilizadas foram capazes de eliminar completamente *E. coli* dos canais radiculares. Para os resultados da quantidade de endotoxina foi aplicado teste estatístico Kruskal-Wallis e Dunn (5%). Na primeira e na segunda coleta verificou-se que os grupos G1 e G2 foram diferentes estatisticamente do grupo G3 ($p < 0,05$). Na terceira coleta, o grupo G2B foi semelhante aos grupos G1A, G1B e G3A e o grupo G3B foi semelhante aos demais ($p > 0,05$). Na quarta coleta, o grupo G2B foi semelhante a todos os demais ($p > 0,05$) e o G3 só foi diferente de G1B ($p < 0,05$). Conclui-se que o PBM com soluções com atividade antimicrobiana foi capaz de eliminar *E. coli* dos canais radiculares, mas a endotoxina só pode ser neutralizada com o uso de MIC, especialmente a associação Ca(OH)_2 e CLX gel 2%.

PALAVRAS-CHAVE: *Escherichia coli*, endotoxina, hipoclorito de sódio, clorexidina, hidróxido de cálcio, polimixina B.

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos e seus produtos estão intimamente ligados à etiologia das lesões pulpares e periapicais, que, como agentes agressores, podem levar o tecido pulpar à necrose; sua persistência no canal radicular, após tratamento endodôntico, induz reação inflamatória periapical (Kakehashi et al.²⁷; Vafaie et al.⁷³). Assim, o conhecimento sobre a microbiota endodôntica é fundamental para entender o papel destes microrganismos na origem e no desenvolvimento dos processos patológicos apicais e periapicais, bem como oferece subsídios para a escolha de uma terapêutica adequada.

A partir da década de 80, os avanços tecnológicos na cultura e identificação microbiológica mostraram que, em canais radiculares de dentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical crônica, embora exista diversidade microbiana, predominam bactérias anaeróbias, particularmente as Gram-negativas (Leonardo³⁰; Leonardo et al.³¹; Mattison et al.³⁶; Seltzer e Farber⁶⁰). Essa infecção de natureza polimicrobiana, encontra-se localizada não apenas na luz do canal radicular, mas também em todo o sistema de canais radiculares e crateras de reabsorções apicais.

Bactérias Gram-negativas contém endotoxina em sua parede celular, que são liberadas durante sua duplicação ou morte celular, e é composta de polissacarídeos, lipídeos e proteínas, podendo ser chamada também de lipopolissacarídeo (LPS). O lipídeo A é a região da molécula de endotoxina responsável pelo seu efeito tóxico (Morrison e Kline⁴²).

As endotoxinas não causam lesões celulares ou teciduais diretamente, entretanto elas estimulam células competentes como

macrófagos, neutrófilos e fibroblastos, desencadeando a liberação de um grande número de mediadores químicos inflamatórios bioativos ou citocinas, causando uma série de efeitos biológicos que levam a uma reação inflamatória, imunológica e reabsorção óssea periapical (Mattison et al.³⁶; Wang e Stashenko⁷⁷; Yamasaki et al.⁸¹). Entre todos os animais, o humano é o mais sensível aos efeitos da endotoxina (Wolff⁸⁰).

No sangue e nos tecidos as endotoxinas ligam-se ao receptor CD-14 na superfície de monócitos e macrófagos, e estas células ativadas secretam interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8) (Matsushita et al.³⁷), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) (Barthel et al.²; Stashenko⁶⁶), superóxido (O₂), óxido nítrico, interferons α , β e γ , e moléculas lipídicas como o fator ativador de plaquetas e prostaglandinas (Leonardo et al.³⁰). As endotoxinas ainda podem contribuir para um aumento na liberação de substâncias vasoativas neurotransmissoras na região das terminações nervosas dos tecidos periapicais, conduzindo à ocorrência da dor (Seltzer e Farber⁶⁰). As endotoxinas ativam o sistema complemento (Morrison e Kline⁴²; Horiba et al.²⁵) e o fator de Hageman (fator XII da cascata da coagulação) (Leonardo et al.³¹).

Além da reação inflamatória, o LPS adere-se de forma irreversível nos tecidos mineralizados da região apical e periapical (osso e cimento) (Schein e Schilder⁵⁹), agindo como um potente estimulador da reabsorção óssea, atuando na síntese e liberação de citocinas como a interleucina-1 α , interleucina-1 β e fator de necrose tumoral (TNF) (Wang e Stashenko⁷⁷). O LPS também estimula as células do hospedeiro na liberação de prostaglandina-E2 (Safavi e Nichols⁵⁶), a qual tem influência sobre os osteoclastos, perpetuando a reação inflamatória periapical (Leonardo³⁰). Além disto, a endotoxina é capaz de se difundir pelos túbulos dentinários em direção ao cimento em 24 horas (Oliveira et al.⁴⁷).

Uma importante correlação entre os níveis de endotoxina e sintomologia clínica da polpa e dos tecidos periapicais tem sido demonstrada (Horiba et al.²³; Schein e Schilder⁵⁹). Dessa forma, estudos

têm sugerido que as endotoxinas representam um dos principais fatores etiológicos envolvidos nas patologias pulpares e periapicais (Jacinto et al.²⁶; Mattison et al.³⁶; Pitts et al.⁵³).

Assim, nos dias atuais, o tratamento endodôntico de dentes portadores de necrose pulpar e reação periapical crônica, não deve ter como objetivo apenas a eliminação dos microrganismos, mas sim a inativação de suas endotoxinas e demais produtos tóxicos. Para estudar esta ação, utilizam-se vários microrganismos anaeróbios Gram-negativos. Entretanto, apesar de *Escherichia coli* não ser uma bactéria comumente encontrada no interior de canais radiculares com polpa necrosada, sua endotoxina apresenta a estrutura básica do componente lipídico, que representa o centro ativo responsável pela toxicidade do LPS. Assim, esta bactéria é adequada para estudos que avaliam substâncias capazes de neutralizar endotoxinas.

Sabe-se que é objetivo do preparo biomecânico a limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares, acompanhado da preservação da sanificação obtida pela utilização de substâncias químicas auxiliares, medicação intracanal e cimentos obturadores. Entretanto, é possível que, mesmo após a remoção dos microrganismos, endotoxinas, capazes de induzir ou manter lesões periapicais, permaneçam no sistema de canais radiculares predispondo o tratamento endodôntico ao insucesso (Leonardo³⁰).

Durante o preparo biomecânico, várias substâncias químicas têm sido utilizadas como soluções irrigadoras ou associadas a ela. Devido a uma série de propriedades, como capacidade de dissolver matéria orgânica, ação lubrificante e neutralização de conteúdo tóxico, o hipoclorito de sódio é atualmente a substância mais utilizada durante a instrumentação e irrigação de canais radiculares (Leonardo³⁰; Menezes et al.³⁸; Okino et al.⁴⁶; Siqueira Junior et al.⁶³; Tanomaru et al.⁷¹, 2005; Valera et al.⁷⁴). Entretanto, a utilização de altas concentrações do hipoclorito de sódio pode causar irritação aos tecidos periapicais

(Leonardo³⁰; Öñçag et al.⁵¹; Soares et al.⁶⁴). Por este motivo, soluções alternativas têm sido propostas visando à associação de efetividade antimicrobiana e biocompatibilidade.

Outra substância que tem sido utilizada é a clorexidina 2%, em função de seus efeitos antimicrobianos, ação residual e biocompatibilidade (Ferreira et al.¹⁹; Leonardo³⁰; Leonardo et al.³³; Tanomaru et al.⁷¹; Weber et al.⁷⁸; White et al.⁷⁹). Embora o hipoclorito de sódio e a clorexidina, sejam comumente utilizadas na prática endodôntica, não têm sido verificada a efetividade destas substâncias sobre a endotoxina durante o preparo biomecânico do canal radicular (Oliveira et al.⁴⁸; Tanomaru et al.⁷⁰). Dessa forma, seria interessante avaliar a ação antimicrobiana e sobre endotoxina destas substâncias químicas associadas ou não a medicações intracanaís.

O hidróxido de cálcio tem sido amplamente utilizado como medicação intracanal devido às suas propriedades antimicrobianas (Leonardo³⁰; Leonardo et al.³²), capacidade de induzir a mineralização (Leonardo et al.³⁰) e principalmente tem demonstrado efetiva ação sobre LPS (Leonardo et al.³¹; Nelson Filho et al.⁴³; Oliveira et al.⁴⁹; Safavi & Nichols^{56,57}; Silva et al.⁶²; Tanomaru et al.⁷⁰).

A associação hidróxido de cálcio e clorexidina a 2% vem sendo utilizada como medicação intracanal com promissoras perspectivas (Menezes et al.³⁹; Soares et al.⁶⁵). Estudos mostram que esta associação apresenta satisfatória atividade antimicrobiana e reparadora, além da efetividade sobre endotoxinas presentes no canal radicular (Soares et al.⁶⁵).

A polimixina B é um antibiótico polipeptídico catiônico que age primariamente na parede celular de bactérias Gram-negativas, levando à mudanças rápidas na permeabilidade da membrana citoplasmática causando a morte celular (Evans et al.¹⁶). Além da atividade antimicrobiana a polimixina B é capaz de neutralizar endotoxinas, bloqueando alguns efeitos biológicos causados por estas

(Corrigan e Bell⁸; Craig et al.⁹, 1974; Morrison e Jacobs⁴¹), podendo ser utilizada como medicação intracanal, sendo eficiente em neutralizar o LPS em canais radiculares (Oliveira et al.⁴⁹).

A importância da eliminação de microrganismos e seus produtos do interior do sistema de canais radiculares em relação ao sucesso do tratamento endodôntico justificam a busca constante de medicamentos capazes de eliminar estes microrganismos. Uma vez que bactérias Gram-negativas estão presentes em canais radiculares, e que estas liberam endotoxinas com potente ação citotóxica durante sua duplicação ou morte celular, levando a uma reação inflamatória, imunológica e reabsorção óssea periapical, faz-se necessário o estudo de substâncias químicas utilizadas durante a terapia endodôntica que possam eliminar estes microrganismos e neutralizar estas substâncias flogísticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Endotoxina (Lipopolissacarídeo)

Schein e Schilder⁵⁹, em 1975, realizaram um estudo *in vivo* para detectar e quantificar os níveis de endotoxina em dentes que necessitavam de tratamento endodôntico. Foram selecionados 40 pacientes divididos em grupos clínicos e grupos radiográficos. Os grupos clínicos foram: dentes com vitalidade, sem sintomas; dentes com vitalidade, com sintomatologia dolorosa; dentes sem vitalidade, sem sintomas e dentes sem vitalidade, com sintomatologia. Os grupos radiográficos foram: dentes sem áreas radiolúcidas e dentes com áreas radiolúcidas visíveis nas radiografias periapicais. Após a abertura coronária foi colocado dentro da câmara pulpar 0,1 ml de solução salina apirogênica. Esta solução foi agitada com o auxílio de uma lima Kerr. Com a utilização de uma nova seringa com pressão negativa, foi realizada a coleta de 0,1 ml do canal radicular. Cada amostra coletada foi depositada em um tubo de ensaio contendo 1 ml de solução salina apirogênica. Foi utilizado o teste lisado do amebócito de *Limulus* (LAL) para detecção de endotoxina. Os resultados mostraram diferença estatística significativa nos casos de dentes com e sem vitalidade, presença e ausência de sintomas e presença ou não de lesões periapicais radiograficamente visíveis. As maiores quantidades de endotoxina estavam presentes em dentes sem vitalidade, com sintomatologia dolorosa e lesões periapicais radiograficamente visíveis. Os autores enfatizam a importância da endotoxina liberada pelas bactérias Gram-negativas, sendo fator importante nas doenças pulpares e periapicais.

Dahlén e Bergenholtz¹¹, em 1980, avaliaram a microbiota e a presença de endotoxina de 13 dentes com necrose pulpar utilizando o teste Lisado do amebócito de *Limulus*. Sinais clínicos como dor, edema, fístula e sensibilidade à percussão, foram registrados. Nove dentes apresentavam microrganismos e quatro estavam ausentes de microrganismos. Oito dentes apresentaram a microbiota constituída de bactérias Gram-negativas. O teste LAL foi positivo em todas as amostras constituídas de bactérias Gram-negativas, enquanto que foi negativo para as amostras que apresentavam apenas bactérias Gram-positivas e aquelas em que não houve crescimento bacteriano. Os autores concluíram que a atividade endotóxica está correlacionada com a presença e o número de bactérias Gram-negativas viáveis nos canais radiculares, sendo de significância biológica para o desenvolvimento da inflamação periapical.

Dahlén et al.¹², em 1981, avaliaram histologicamente e histoquimicamente a influência de LPS nos tecidos periapicais de macacos. Amostras de endotoxina de *Fusobacterium nucleatum* foram introduzidas em 27 canais radiculares de 4 macacos. Os dentes foram avaliados em 3 meses (grupo 1, 18 dentes) e em 7 meses (grupo 2, 9 dentes). Dezesete dentes foram preenchidos com solução salina (grupo controle). Foram realizadas reações histoquímicas enzimáticas e análise microscópica. Reações inflamatórias ocorreram nos tecidos periapicais de todos os dentes experimentais, com reabsorção óssea e dentária. Mesmo quando a resposta inflamatória foi leve, as células do osso periapical mostraram aumento da atividade enzimática, sugerindo uma atividade de reabsorção. Os dentes do grupo controle mostraram ausência ou leve inflamação e ausência ou poucas reações enzimáticas. Os autores citam a importância da ativação direta de células ósseas e reabsorção óssea pelo LPS, quando comparada a perda de osso vista apenas como

resultado da inflamação, sugerindo que o LPS pode induzir a destruição óssea *in vivo*, não obstante na presença de inflamação.

Pitts et al.⁵³, em 1982, avaliaram *in vivo* o efeito da endotoxina nos tecidos periapicais de dentes de cães. Os canais radiculares do grupo experimental foram preenchidos com endotoxina de *Salmonella minnesota* e os canais radiculares do grupo controle foram preenchidos com solução salina estéril. Estes grupos foram subdivididos em dentes com ápice perfurado e dentes com ápice não perfurado. Foi realizado acompanhamento radiográfico semanalmente e análise radiográfica após a quarta (dentes com ápices perfurados) e quinta (dentes com ápices não perfurados) semana. Na análise radiográfica e histológica dos dentes com ápice perfurado que receberam endotoxina foram verificadas lesões periapicais, maior resposta inflamatória e maior destruição óssea do que naqueles que receberam somente solução salina. Entretanto na análise dos dentes sem ápices perfurados, o grupo experimental e o grupo controle foram semelhantes, apresentando pouca ou nenhuma mudança radiográfica e histológica. Assim, os autores sugerem que a endotoxina pode ter um papel na inflamação periapical e na reabsorção óssea.

Mattison et al.³⁶, em 1987, compararam o efeito da endotoxina de *Eikenella corrodens* com a de *Escherichia coli* na região periapical de dentes de cães. Esta comparação é devido às estruturas químicas destas bactérias serem diferentes entre si. Foram utilizados para este estudo 28 terceiros e quartos pré-molares de cães. Após a instrumentação dos canais radiculares, 42 raízes receberam endotoxina de *E. corrodens*, 8 raízes receberam endotoxina de *E. coli* (controle positivo) e 6 raízes receberam água apirogênica (controle negativo). As raízes foram seladas com uma bolinha de algodão estéril e cimento de óxido de zinco e eugenol. Estes procedimentos foram realizados

semanalmente durante 4 semanas. A análise radiográfica mostrou que 90,4% dos canais radiculares tratados com endotoxina de *E. corrodens* e 75% dos canais tratados com *E. coli* exibiram lesões periapicais. Os resultados da análise histológica das lesões de *E. corrodens* e *E. coli* foram semelhantes, apresentando extensiva reabsorção óssea, reabsorção radicular externa e presença de infiltrado inflamatório intenso. A inflamação aguda foi observada centralmente e a crônica perifericamente. No grupo controle negativo foi verificado um espessamento suave do ligamento periodontal e presença de infiltrado inflamatório leve. Os autores evidenciaram que a endotoxina de bactérias Gram-negativas é o fator principal para iniciar e perpetuar a inflamação e reabsorção óssea.

Horiba et al.²⁴, em 1990, estudaram a distribuição da endotoxina na parede dentinária de canais radiculares infectados. Amostras das paredes radiculares desde a superfície pulpar do canal até o lado cementário foram preparadas por um método abrasivo. Para tanto, utilizaram 30 dentes humanos recém-extraídos (5 dentes sadios e 25 dentes com canais radiculares infectados). As coroas foram desprezadas e as raízes seccionadas ao meio, no sentido longitudinal. Em seguida, foram novamente seccionadas verticalmente de forma a obter uma espessura de 1 mm. Foi realizada outra secção, no sentido transversal, também com 1 mm de espessura, obtendo assim, um bloco de raiz com área aproximada de 1 mm². Um método abrasivo foi utilizado para obter uma série de pó de dentina, de cada espécime, progressivamente da dentina da superfície pulpar até o cimento. Após a medida da quantidade de pó de todos os espécimes, foi acrescentado 1 ml de água destilada apirogênica ao pó. A endotoxina foi extraída com ácido cítrico e a quantidade mensurada por um método colorimétrico. A quantidade de endotoxina foi significativamente maior nos dentes com canais radiculares infectados do que nos dentes sadios em todas as camadas. Nos canais

radiculares infectados, a quantidade de endotoxina foi significativamente maior nas amostras de dentina próximas da superfície pulpar, até 300 μm , do que em amostras de 301 a 800 μm .

Horiba et al.²³, em 1991, realizaram um estudo *in vivo* para avaliar a correlação entre a quantidade de endotoxina e sinais e sintomas clínicos e radiográficos. Foram analisados 30 dentes de pacientes com periodontite apical. As coletas das amostras dos canais radiculares foram realizadas através de cones de papéis estéreis mantidos no canal radicular por 1 min. para absorção do exsudato. O teste utilizado para quantificação da endotoxina foi o Gel Clot. Os resultados mostraram que a quantidade de endotoxina foi muito maior em dentes sintomáticos do que em assintomáticos. Em dentes com presença de área radiolúcida e exsudato, a quantidade de endotoxina encontrada também foi significativamente maior. A endotoxina foi detectada em 19 dos 20 dentes com exsudato (ambos exsudatos purulento e seroso). Os autores indicaram uma correlação positiva entre a endotoxina e sinais clínicos ou áreas radiolúcidas. Evidenciaram ainda que dentes infectados com grande quantidade de endotoxina podem estar associados com aumento da doença periapical.

Horiba et al.²⁵, em 1992, investigaram a ativação do sistema complemento pelo LPS purificado de *Porphyromonas endodontalis*, *Veillonella parvula* e *Fusobacterium nucleatum* isolados de canais radiculares infectados. A quantificação do C3 foi escolhida para avaliar a ativação do sistema complemento pelo LPS. Os resultados mostraram que quando 1 μg de LPS foi adicionada ao soro humano, o consumo de C3 foi menor que 10% para o LPS de todas as espécies bacterianas. Quando 10 μg de LPS foram adicionados, o consumo de C3 foi aumentado de 15 a 25% para *P. endodontalis* e *F. nucleatum*. Quando 50 μg de cada LPS foi adicionado, o consumo foi maior que 60% para *P.*

endodontalis e *V. parvula*. E com 100 µg de LPS, o consumo foi maior que 70% para *P. endodontalis* e *F. nucleatum*. O consumo de C3 foi similar para os LPSs das quatro espécies bacterianas. Assim, a taxa de consumo de C3 aumenta notavelmente quando mais de 10 µg de LPS foi adicionado ao soro humano.

Yamasaki et al.⁸¹, em 1992, propuseram um estudo para quantificar a endotoxina e identificar bactérias Gram-negativas em lesões periapicais experimentais em ratos. Os canais radiculares foram expostos ao ambiente oral e a quantidade de endotoxina no tecido periapical do primeiro molar inferior direito foi quantificada e, o número de colônias de bactérias Gram-negativas foi determinado na mesma região do primeiro molar inferior esquerdo. Os períodos avaliados foram: 1, 3, 7, 14, 21, 28, 42, 56 e 70 dias após a exposição pulpar. Os resultados mostraram que a quantidade de endotoxina nos tecidos periapicais aumentou gradualmente do 1º ao 70º dia. Bactérias Gram-negativas foram isoladas dos tecidos periapicais e sua quantidade aumentou gradualmente do 1º ao 14º dia (26 a 82%), entretanto, aos 21 dias houve uma diminuição (41%) e dos 28º ao 70º dia, houve um pequeno acréscimo novamente, 60%. Os autores concluíram que a quantidade de endotoxina nos tecidos periapicais aumentou gradualmente com o aumento do tempo e que o aumento no número de bactérias não foi proporcional ao aumento da quantidade de endotoxina.

Wang e Stashenko⁷⁷, em 1993, estudaram o papel da interleucina-1α (IL-1α) na patogênese da destruição óssea periapical num modelo experimental em ratos. Esses animais tiveram seus canais expostos à cavidade oral para indução de lesão periapical. Extratos de tecidos das lesões inflamatórias ativas contendo altos níveis de atividade de reabsorção óssea foram avaliados. Pela cromatografia de filtração de gel dos extratos de lesões ativas, foi demonstrado que a maior atividade

estava associada a moléculas de peso molecular de 30-60 kDa e 15-20 kDa, que são consistentes com citocinas envolvidas na reabsorção óssea como IL-1 α e Fator de Necrose Tumoral (TNF). A inibição com anti-citocina específica demonstrou que a atividade de reabsorção das lesões ativas foi significativamente neutralizada por anti-IL-1 α , enquanto que anti-IL- β , anti-TNF- α e anti-TNF- β apresentaram apenas efeitos moderados. Os extratos de lesões crônicas apresentaram baixa atividade de reabsorção, a qual também foi neutralizada apenas por anti-IL-1 α . Assim, os dados deste estudo indicaram que a reabsorção óssea estimulada por infecção bacteriana foi principalmente mediada por IL-1 α neste modelo.

Nissan et al.⁴⁵, em 1995, verificaram *in vitro* a penetração da endotoxina na dentina de dentes humanos. Foram preparadas 5 cavidades Classe I com 0,5 mm de espessura de parede pulpar. Foi introduzido 0,1 ml de endotoxina na concentração de 100 μ g/ml no interior da cavidade oclusal e 0,1 ml de água apirogênica foi adicionada na câmara pulpar. Foi removido 0,1 ml das amostras da câmara pulpar após 15 e 30 minutos e em intervalos de 30 min. durante 5 h. Uma amostra final foi coletada 24 h após o início do experimento. A presença de endotoxina foi determinada pelo método do lisado do amebócito de *Limulus*. Em quatro espécimes, o aparecimento inicial de endotoxina na câmara pulpar variou de 15 min. a 4h30 min. Em um espécime nenhuma endotoxina foi detectada na câmara pulpar durante o período testado (24h). Os resultados indicaram que a endotoxina foi capaz de penetrar 0,5 mm de dentina em um curto período de tempo.

Matsushita et al.³⁷, em 1999, verificaram a produção de citocinas (IL-1 β , IL-6, e IL-8) pelo LPS de bactérias melaninogênicas ou não em preparo de cultura de sangue humano de pacientes. Os estudos foram realizados em culturas de sangue humano de seis pacientes com diferentes números de lesões periapicais. Quatro pacientes apresentavam

10 ou mais lesões periapicais visíveis radiograficamente (grupo com mais lesões), seis pacientes apresentavam uma ou duas lesões (grupo com menos lesões) e seis pacientes não apresentavam lesões (grupo sem lesão). Foram utilizados LPS de bactérias melaninogênicas (*Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*) e não melaninogênicas (*Fusobacterium nucleatum* e *Escherichia coli*). As concentrações das citocinas foram determinadas pelo teste ELISA. Os resultados mostraram que o LPS de *F. nucleatum* e *E. coli* induziram uma resposta elevada de IL-1 α nos pacientes com mais lesões quando comparado com as outras bactérias e com os outros grupos. Na produção de IL-6 foi observada uma resposta elevada ao LPS de todas as bactérias, principalmente de *F. nucleatum* e *E. coli*, no grupo com mais lesões. Entretanto, diferenças significantes na indução de IL-8 foram notadas entre o grupo com mais lesões e os outros dois grupos, especificamente na resposta ao LPS das bactérias melaninogênicas. Assim, os autores sugerem que o LPS de bactérias melaninogênicas pode estar envolvido em múltiplas lesões periapicais pela indução de citocinas, particularmente a IL-8.

Safavi e Nichols⁵⁸, em 2000, avaliaram os efeitos do muramilo dipeptídeo (MDP), um componente da parede celular tanto de bactérias Gram-negativas como de Gram-positivas, na liberação de citocinas pelos monócitos. Culturas de monócitos humanos foram tratadas com MDP ou LPS e quantidades de interleucina-1 β (IL-1 β) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) foram medidos nos sobrenadantes utilizando o teste ELISA. Os resultados mostraram que a quantidade de citocinas liberadas no grupo das células tratadas com MDP foi significativamente menor que no grupo tratado com LPS.

Khabbaz et al.²⁸, em 2000, realizaram um estudo *in vivo* para: determinar a presença de endotoxinas em lesões cariosas de

dentes sintomáticos (pulpite irreversível) e assintomáticos (pulpite irreversível); quantificar a endotoxina presente e associar a presença de endotoxinas com a dor aguda derivada de pulpites irreversíveis. Os grupos foram divididos em, G1: 9 dentes com pulpite irreversível; G2: 11 dentes com pulpite reversível e G3: 4 dentes hígidos. Nos dentes com lesões cariosas foram coletadas duas amostras. A primeira amostra foi coletada da camada superficial da cárie e a segunda amostra de uma camada mais profunda. Os testes foram realizados pelo teste cromogênico do Lisado do amebócito de *Limulus*. Os resultados mostraram que todas as amostras coletadas das lesões cariosas apresentaram endotoxina, entretanto, a quantidade de endotoxina foi significativamente maior na superfície da lesão, tanto nos dentes sintomáticos como nos assintomáticos. No grupo 3 (dentes hígidos) não foi detectada endotoxina. A quantidade de endotoxina também foi significativamente maior nos dentes sintomáticos.

Khabazz et al.²⁹, em 2001, verificaram a presença de endotoxina em tecidos pulpaes de dentes cariados sintomáticos e assintomáticos. Os autores associaram a presença de grandes quantidades de endotoxinas com a severidade da dor pulpar e sugeriram que estas podem ser o principal fator na patogênese de doenças pulpaes.

Nelson Filho et al.⁴³ (2002) e Silva et al.⁶² (2002) avaliaram radiograficamente e histopatologicamente a região apical e periapical de dentes de cães submetidos à aplicação de endotoxina, associada ou não ao hidróxido de cálcio. Foram utilizados 60 pré-molares que foram divididos em 4 grupos: dentes somente com endotoxina (grupo 1), dentes com endotoxina mais hidróxido de cálcio (grupo 2), dentes com solução salina (grupo 3) e dentes submetidos à contaminação oral com lesões periapicais sem nenhum tratamento (grupo 4). Os dentes dos

grupos 1, 2 e 3 foram selados com cimento de óxido de zinco e eugenol por um período de 30 dias. No grupo 4, os canais radiculares foram expostos na cavidade oral por 5 dias e após foram selados com cimento de óxido de zinco e eugenol. A avaliação radiográfica mostrou lesões periapicais, perda da integridade da lâmina dura e áreas circunscritas de reabsorção óssea periapical foram observadas no grupo 1. No grupo 2, a lâmina dura continuou intacta. No grupo 3, os dentes apresentaram ligamento periodontal normal. No grupo 4, todos os dentes apresentaram perda da integridade da lâmina dura e áreas extensas e difusas de reabsorção óssea. Na avaliação histopatológica, os grupos 1 e 4 foram semelhantes. Os resultados mostraram reabsorção do cimento apical, infiltrado inflamatório severo e extensivas áreas de reabsorção ativas. Nos grupos 2 e 3, os resultados mostraram aspecto normal na região apical e periapical, ausência de infiltrado inflamatório e formação de fibras colágenas e de tecido mineralizado. Os autores concluíram que a endotoxina causa lesões periapicais visíveis radiograficamente, mas quando associada ao hidróxido de cálcio, a endotoxina fica desprovida de ação tóxica.

Oliveira et al.⁴⁷, em 2005, avaliaram *in vitro* a capacidade e o tempo necessário para a endotoxina se difundir pelos túbulos dentinários em direção ao cimento. Foram utilizados 30 dentes humanos unirradiculados que foram posicionados em tubos de vidro apirogênicos e divididos em 2 grupos: um grupo foi inoculado uma solução de endotoxina de *E. coli* no canal radicular e no outro grupo foi inoculado água apirogênica nos canais radiculares. Um mililitro de água apirogênica foi colocado em cada tubo de vidro. Após 30 min., 2, 6, 12, 24, 48, 72 h e 7 dias, a água do interior dos tubos foi removida e substituída por outra. A alíquota removida foi testada para detectar presença de endotoxina através da produção de anticorpos (IgM) em cultura de linfócitos B. Os resultados mostraram que a água removida dos tubos após 24, 48, 72 h e

7 dias induziu maior produção de anticorpos em relação aos demais grupos. Assim, os autores puderam concluir que a endotoxina foi capaz de se difundir pelos túbulos dentinários em direção ao cimento, atingindo a região externa da raiz após 24 horas.

Jacinto et al.²⁶, em 2006, realizaram um estudo *in vivo* para quantificar a concentração de endotoxina em canais radiculares necróticos e investigar a possível relação entre a concentração da endotoxina e sinais e sintomas clínicos. Foram coletadas 50 amostras de dentes com necrose pulpar. Foi utilizada técnica de anaerobiose para determinar o número de unidade formadora de colônia em cada amostra e o teste lisado do amebócito de *Limulus* para quantificação da endotoxina. Em todas as amostras coletadas foram detectados microrganismos e endotoxinas. Em amostras de casos com dor espontânea, a quantidade de UFC foi 1.43×10^6 enquanto que em casos assintomáticos foi 9.1×10^4 . A quantidade maior de endotoxina foi detectada em pacientes com dor espontânea e a menor quantidade nos casos de pacientes com ausência de dor. Os autores sugerem, de acordo com os resultados deste estudo, que a endotoxina está presente em altas concentrações em canais radiculares de dentes sintomáticos e que há uma relação positiva entre a concentração de endotoxina no canal radicular e a presença de sinais e sintomas.

2.2 Substâncias químicas auxiliares: hipoclorito de sódio e clorexidina

Buttler et al.⁶, em 1982, investigaram a efetividade *in vitro* de três concentrações diferentes de NaOCl (0,5%; 2,7%; 5,2%) na neutralização de dois tipos de endotoxina (*Escherichia coli* e *Salmonella*

typhosa). Amostras de 1 ml de cada concentração do NaOCl foram colocadas em contato com 1 ml de solução de endotoxina (0,1 ng/ml; 1 ng/ml; 100 ng/ml) durante 1 hora em temperatura ambiente. O teste lisado do amebócito de *Limulus* foi utilizado para determinar a quantidade de endotoxina. Os resultados indicaram que as três concentrações foram igualmente efetivas em neutralizar completamente todas as amostras de endotoxina (100 ng/ml). Neste mesmo estudo, os autores desenvolveram um piloto *in vivo*. Esta investigação foi realizada em coelhos e a resposta dérmica foi avaliada pela injeção intradérmica das combinações endotoxina-NaOCl citadas anteriormente. As combinações foram as mesmas, exceto no tipo e na concentração da endotoxina (*E. coli*, 2 µg/ml). Os resultados indicaram que NaOCl 0,5% e 2,7% não foram capazes de neutralizar maior quantidade de endotoxina de *E. coli*. Utilizando o NaOCl 5,2% os resultados mostraram-se inconclusivos. Os autores concluíram que 1 ml de NaOCl 0,5% ou 2,7% é capaz de neutralizar pequenas quantidades de endotoxina, entretanto, não neutraliza grandes quantidades de endotoxina.

Haight-Ponce et al.²², em 1999, investigaram a atividade de união da endotoxina (*E. coli*) ao pó de dentina pré-tratada com hipoclorito de sódio 10% e peróxido de hidrogênio 3%. Amostras de pó de dentina de dentes humanos recém-extraídos foram coletadas utilizando limas tipo K 15, 20 e 25, colocadas num frasco com 100 µl de água destilada apirogênica e estocadas sob refrigeração de 4°C. A endotoxina foi diluída em três concentrações (10 ng/ml, 1 ng/ml e 100 ng/ml). Uma microplaca foi dividida em três grupos (A, B e C) e cada grupo foi subdividido em dois subgrupos, sendo que no primeiro subgrupo foi colocado, nos orifícios das placas, 100 µl de água apirogênica e no segundo subgrupo 100 µl da solução contendo o pó de dentina. Foi adicionado ao grupo A, 100 µl de peróxido de hidrogênio 3%; ao grupo B, hipoclorito de sódio 10% e ao grupo C, água destilada (controle positivo).

Em seguida, a endotoxina foi acrescentada nos orifícios da placa. O teste lisado de amebócito de *Limulus* foi usado para determinar a quantidade de endotoxina. Os períodos avaliados foram 1, 10 e 30 min. A atividade de união da endotoxina foi significativamente menor no pó de dentina tratada com hipoclorito de sódio 10% do que na tratada com peróxido de hidrogênio 3% a 1 e a 10 min. A atividade de união da endotoxina foi mais baixa no período de 30 min. Os autores concluíram que o pré-tratamento com NaOCl 10% foi efetivo em suprimir a união da endotoxina às amostras, mesmo quando utilizado por 1 minuto.

Leonardo et al.³⁴, em 1999, avaliaram *in vivo* a atividade antimicrobiana e residual da clorexidina 2% como solução irrigadora. Foram utilizados 22 dentes com necrose pulpar e lesões periapicais visíveis radiograficamente que, após a abertura coronária, foi realizada a primeira coleta com cone de papel estéril. Os canais foram instrumentados utilizando a solução de clorexidina 2%. Uma bolinha de algodão estéril foi colocada na entrada do canal radicular e a cavidade selada com cimento de óxido de zinco e eugenol. Após 48h, foi realizada a segunda coleta para avaliação microbiológica. Na segunda coleta os resultados mostraram 100% de redução do *Streptococcus mutans* e 77,78% para os microrganismos anaeróbios. Os autores observaram que a clorexidina previne a atividade microbiana com efeitos residuais até 48h, sugerindo um possível efeito sinérgico com a medicação intracanal sobre microrganismos em áreas inacessíveis a instrumentação ou ainda em possíveis reinfecções ou infecções secundárias após a instrumentação, especialmente nos túbulos dentinários.

Siqueira Junior et al.⁶³, em 2000, realizaram um estudo *in vitro* com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (1%, 2,5% e 5,25%) durante a instrumentação e irrigação de canais radiculares previamente contaminados com *Enterococcus faecalis*. Foram realizadas

coletas antes e após a instrumentação. Os resultados mostraram que todas as soluções testadas reduziram significativamente o número de bactérias (99,9% em número absoluto), entretanto, não houve diferença estatística significativa entre as concentrações testadas. O estudo mostrou que, apesar de não haver diferença significativa na efetividade do hipoclorito de sódio nas diversas concentrações, a eficácia de soluções mais fracas diminui rapidamente. Entretanto, se o volume utilizado e o número de trocas forem aumentados, pode-se conseguir a efetividade antimicrobiana desejada, compensando assim, a baixa concentração da solução. Os autores sugeriram que o uso da solução de hipoclorito de sódio em altas concentrações é questionável, pois a mesma efetividade pode ser obtida através da irrigação copiosa com múltiplas trocas do hipoclorito de menor concentração.

Buck et al.⁵, em 2001, avaliaram o efeito de soluções irrigadoras e hidróxido de cálcio na degradação do LPS. As soluções irrigadoras testadas foram: hipoclorito de sódio 2,6%, clorexidina 0,12%, EDTA 15% e suspensão aquosa de hidróxido de cálcio 24,6mg/ml, água apirogênica e etanol 95%. Uma solução aquosa de endotoxina foi misturada com cada solução irrigadora por 30 minutos. Associações com estas soluções também foram testadas: hipoclorito de sódio 2,6% mais clorexidina 0,12%; e clorexidina 0,12%, hipoclorito de sódio 2,6% mais etanol 95%. A neutralização da endotoxina foi quantificada pela liberação de ácidos graxos livres. Os resultados mostraram que o hipoclorito de sódio, a água, o EDTA, o etanol e a clorexidina mais hipoclorito de sódio demonstraram pequena ou nenhuma degradação da endotoxina. Entretanto, o hidróxido de cálcio e a associação clorexidina, hipoclorito de sódio e etanol e detoxificaram moléculas do LPS pela hidrólise de ligações éster das cadeias de ácidos graxos do lipídio A.

Ferraz et al.¹⁸, em 2001, avaliaram a atividade antimicrobiana e a limpeza dos túbulos dentinários da clorexidina gel 2% baseada em natrosol como substância química auxiliar. Foram avaliados também hipoclorito de sódio 5,25%, solução de clorexidina 2%. Setenta dentes humanos foram contaminados com *E. faecalis* por 7 dias e a atividade antimicrobiana foi avaliada pela turbidez de tubos contendo meio BHI. Os resultados mostraram que a clorexidina gel teve maior número de tubos negativos, entretanto, sem diferença estatística entre as soluções testadas. A limpeza dos túbulos dentinários foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados indicaram que a clorexidina gel 2% produziu a melhor limpeza da superfície do canal radicular, com quase todos os túbulos dentinários abertos. As outras duas soluções testadas apresentaram *smear layer*, cobrindo a abertura dos túbulos dentinários. Assim, os autores sugerem que a clorexidina 2% na forma de gel tem potencial para ser utilizada como substância química auxiliar ao preparo biomecânico.

Tanomaru Filho et al.⁷², em 2002, avaliaram a reposta inflamatória do NaOCl 0,5% e da clorexidina 2% injetados na cavidade peritoneal de ratos. Um grupo controle foi realizado com injeção de solução salina com tamponada com fosfato. Os períodos avaliados foram 4, 24, 48 e 168 h após a injeção. O líquido da cavidade peritoneal de cada animal foi coletado para avaliação do número de neutrófilos, células mononucleares e infiltração de proteínas como parâmetro de edema. Os resultados mostraram que no grupo do NaOCl 0,5% houve maior migração de neutrófilos e células mononucleares de 48 a 168 h e maior infiltração de proteínas 4 a 48 h, enquanto que o grupo da clorexidina 2% e o controle mantiveram um número de neutrófilos, células mononucleares e infiltração de proteínas semelhantes em todos períodos avaliados. Os autores concluíram que o NaCl 0,5% causou irritação tecidual induzindo resposta inflamatória significativa. Por outro lado, a

clorexidina 2% foi biocompatível nos tecidos, sendo portanto, uma alternativa para auxiliar a instrumentação dos canais radiculares.

Weber et al.⁷⁸, em 2003, avaliaram *in vitro* o efeito da ativação passiva ultra-sônica do hipoclorito de sódio 5,25% e da clorexidina 2% sobre atividade antimicrobiana residual dos mesmos. Foram utilizados 94 dentes humanos extraídos que foram instrumentados e irrigados utilizando hipoclorito de sódio 5,25% e clorexidina 2% que receberam ou não ativação ultra-sônica por 1 minuto. O conteúdo do interior dos canais radiculares foi transferido para placas inoculadas com *Streptococcus sanguinis* e observaram-se os halos de inibição de crescimento. Os autores verificaram que o efeito residual da clorexidina é superior ao do hipoclorito de sódio com ou sem ativação final com ultrassom, podendo chegar até 168 horas.

Önçag et al.⁵¹, em 2003, compararam a atividade antimicrobiana e a toxicidade do NaOCl 5,25%, clorexidina 2% e da clorexidina 0,2% + 0,2% cetrimide. A atividade antimicrobiana das soluções testadas foi avaliada *in vitro* em dentes humanos unirradiculados contaminados com *E. faecalis* por 24 h. Os canais foram instrumentados com as soluções irrigadoras e deixados vazios por 48 h. O crescimento bacteriano foi avaliado após 5 min. da instrumentação e após 48 h. Os efeitos tóxicos destas soluções foram avaliadas pela injeção das mesmas em tecido subcutâneo de ratos e a reação inflamatória foi acompanhada após 2 e 48 h e 2 semanas. No estudo *in vitro*, os resultados mostraram que a clorexidina 2% e a clorexidina 0,2% + 0,2% cetrimide foram significativamente mais efetivas que o NaOCl 5,25% após 5 min., entretanto após 48 h, as soluções não apresentaram diferença estatística entre si. Na avaliação dos efeitos tóxicos, reação inflamatória moderada foi observada no grupo do NaOCl nos 3 períodos avaliados. Os grupos da clorexidina e da clorexidina 0,2% + 0,2% cetrimide apresentaram reação

inflamatória moderada, entretanto, após 48 h, houve uma diminuição dessa reação. Os autores concluíram que a clorexidina 2% e a clorexidina 0,2% + 0,2% cetrimide foram mais efetivos sobre *E. faecalis* e menos tóxicos que a solução de NaOCl 5,25%.

Okino et al.⁴⁶, em 2004, em um estudo *in vitro* avaliaram a dissolução do tecido pulpar pela solução de clorexidina 2%, gel de clorexidina 2% e diferentes concentrações do hipoclorito de sódio (0,5%, 1% e 2,5%). Os tecidos pulpares foram removidos de dentes bovinos recém extraídos, pesados e colocados em contato com 20 ml de cada substância em um becker. Esses beckers foram colocados em uma centrífuga a 150 r.p.m. até os fragmentos estarem totalmente dissolvidos ou por tempo máximo de 6 h. A velocidade de dissolução foi calculada pelo peso do fragmento pulpar dividido pelo tempo da dissolução. Todas as concentrações do hipoclorito de sódio foram capazes de dissolver o tecido pulpar. Entretanto, tanto a clorexidina gel como a solução não foram capazes de dissolver o tecido no período de 6 h. Verificaram ainda que a velocidade de dissolução varia de acordo com a concentração da solução.

Menezes et al.³⁸, em 2004 avaliaram a efetividade de soluções irrigadoras (hipoclorito de sódio 2,5%, solução de clorexidina 2%) na eliminação de microrganismos do canal radicular. Foram utilizados dentes humanos que foram contaminados com *C. albicans* e *E. faecalis* por 7 dias. Foram realizadas coletas de amostras microbiológicas antes e após o preparo biomecânico. Os resultados mostraram que as duas soluções foram efetivas na eliminação de *C. albicans* após o preparo biomecânico, sem diferença estatística significativa. Entretanto, na eliminação de *E. faecalis*, a clorexidina 2% foi estatisticamente mais efetiva que o hipoclorito de sódio.

Silva et al.⁶¹, em 2004, realizaram um estudo *in vivo* para avaliar histopatologicamente, o efeito do preparo biomecânico de canais radiculares utilizando diferentes soluções irrigadoras sobre LPS inoculado em dentes de cães. As soluções irrigadoras utilizadas foram: solução de hipoclorito de sódio 1, 2,5 e 5% e solução de clorexidina 2%. Após 60 dias, os resultados foram avaliados. Todos os grupos mostraram alterações moderadas na dentina e no cimento, presença de reabsorções ósseas e espessura do ligamento periodontal aumentada, entretanto, sem diferença estatística entre eles. O infiltrado inflamatório foi estatisticamente menos intenso nos grupos do hipoclorito de sódio 5% e de clorexidina 2%. Contudo, as soluções irrigadoras inativaram completamente os efeitos deletérios do LPS. Os autores puderam concluir que o preparo biomecânico coadjuvado por diferentes soluções irrigadoras não inativa completamente a endotoxina.

Tanomaru et al.⁷¹, em 2005, avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana das seguintes soluções irrigadoras: hipoclorito de sódio 1%, 2,5% e 5,25% e clorexidina 1% e 2% (solução) e 2% (gel), sobre seis diferentes cepas de microrganismos (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Foi utilizada a técnica de difusão em ágar pelo método de poço. Todos os materiais estudados foram capazes de inibir as cepas microbianas, sendo que as soluções e gel de clorexidina foram mais eficientes que as soluções de hipoclorito de sódio.

Dametto et al.¹³, em 2005, estudaram a atividade antimicrobiana da clorexidina gel 2%, solução de clorexidina 2% e hipoclorito de sódio 5,25% sobre *Enterococcus faecalis*. Oitenta raízes humanas foram contaminadas com *E. faecalis* por 7 dias. Foram realizadas três coletas dos canais radiculares: antes da instrumentação, imediatamente após a instrumentação e após 7 dias da instrumentação. A

solução e o gel de clorexidina 2% reduziram significativamente a quantidade de microrganismos imediatamente e após 7 dias da instrumentação. O hipoclorito de sódio 5,25% também reduziu a quantidade de *E. faecalis* logo após a instrumentação, entretanto após 7 dias houve um aumento no número de microrganismos. Assim, a clorexidina 2%, gel e solução, foi mais efetiva que o hipoclorito de sódio 5,25%, em manter baixas as unidades formadoras de colônia de *E. faecalis* após 7 dias da instrumentação.

Vianna et al.⁷⁶, em 2006, avaliaram *in vivo* a redução microbiana após o preparo biomecânico de canais radiculares com necrose pulpar. Foram selecionados 32 dentes unirradiculados que foram divididos em 2 grupos. Um grupo utilizou o hipoclorito de sódio 2,5% e o outro grupo, a clorexidina gel 2%. Foram realizadas duas coletas: antes e após a instrumentação. O teste utilizado foi de identificação genética e a técnica de cultura de microrganismos. Os resultados mostraram que tanto o hipoclorito de sódio foi capaz de reduzir 75% dos microrganismos e a clorexidina 50%. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio não tem apenas capacidade de eliminar os microrganismos, mas também de remover células do canal radicular.

Berber et al.⁴, em 2006, avaliaram a eficácia do hipoclorito de sódio 0,5%, 2,5% e 5,25% como solução irrigadora durante a técnica de instrumentação manual e rotatória dos canais radiculares contaminados previamente com *E. faecalis*. Foram utilizados 180 dentes humanos contaminados com *E. faecalis* por 21 dias. Amostras foram coletadas antes e após a instrumentação. Antes do preparo, para a coleta, utilizou-se a técnica do cone de papel. Após, os dentes foram seccionados em três partes e as raspas de dentina foram removidas com brocas para avaliação dos terços. Na técnica do cone, todas as soluções testadas foram efetivas na redução de *E. faecalis*, sem diferença

estatística entre as elas. Em todas as profundidades e terços dos canais radiculares avaliados e para todas as técnicas utilizadas, o hipoclorito de sódio 5,25% mostrou ser a solução irrigadora mais efetiva. As técnicas de instrumentação testadas tiveram o mesmo desempenho. Assim, especialmente em altas concentrações, o hipoclorito de sódio foi capaz de desinfetar os túbulos dentinários, independente da técnica de instrumentação utilizada.

2.3 Medicções intracanaais: hidróxido de cálcio e clorexidina

Safavi e Nichols⁵⁶, em 1993, avaliaram *in vitro* os efeitos do hidróxido de cálcio sobre o LPS. Tubos de vidro contendo uma suspensão aquosa de LPS e hidróxido de cálcio foram agitados por 20 segundos e incubados a 37° C por 7 dias. Os grupos controles foram: LPS, hidróxido de cálcio e água destilada. Foram quantificados os ácidos graxos livres das amostras. Foi observada uma liberação elevada de ácidos graxos nas amostras de LPS tratado com hidróxido de cálcio quando comparado com as demais. Assim, os autores concluíram que o hidróxido de cálcio hidroliza o lipídeo A do LPS, resultando na liberação de ácidos graxos livres, sendo esta uma importante razão para a sua utilização na clínica endodôntica.

Safavi e Nichols⁵⁷, em 1994, investigaram se o tratamento com hidróxido de cálcio altera as propriedades biológicas da endotoxina bacteriana medindo a secreção de prostaglandinas E₂ pelos monócitos humanos. Culturas celulares de monócitos foram estimuladas com LPS ou LPS tratado com hidróxido de cálcio e a cultura de supernadantes foi analisada pela quantidade de prostaglandinas E₂. Prostaglandinas E₂ foram identificadas nos supernadantes dos monócitos estimulados pelo

LPS, entretanto, não foram identificadas no grupo estimulado com LPS associado ao hidróxido de cálcio. Assim, os autores concluíram que o hidróxido de cálcio é capaz de alterar as propriedades biológicas do LPS.

Barthel et al.², em 1997, avaliaram *in vitro* a habilidade do hidróxido de cálcio em neutralizar endotoxina, pela liberação de TNF- α . Quatro concentrações de endotoxina de *E. coli* (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml) foram incubadas com 25 mg de hidróxido de cálcio ou somente água esterilizada (grupo controle). Monócitos foram coletados de sangue periférico por centrifugação e plaqueados a uma densidade de 4×10^6 céls/ml. Os monócitos aderentes foram incubados por 4 dias a 37° C com 5% de CO₂ em meio M199 com 10% de soro autólogo. As diferentes soluções de endotoxina foram adicionadas aos poços no 5º dia. Após 4 horas os supernadantes foram coletados e TNF- α quantificado pelo teste ELISA. Os resultados mostraram diferença estatística significativa entre os valores dos grupos contendo apenas endotoxina (870-1800 pg/ml) com aqueles do grupo controle (1-9 pg/ml) e do grupo pré-tratado com hidróxido de cálcio (5-19 pg/ml). De acordo com estes resultados, os autores puderam concluir que o hidróxido de cálcio é capaz de eliminar a capacidade indutora da endotoxina de *E. coli* de estimular a produção de TNF- α em monócitos periféricos do sangue.

Olsen et al.⁵⁰, em 1999, avaliaram o efeito do hidróxido de cálcio sobre o LPS bacteriano, utilizando um modelo experimental *in vitro*. Alíquotas de sangue total humano foram colocadas em contato com LPS de *Pseudomonas aeruginosa*, nas concentrações de 1000 ng/mL, 100 ng/mL, 10 ng/mL e 1 ng/mL e em seguida, foram tratadas com solução de hidróxido de cálcio, por períodos de tempo variando de 10 minutos a 24 horas. Amostras de sangue colocadas em contato com LPS não exposto ao hidróxido de cálcio foram utilizadas como controle positivo, enquanto que uma solução de hidróxido de cálcio, adicionada ao sangue puro,

serviram como controle negativo. As concentrações de IL-1 β liberadas pelos monócitos foram medidas no soro sobrenadante pelo teste ELISA. Os resultados obtidos evidenciaram que o hidróxido de cálcio reduziu a produção de IL-1 β , em todos os períodos de tempo. No grupo do LPS, os níveis de IL-1 β detectados variaram de 300 a 1500 pg/ml, enquanto que no grupo do LPS tratado com hidróxido de cálcio esses níveis foram semelhantes aos do controle negativo, na ordem de 10-20 pg/ml.

Leonardo et al.³³, em 2002, avaliaram *in vivo* o reparo apical e periapical utilizando o hidróxido de cálcio (Calen – PMCC) como medicação intracanal em diferentes períodos de tempo. Foram utilizados 61 canais radiculares de cães, que após a remoção da polpa, foram expostos à cavidade oral por 7 dias e selados com cimento de óxido de zinco e eugenol por 45 dias. Estabelecidas as lesões periapicais, os dentes foram instrumentados com o auxílio do NaOCl 5,25% e o hidróxido de cálcio foi aplicado. Os períodos avaliados foram 7, 15 e 30 dias. Os autores verificaram em 7 dias a presença de reabsorção cementária e infiltrado inflamatório contendo neutrófilos polimorfonucleares. Em 7 dias também, a espessura do ligamento periodontal foi aumentada devido à intensa reabsorção óssea enquanto que em 15 e 30 dias, a neoformação óssea causou uma diminuição nesta espessura. Em 30 dias a inflamação encontrava-se moderada, sem neutrófilos com intensa neoformação de fibras colágenas indicando uma evolução do processo de reparação. Assim, puderam concluir que os melhores resultados histopatológicos ocorreram de 15 a 30 dias.

Basrani et al.³, em 2002, avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana residual de diferentes medicamentos na dentina humana. Foram inoculadas em 98 raízes as seguintes medicações: 1) clorexidina gel 0,2%; 2) clorexidina gel 2%; 3) solução de clorexidina 2%, 4) hidróxido de cálcio, 5) hidróxido de cálcio + clorexidina gel 0,2. As medicações

foram mantidas no canal radicular durante 7 dias. Após, foram inoculados nos canais *E. faecalis* por 21 dias. Amostras de dentina foram coletadas com o auxílio da broca Gates-Glidden dentro do caldo BHI e o crescimento bacteriano foi avaliado por espectrofotometria após 72 horas de incubação. As densidades ópticas foram significativamente menores para os grupos da clorexidina 2% (1 e 3) quando comparado com todos os outros grupos. Os autores concluíram que a clorexidina 2% possui atividade antimicrobiana residual sobre *E. faecalis* por 7 dias.

Soares et al.⁶⁵, em 2003, avaliaram a ação anti-séptica e reparadora da associação de hidróxido de cálcio e clorexidina a 2% em dentes de cães com lesões periapicais induzidas. Foi realizada a instrumentação automatizada auxiliada pela solução de hipoclorito de sódio 5,25%, seguido da aplicação de uma pasta à base de hidróxido de cálcio P.A. associada à solução de clorexidina 2%, por 21 dias. No grupo controle não foi realizado tratamento endodôntico. Histologicamente, houve redução do infiltrado inflamatório, intensa deposição de fibras colágenas, regeneração óssea e cementária. Microbiologicamente, verificou-se no grupo controle elevada incidência de vários morfotipos microbianos em todos os sítios do sistema de canais radiculares, com biofilme na região periapical, enquanto o grupo experimental apresentou menor padrão de infecção do sistema de canais radiculares e significativa redução da infecção extra-radicular. Concluíram que o tratamento realizado apresentou satisfatória atividade anti-séptica e reparadora, com promissoras perspectivas sobre esta medicação intracanal.

Tanomaru et al.⁷⁰, em 2003, avaliaram o efeito do preparo biomecânico com diferentes soluções irrigadoras e hidróxido de cálcio como medicação intracanal em canais radiculares de cães. Foi inoculada endotoxina de *E. coli* nos canais radiculares por 10 dias para indução de lesão periapical. Os grupos 1 a 6 foram divididos de acordo com a solução

irrigadora: G1: NaOCl 1%; G2: NaOCl 2,5%; G3: NaOCl 5%; G4: clorexidina 2%; G5: solução salina fisiológica; G6: endotoxina mantida no canal durante todo o experimento; G7: preparo biomecânico com solução salina e após preenchimento com hidróxido de cálcio. Após 60 dias, os resultados foram avaliados. Os grupos 1 a 6 (soluções irrigadoras) apresentaram maior infiltrado inflamatório, maior espessamento do ligamento periodontal e maior reabsorção óssea e do cimento quando comparado ao grupo do hidróxido de cálcio. Foi possível concluir que o preparo biomecânico com as soluções irrigadoras testadas não foi capaz de inativar os efeitos da endotoxina, entretanto o hidróxido de cálcio inativou os efeitos induzidos pela endotoxina *in vivo*.

Haenni et al.²¹, em 2003, tiveram como objetivo avaliar a manutenção do pH na dentina radicular e a atividade antimicrobiana do pó de hidróxido de cálcio associado à solução salina, solução de clorexidina 0,5%, hipoclorito de sódio 1% ou iodeto de potássio 7,5%. Oitenta raízes de dentes humanos tiveram seus canais instrumentados até lima K 40 e preenchidos com as medicações testadas. Mudanças no pH da raiz durante todo o tempo foram verificadas com o auxílio de um microeletrodo localizado em área padronizada na parede da superfície radicular. A atividade antimicrobiana das pastas sobre *E. faecalis* e *C. albicans* foi analisada pelo teste de difusão em ágar. Os resultados mostraram que as misturas do hidróxido de cálcio com as soluções irrigadoras testadas não tiveram diferença significativa em relação ao pH e a atividade antimicrobiana quando comparados à pasta hidróxido de cálcio/solução salina. Os autores sugeriram que o hidróxido de cálcio é um álcali potente, cujo pH não é alterado quando são adicionados à ele ácidos fracos ou álcalis em suspensões aquosas. Misturando o pó do hidróxido de cálcio com estas soluções irrigadoras não há aumento da atividade antimicrobiana quando comparado com a pasta convencional hidróxido de cálcio/solução salina.

Menezes et al.³⁹, em 2004, avaliaram a atividade antimicrobiana da clorexidina gel 2%, associação clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio, natrosol, solução de clorexidina 2% e hidróxido de cálcio sobre diferentes cepas de *C. albicans* utilizando o método de diluição em placas de Petri. Suspensões contendo 10^6 células de diferentes cepas de *C. albicans* foram semeadas nas placas preparadas com os medicamentos por meio de inoculador de Steers e, após 24 horas de incubação a 37°C verificou-se a mínima concentração fungicida (MCF). Verificaram que a associação clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio foi a medicação que em uma menor concentração apresentou melhor ação sobre as cepas estudadas, podendo-se concluir que, dentre os medicamentos testados, esta é a medicação mais efetiva.

Zerella et al.⁸², em 2005, realizaram um estudo *in vivo* para avaliar o efeito da associação hidróxido de cálcio e solução de clorexidina 2% e da em dentes que necessitavam de retratamento. Foram selecionados 40 dentes de pacientes com presença de lesão periapical e tratamento endodôntico insatisfatório que foram reinstrumentados com solução de clorexidina 2% ou hipoclorito de sódio 1%. Foram realizadas as seguintes coletas: após a remoção do material obturador, após a reinstrumentação e 7-10 dias após a colocação da medicação intracanal. Os autores puderam concluir que tanto a associação da solução de clorexidina e hidróxido de cálcio e a pasta de hidróxido de cálcio e água esterilizada foram efetivas em eliminar os microrganismos dos canais radiculares, sem diferença estatisticamente significativa, na desinfecção de dentes com insucesso do tratamento endodôntico.

Vianna et al.⁷⁵, em 2006, avaliaram *in vivo* o efeito dos procedimentos endodônticos sobre microrganismos e endotoxinas em dentes humanos. Foram selecionados 32 dentes unirradiculados com

infecção endodôntica e lesões periapicais. Os dentes foram instrumentados com clorexidina gel 2% e divididos aleatoriamente em 3 grupos de acordo com a medicação intracanal utilizada: pasta de hidróxido de cálcio, clorexidina gel 2% e associação clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio. Foram realizadas coletas das amostras antes e após o preparo biomecânico e após 7 dias da medicação intracanal. Foi utilizado o teste de cultura para os microrganismos e o teste cromogênico Lisado do amebócito de *Limulus* para avaliação da quantidade de endotoxina presente. Os resultados mostraram que após o preparo biomecânico houve redução de 99,9% no número de microrganismos e de 44,4% da quantidade de endotoxinas. Após 7 dias do uso da medicação intracanal ainda foram encontrados microrganismos em 54,1% dos casos, e a quantidade de endotoxina foi reduzida em apenas 1,4% dos casos. Não houve diferença estatística significativa entre as medicações intracanaís. Os autores sugerem que o preparo biomecânico foi o responsável pela maior redução dos microrganismos e da quantidade de endotoxinas.

Ercan et al.¹⁵, em 2006, avaliaram *in vitro* a efetividade da clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio e água destilada e associação clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio, sobre *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Oitenta dentes humanos unirradiculados foram contaminados com *E. faecalis* e *C. albicans* por 5 dias. Um grupo foi tratado apenas com solução salina estéril (grupo controle). Foram coletadas com brocas Gates-Glidden, amostras de raspas de dentina após 7, 15 e 30 dias. Os resultados mostraram que a clorexidina gel 2% e a associação clorexidina gel 2% mais hidróxido de cálcio foram significativamente mais efetivas contra *E. faecalis* e *C. albicans* do que a pasta de hidróxido de cálcio, sem diferença estatística entre elas. Entretanto, os autores sugerem que para suportar esta observação *in vitro*, mais estudos *in vivo* são necessários.

Gomes et al.²⁰, em 2006 investigaram *in vitro* a atividade antimicrobiana da clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio mais água estéril e associação hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% sobre microrganismos presentes em canais radiculares, utilizando o teste de difusão em ágar e o teste de contato direto. Os microrganismos utilizados foram: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. A clorexidina gel 2% apresentou os maiores halos de inibição, levando apenas 1 minuto para inibir 100% dos microrganismos testados. De acordo com os resultados, os autores concluíram que a clorexidina gel 2% e a associação clorexidina gel 2% mais hidróxido de cálcio apresentou atividade antimicrobiana melhor que o hidróxido de cálcio manipulado com água estéril.

2.4 Polimixina B

Rifkind e Palmer⁵⁵, em 1966, verificaram se a polimixina B é capaz de neutralizar a toxicidade da endotoxina em embriões de galinhas. Sugerem que alguns antibióticos polipeptídeos catiônicos são capazes de neutralizar as endotoxinas pela combinação direta da parte tóxica da molécula da endotoxina. Possivelmente esta combinação envolve os grupos catiônicos dos antibióticos e os grupos polifosfatos do componente fosfolipídeo da endotoxina.

Rifkind⁵⁴, em 1967, teve como objetivo verificar a prevenção da letalidade endotóxica em ratos pela polimixina B. Endotoxina de *Escherichia coli* sozinha ou associada ao sulfato de polimixina B foi injetada intravenosamente em ratos de oito a dez

semanas de idade. A letalidade foi observada após 48 h. Quando 50µg de polimixina B foi usada, esta preveniu a letalidade endotóxica em todos os casos, porém, quando foi usada 100 µg de polimixina B houve 33% de mortalidade (23 de 70 ratos). Os dados demonstraram que a polimixina B previne letalidade endotóxica, entretanto, depende da proporção antibiótico/endotoxina.

Corrigan e Bell⁸, em 1971, avaliaram três antibióticos (polimixina B, colimicina M e sulfato de gentamicina) na neutralização dos efeitos tóxicos da endotoxina em coelhos. A polimixina B preveniu a leucopenia, trombocitopenia e a coagulação intravascular disseminada. Colimicina M teve atividade similar, mas não foi tão efetiva quanto a polimixina B. Gentamicina não demonstrou capacidade de neutralização.

Craig et al.⁹, em 1974 no qual realizaram um estudo analisando a capacidade da polimixina B em neutralizar endotoxina em tecidos de coelhos e ratos. Os animais foram pré-tratados com polimixina B duas vezes ao dia durante 4 dias. 24, 48 e 72 horas após a última dose de antibiótico, os animais receberam endotoxina intravenosa. Os resultados mostraram que a polimixina B foi capaz de prevenir a reação de Schwartzman em coelhos e reduzir a letalidade endotóxica em ratos.

Morrison e Jacobs^{40,41}, em 1976, mostraram que a polimixina B liga-se com a região do lipídio A do LPS bacteriano, formando um complexo molecular estável. Sugeriram que a interação entre a polimixina B e o LPS é estequiométrica, na qual uma molécula de polimixina B liga-se a uma unidade monomérica do lipopolissacarídeo. Verificaram que a polimixina B pode dificultar todas as preparações das endotoxinas testadas, independente da sua porcentagem de peso no lípideo A. Demonstraram também que a formação do complexo PB-LPS (polimixina B-lipopolissacarídeo) anula a habilidade do LPS em estimular

mitogenicamente os linfócitos do osso, uma atividade biológica do LPS conhecida por ser regulada pelo lipídio A.

Stokes et al.⁶⁷, em 1989, analisaram a inibição *in vitro* e *in vivo*, pela polimixina B, da produção do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) pelos macrófagos alveolares de ratos em resposta ao LPS. Os autores verificaram que a polimixina B (*in vitro*) bloqueou ativação dos macrófagos nas concentrações de 100, 10 e 1 μ g/ml. Efeitos inibitórios similares foram induzidos pela polimixina B num modelo *in vivo*, na qual a produção de TNF- α foi estimulada pela injeção intratraqueal de LPS. Como muitos dos efeitos do LPS são mediados pelo TNF- α , sua inibição pode explicar a proteção oferecida pela polimixina B contra a toxicidade induzida pelo LPS.

Darrow e Keithley et al.¹⁴, em 1996, investigaram a eficácia da polimixina B como modulador da resposta inflamatória à endotoxina no ouvido médio de porcos. Trinta e seis porcos foram divididos em três grupos: 1) quatro animais receberam endotoxina em um ouvido e solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS) no outro; 2) quatro animais receberam endotoxina mais polimixina e PBS no outro; 3) quatro animais receberam polimixina B em um e PBS no outro. Os resultados mostraram que os ouvidos tratados com endotoxina apresentaram edema de mucosa e infiltrado inflamatório, enquanto que os ouvidos tratados com endotoxina mais polimixina B mostraram uma redução significativa na resposta inflamatória.

Parviainen et al.⁵², em 2001, avaliaram os efeitos da polimixina B na resposta à endotoxina em cavalos. Foram utilizadas 3 doses de polimixina B (100, 1.000 e 10.000 UI/kg) e solução salina fisiológica como controle. Amostras de sangue foram coletadas antes e após 24 horas da administração da polimixina B. Para a análise do Fator

de Necrose Tumoral (TNF) induzido por endotoxina, as amostras sanguíneas foram incubadas a 37°C por 4 horas. Para a análise da endotoxina residual, o plasma foi coletado e esterilizado em tubos apirogênicos e incubado por 10 minutos a 70°C. Os autores verificaram que a polimixina B causou diminuição significativa da atividade de TNF induzida pela endotoxina e a atividade da endotoxina residual foi significativamente reduzida após administração de 10.000 UI de polimixina/kg. Esses resultados sugerem que a polimixina B é um efetivo inibidor da inflamação induzida pela endotoxina em cavalos.

Oliveira et al.⁴⁸, em 2005, avaliaram *in vitro* a efetividade de soluções irrigadoras na neutralização de endotoxinas nos canais radiculares. As soluções irrigadoras testadas foram: hipoclorito de sódio 2,5%, hipoclorito de sódio 5,25%, clorexidina 2%, hidróxido de cálcio 0,14%, polimixina B, água apirogênica (controle positivo) e sem endotoxina e água apirogênica como irrigante (controle negativo). Foram realizadas duas coletas do canal radicular (imediata e após 7 dias). A neutralização de endotoxina foi verificada pelo método lisado do amebócito *Limulus* e pela produção de anticorpos em cultura de linfócitos B. Os autores verificaram que somente as soluções de hidróxido de cálcio e polimixina B foram capazes de neutralizar endotoxinas nos canais radiculares; o hipoclorito de sódio e a clorexidina não apresentaram efeito sobre a endotoxina.

Oliveira et al.⁴⁹, em 2005, avaliaram *in vitro* o efeito de medicações intracanaís sobre endotoxinas de *Escherichia coli* inoculadas em canais radiculares. Foram utilizados 75 dentes humanos unirradiculados que foram instrumentados até a lima K 50. Uma solução padronizada contendo endotoxina de *E. coli* foi inoculada em 60 canais radiculares. As medicações intracanaís utilizadas foram: hidróxido de cálcio (grupo 1); polimixina B (grupo 2); associação neomicina-polimixina

e hidrocortisona-B (grupo 3); controle positivo, sem utilização de medicação intracanal (grupo 4); controle negativo, sem endotoxina e sem medicação intracanal (grupo 5). Após 7 dias, a neutralização da endotoxina foi avaliada pelo teste lisado do amebócito de *Limulus* e produção de anticorpos em cultura de linfócitos B. Os autores concluíram que o hidróxido de cálcio e a polimixina B inativaram as endotoxinas dos canais radiculares e alteraram as propriedades do LPS em estimular a produção de anticorpos linfócitos B. Citaram ainda que a combinação neomicina-polimixina hidrocortisona-B não neutralizou as endotoxinas.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como proposta avaliar a ação do hipoclorito de sódio 2,5% e da clorexidina gel 2% como substâncias químicas auxiliares ao preparo biomecânico e do hidróxido de cálcio, polimixina B e hidróxido de cálcio P.A. associado a clorexidina gel 2% como medicações intracanaais sobre *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, protocolo nº 067/2005 (Anexo A).

4.1 Preparo dos espécimes

Foram utilizados 120 dentes humanos unirradiculados recém-extraídos que, após a exodontia foram limpos e imersos em solução fisiológica até o momento do uso. A seleção dos dentes foi feita baseada nas dimensões e similaridade morfológica da raiz, sendo os dentes radiografados para comprovação da presença de um único canal reto. As coroas foram seccionadas com disco de carborundum, padronizando o comprimento dos espécimes em $16\pm 0,5\text{mm}$ (Figura 1a).

A instrumentação inicial dos canais radiculares foi realizada em toda a sua extensão até a lima tipo Kerr nº 30 (Dentsply – Maillefer – Suíça) (Figura 1b) e os canais foram irrigados com solução de hipoclorito de sódio a 1% a cada troca de instrumento (Terapêutica – Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP, Brasil). Após o preparo biomecânico, os canais foram secos e em seguida preenchidos com EDTA (Inodon – Porto Alegre, RS, Brasil) por 3 minutos e irrigação final com 10 ml de solução salina fisiológica.

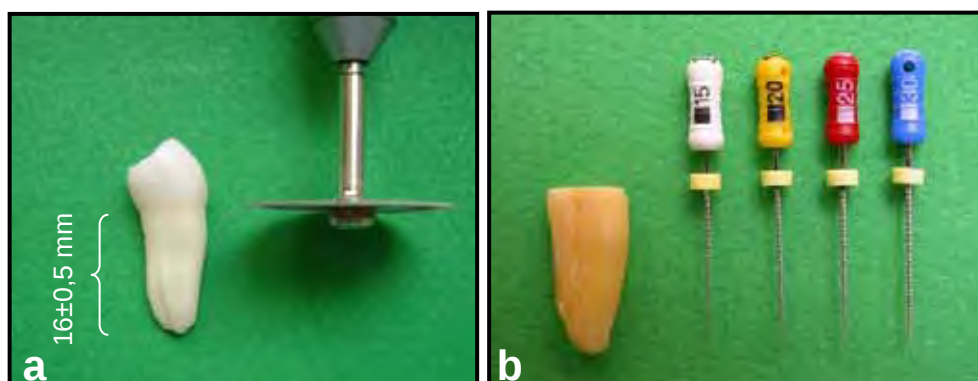


FIGURA 1 – Preparo inicial dos espécimes: a) padronização do comprimento das raízes; b) seqüência da instrumentação inicial.

Em seguida, foi realizado o vedamento da região apical dos dentes com resina composta fotopolimerizável (Z-100 – 3M – Sumaré, SP, Brasil) e as raízes foram impermeabilizadas externamente com uma camada de adesivo epóxi (Brascola – São Paulo, SP, Brasil), exceto a região da abertura cervical (Figura 2).

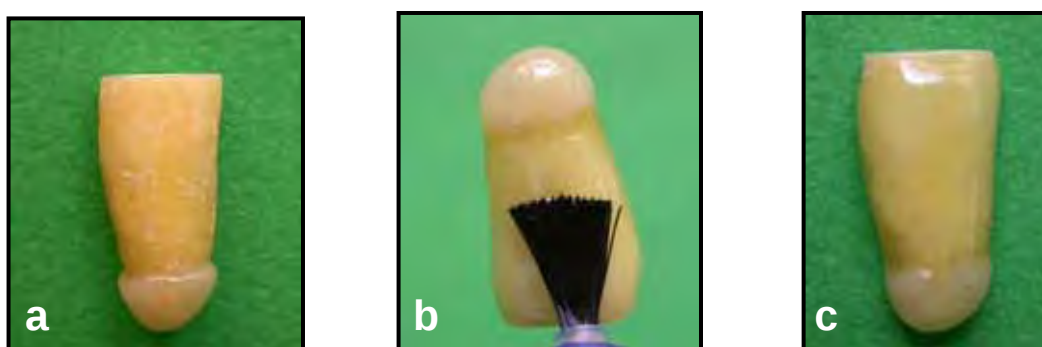


FIGURA 2 – Impermeabilização das raízes: a) selamento do ápice; b) impermeabilização externa com resina epóxi; c) raiz após impermeabilização externa.

Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em 10 placas de cultura celular de 24 poços (Costar – New York, USA), com 12 dentes em cada placa e fixados com resina acrílica quimicamente ativada (Dencor Artigos Odontológicos Clássico – São Paulo, SP, Brasil) (Figura 3). As placas foram tampadas e embaladas, e, imediatamente com os

demais materiais a serem utilizados no experimento foram esterilizados por radiação gama com cobalto 60 (20 KGy por 6 horas) para neutralização de endotoxinas pré-existentes (Csako et al.¹⁰, 1983). Esta esterilização foi realizada na empresa EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, São Paulo, Brasil).

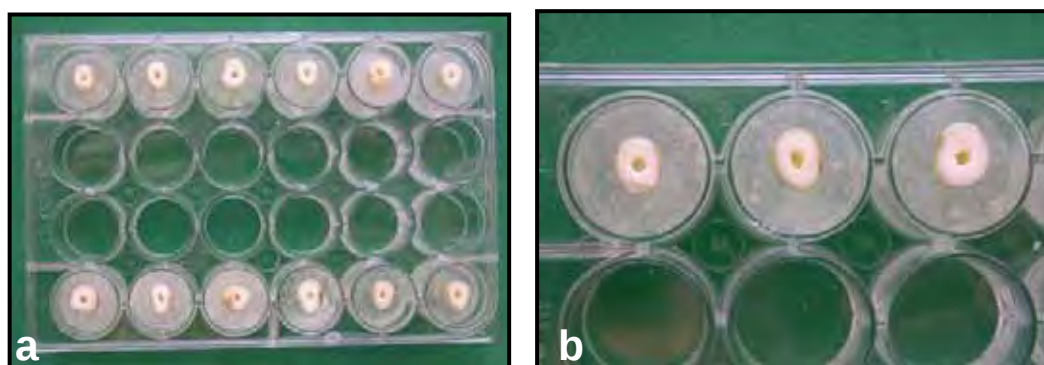


Figura 3 – Raízes incluídas com resina acrílica na placa de contagem de células: a) distribuição dos 12 espécimes na placa; b) detalhe dos dentes incluídos.

4.2 Contaminação dos espécimes

O microrganismo utilizado foi *Escherichia coli* (ATCC 25922) que foi semeado em placas de Petri contendo ágar infuso-cérebro-coração (BHI) e ágar eosina azul de metileno (EMB) para confirmação de cultura pura de *E. coli* (Himedia Laboratories Ltda. – Mumbai, Índia) (Figura 4a e b). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. A partir do crescimento na placa com BHI, foi preparada uma suspensão, em solução salina fisiológica estéril e apirogênica contendo 10^6 céls/ml, o que corresponde à densidade óptica de 0,324 no espectrofotômetro, com comprimento de onda de 590 nm (Micronal S/A – São Paulo, SP, Brasil) (Figura 4c).

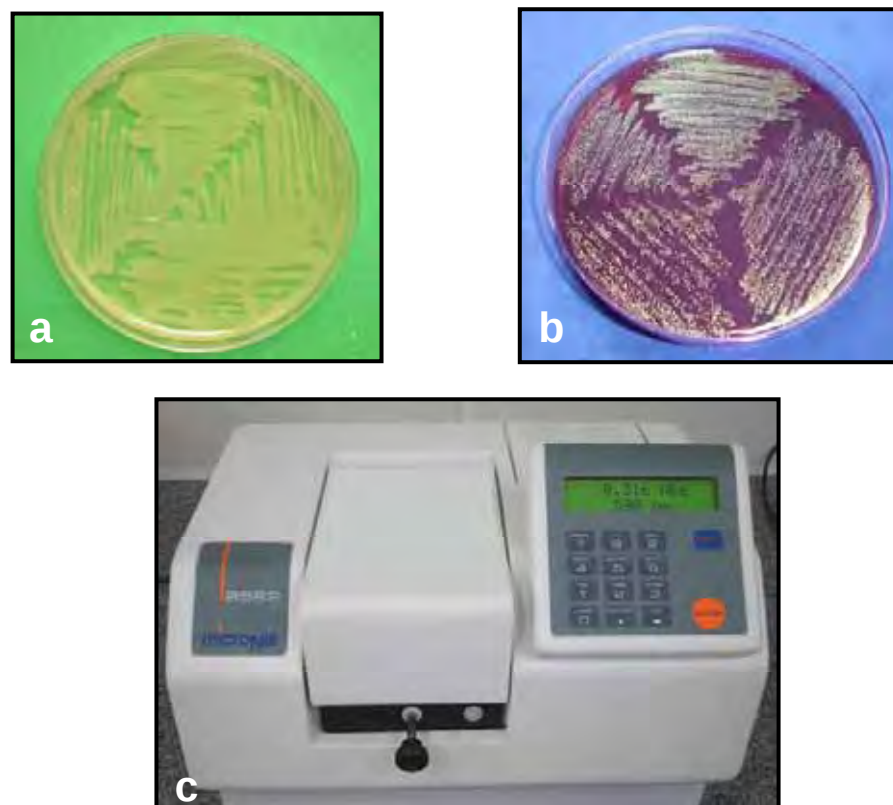


FIGURA 4 – Preparo da suspensão de *E. coli*: a) *E. coli* em ágar BHI; b) *E. coli* em ágar EMB; c) leitura da suspensão em espectrofotômetro.

Em câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda. – Campinas, São Paulo, Brasil), os canais radiculares foram contaminados com o auxílio de uma micropipeta automática (Gilson – Villiers-le-Bel, França) com 10 μ l desta suspensão contendo *E. coli* e 10 μ l de caldo infuso-cérebro-coração (BHI) (Himedia Laboratories Ltda. – Mumbai, Índia) totalizando 20 μ l. Na entrada dos canais foi colocada uma bolinha de algodão apirogênica embebida no caldo BHI. Para avaliar o período necessário para contaminação da massa dentinária com *E. coli* após inoculação no canal radicular, foi realizado um estudo piloto. Neste estudo, realizou-se a contaminação por 7, 14 e 21 dias e os espécimes foram analisados em MEV para verificar a penetração da *E. coli* nos túbulos dentinários. Observou-se penetração intensa da bactéria no interior dos túbulos dentinários após 14 dias de contaminação (Figura 5). Portanto, após a contaminação dos espécimes, os mesmos foram

mantidos em estufa a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, em umidade relativa, por 14 dias, sendo que a cada 3 dias, foi adicionado meio de cultura (caldo BHI) no interior dos canais radiculares com o auxílio de seringas tipo insulina de 1 ml (Injex – Ourinhos, SP, Brasil) (Menezes et al.³⁸, 2004).

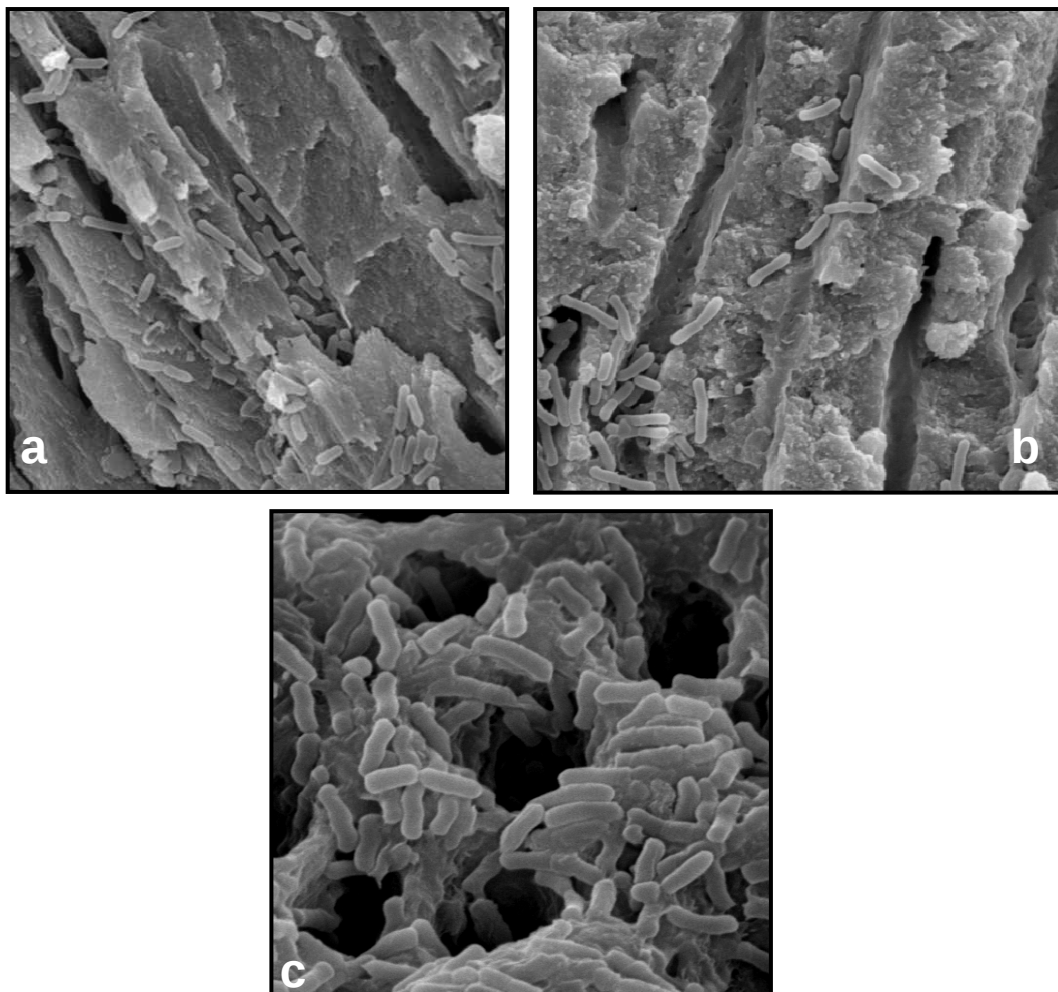


FIGURA 5 – Fotomicrografias em MEV dos espécimes do estudo piloto para avaliação após 14 dias da inoculação com *E. coli*: a) e b) aumento de 5000x, c) aumento de 10000x.

4.3 Divisão dos grupos experimentais

Decorrido o período de contaminação, foram realizadas coletas de todos os espécimes para confirmação da contaminação dos canais radiculares (descrita no item 4.4).

Após a confirmação da contaminação, os espécimes foram divididos em 3 grupos experimentais (n=36), de acordo com a solução irrigadora utilizada (Quadro 1):

a) grupo 1: hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) (Terapêutica – Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP, Brasil);

b) grupo 2: clorexidina gel 2% (clorexidina 2% em gel de natrosol 0,8% (CLX) (Byofórmula – Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP, Brasil);

c) grupo 3: solução salina fisiológica estéril e apirogênica (Aster Produtos Médicos Ltda. – Sorocaba, SP, Brasil)

O preparo biomecânico foi realizado com recuo de 1mm até a lima K 50 e escalonado até a lima K 80. Nos grupos 1 e 3 foram utilizados 3 ml da solução irrigadora a cada troca de instrumento, sendo a irrigação realizada com auxílio de seringas de 3 ml (Injex – Ourinhos, SP, Brasil) e a aspiração com agulhas apirogênicas 40x16 (B.D. – Ibiporã, PR, Brasil), intermediários de sugadores endodônticos e bomba à vácuo. No grupo 2, a clorexidina gel 2% foi colocada no interior dos canais radiculares até o seu preenchimento com o auxílio de seringa de 3 ml e agulha apirogênica, os canais foram instrumentados e irrigados com 3 ml de solução salina fisiológica apirogênica, este procedimento foi realizado a cada troca de instrumento.

Foram realizadas duas coletas do conteúdo do canal radicular: uma imediatamente após a instrumentação (1ª coleta) e outra após sete dias (2ª coleta) (descritas no item 4.4). As raízes

permaneceram com solução salina fisiológica apirogênica entre a 1ª e a 2ª coleta.

Em seguida, cada grupo foi subdividido em três (n=12), de acordo com a medicação intracanal utilizada (Quadro 1):

A) pasta de hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) (Pasta Calen, S.S. White – Rio de Janeiro, RJ, Brasil);

B) solução de polimixina B (PmB) (10.000 UI/ml) (Ophtalmos Fórmulas Oficiais – São Paulo, SP, Brasil);

C) associação do hidróxido de cálcio pró-análise (P.A.) (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda. – Ibiporã, PR, Brasil) com a clorexidina gel 2% (Ca(OH)_2 + CLX gel 2%) (Byofórmula – Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP, Brasil).

Quadro 1 – Divisão dos grupos experimentais, de acordo com a substância química auxiliar e medicação intracanal utilizadas

Grupos	N	Substância química auxiliar	Medicação intracanal
1A	12	Hipoclorito de sódio 2,5%	Pasta de Ca(OH)_2
1B	12		Polimixina B
1C	12		Ca(OH)_2 + CLX gel 2%
2A	12	Clorexidina gel 2%	Pasta de Ca(OH)_2
2B	12		Polimixina B
2C	12		Ca(OH)_2 + CLX gel 2%
3A	12	Solução fisiológica apirogênica	Pasta de Ca(OH)_2
3B	12		Polimixina B
3C	12		Ca(OH)_2 + CLX gel 2%
4	12	Solução fisiológica apirogênica	Solução fisiológica apirogênica

No grupo controle G4 (n=12) foi realizado o preparo biomecânico apenas com solução salina fisiológica apirogênica, sem a

utilização de substância química auxiliar e mantidos com solução salina apirogênica como medicação intracanal.

Previamente à colocação das medicações intracanaís, foi utilizado EDTA (Inodon – Porto Alegre, RS, Brasil) durante 3 minutos seguido da irrigação dos canais radiculares com 10 ml de solução salina fisiológica apirogênica.

Para colocação da pasta de hidróxido de cálcio (pasta Calen), foi utilizada seringa endodôntica ML (S.S. White – Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e agulha descartável Gauge 27G (B.D. – Ibiporã, PR, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante (Figura 6). A polimixina B foi colocada com o auxílio de seringas de 1 ml e agulhas apirogênicas (Figura 7). A associação clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio P.A. foi manipulada em proporções iguais de volume (1:1) e levada ao canal radicular com auxílio de uma lima K 50 até o completo preenchimento do canal (Figura 8).



FIGURA 6 – Medicação intracanal dos espécimes do subgrupo A: a) Pasta Calen; b) Colocação da pasta de hidróxido de cálcio (Pasta Calen).

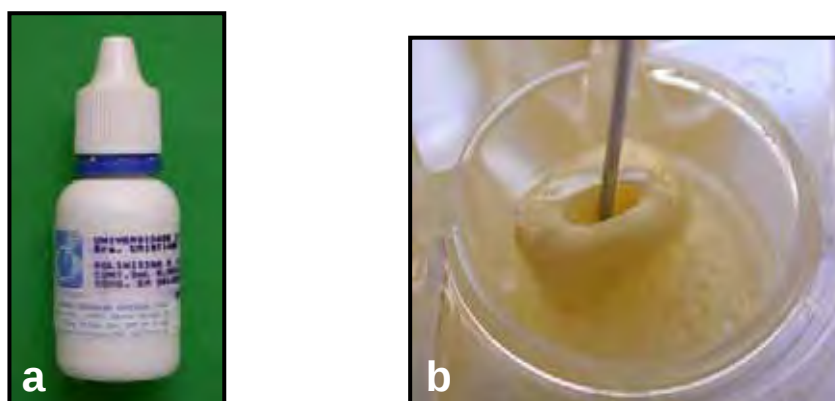


FIGURA 7 – Medicação intracanal do subgrupo B: a) Polimixina B; b) Colocação da Polimixina B com auxílio de agulhas acopladas a seringas de 1 ml.

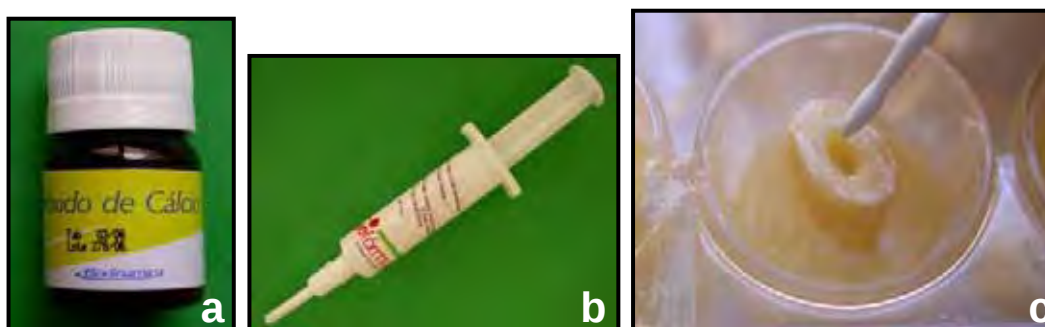


FIGURA 8 – Medicação intracanal do subgrupo C: a) Hidróxido de cálcio P.A.; b) clorexidina gel 2%; c) colocação da associação $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + CLX com auxílio de uma lima K 50.

Após a colocação da medicação nos canais radiculares, estes permaneceram em estufa a 37°C por catorze dias. Após este período a medicação foi removida com auxílio de uma lima K 50 e 10 ml de solução salina fisiológica apirrogênica e em seguida foi realizada uma coleta do conteúdo do canal radicular (3ª coleta). Os canais foram mantidos com solução salina fisiológica apirrogênica e após 7 dias foi realizada outra coleta (4ª coleta: 7 dias após a remoção da medicação intracanal).

4.4 Coletas do conteúdo do canal radicular

Todas as coletas dos canais radiculares (coleta de confirmação, imediatamente após a instrumentação e após sete dias, imediatamente após 14 dias da ação da medicação intracanal e após sete dias) (Figura 9) foram realizadas da mesma forma: os canais foram preenchidos com solução salina fisiológica apirogênica e, com seringas de 1 ml, foram coletados 100 µl do conteúdo do canal radicular para realização das análises microbiológica e da quantidade de endotoxina.

Previamente às coletas das amostras (exceto de confirmação), todos os espécimes foram irrigados com 10 ml de solução fisiológica apirogênica.

Entre a coleta imediata e após sete dias (tanto para as substâncias químicas auxiliares como para a medicação), os dentes foram preenchidos com solução salina fisiológica apirogênica e selados com bolinha de algodão apirogênica. As placas contendo os espécimes foram fechadas e mantidas em estufa a temperatura de $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa 100%.

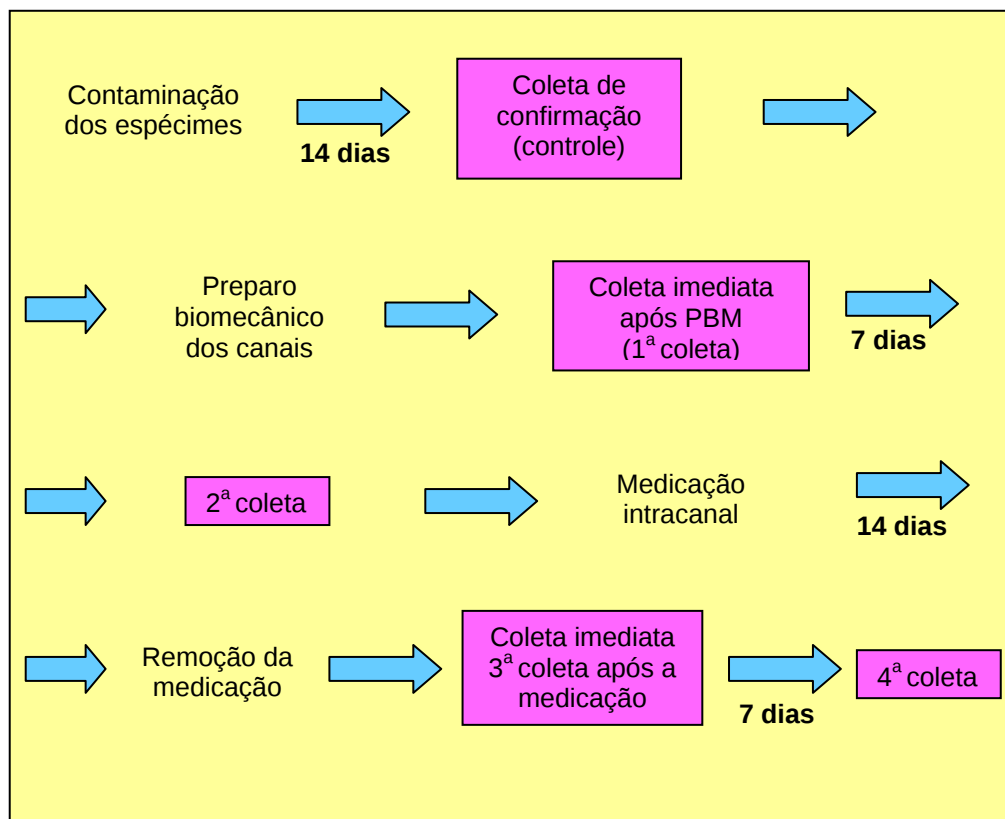


FIGURA 9 – Coletas das amostras do canal radicular

4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para determinar a atividade antimicrobiana das substâncias químicas auxiliares e medicações intracanaís utilizadas, foram realizadas diluições seriadas das amostras coletadas do canal radicular e semeadura, em duplicata, em placas contendo ágar BHI. Após, foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas, e em seguida realizadas contagens de unidades formadoras de colônia (UFC/ml) de *E. coli*.

4.6 Verificação da neutralização de endotoxinas pelo método cinético cromogênico do Lisado do amebócito *Limulus* (LAL)

O lisado é preparado a partir do amebócito circulante do caranguejo-ferradura *Limulus polyphemus* que, quando exposto a quantidade pequena de endotoxinas, aumenta sua opacidade bem como sua viscosidade, tornando-se um gel duro (Levin & Bang³⁵). A formação do coágulo era resultado de uma reação enzimática entre a endotoxina e uma proteína coagulável na circulação do amebócito do *Limulus* (Levin & Bang³⁵). Assim, pelo método QCL 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 dos testes (imediatamente após o preparo biomecânico – 1ª coleta; e após sete dias – 2ª coleta; imediatamente após a medicação – 3ª coleta; e após sete dias – 4ª coleta), as amostras coletadas do canal radicular foram submetidas à análise quantitativa de LPS pelo método cinético cromogênico do lisado do amebócito *Limulus*.

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

Em uma placa apirogênica de 96 poços foram distribuídos em duplicata: a água apirogênica (branco da reação), os padrões de

endotoxina, as amostras coletadas do canal radicular e os controles positivos (Figuras 10a e b). A placa foi incubada no leitor cinético QCL (Cambrex – São Paulo, SP, Brasil) (Figura 11) 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. Após, foram adicionados em cada poço da placa 100 μl do reagente cinético cromogênico do LAL (Figura 10c), com uma multipipeta de 8 canais e ponteiros apirogênicos. Após o início do ensaio cinético, o *software* da leitora de microplacas monitorou, de forma contínua durante todo o ensaio, a absorbância a 405 nm em cada poço da microplaca. O leitor determinou o tempo necessário para aumentar a absorbância de cada poço a 0.200 unidades de absorbância, que foi denominado tempo de reação. O *software* WinkQCL automaticamente calculou uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os parâmetros da curva-padrão e os valores da quantidade de endotoxina das amostras dos canais radiculares foram impressos em relatórios.

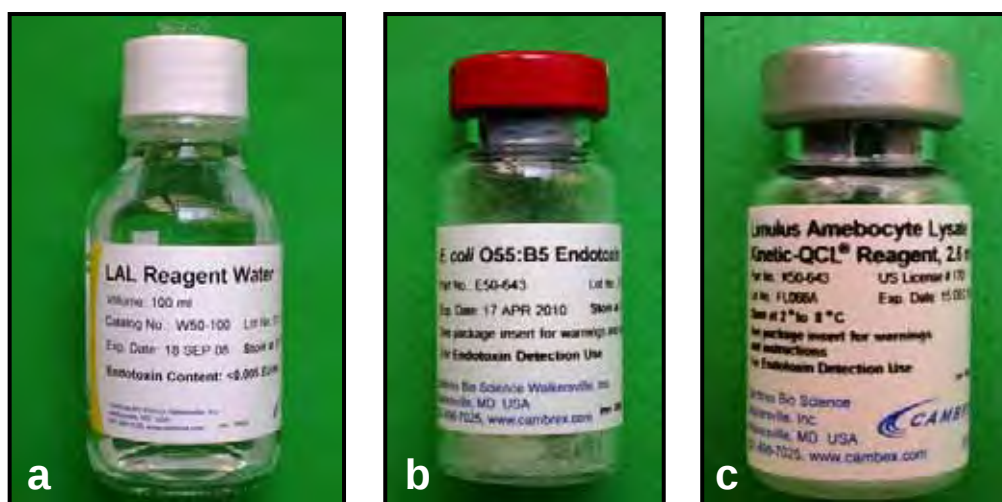


FIGURA 10 – Substâncias utilizadas como padrão: a) Água apirogênica; b) Endotoxina padrão de *E. coli*; c) Reagente LAL.



FIGURA 11 – Leitor Cinético QCL

Os dados foram analisados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis e teste de Dunn (5%). A análise estatística foi realizada de acordo com as coletas realizadas durante o estudo: 1^a coleta, 2^a coleta, 3^a coleta e 4^a coleta.

Na primeira e na segunda coleta foram analisadas apenas as substâncias químicas auxiliares utilizadas. Os dados dos grupos do hipoclorito de sódio 2,5% (G1) (n=36) foram comparados aos outros dois grupos: clorexidina gel 2% (G2) (n=36) e soro fisiológico apirogênico (G3) (n=36), enquanto que na terceira e quarta coleta foram analisados todos os grupos individualmente.

5 RESULTADOS

5.1 Análise microbiológica

A Figura 12 ilustra a coleta de confirmação das amostras após 14 dias de contaminação com *E. coli*.



FIGURA 12 – Coleta de confirmação em agar BHI

Os resultados obtidos pela contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) em todas as coletas nos grupos 1 e 2 estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Resultados obtidos: médias de UFC/ml de *E. coli* no grupo G1* e seus respectivos subgrupos

	Coleta de confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
G1A					
1	16300000	0	0	0	0
2	200000000	0	0	0	0
3	9500000	0	0	0	0
4	246000000	0	0	0	0
5	250000000	0	0	0	0
6	100000	0	0	0	0
7	12700	0	0	0	0
8	31000000	0	0	0	0
9	400000	0	0	0	0
10	22400000	0	0	0	0
11	13300000	0	0	0	0
12	16500000	0	0	0	0
Média	67126058	0	0	0	0
G1B					
1	200000000	0	0	0	0
2	235000000	0	0	0	0
3	29400000	0	0	0	0
4	200000000	0	0	0	0
5	226000000	0	0	0	0
6	163000000	0	0	0	0
7	28500000	0	0	0	0
8	49100000	0	0	0	0
9	164000000	0	0	0	0
10	13500000	0	0	0	0
11	230000000	0	0	0	0
12	212000000	0	0	0	0
Média	145875000	0	0	0	0
G1C					
1	240000000	0	0	0	0
2	46000000	0	0	0	0
3	30800000	0	0	0	0
4	25000000	0	0	0	0
5	106000000	0	0	0	0
6	168000000	0	0	0	0
7	17000000	0	0	0	0
8	6400000	0	0	0	0
9	15400000	0	0	0	0
10	17900000	0	0	0	0
11	30500000	0	0	0	0
12	3700000	0	0	0	0
Média	58891667	0	0	0	0

*G1: Preparo biomecânico com NaOCl 2,5%

MIC = Medicação intracanal

G1A- MIC: Pasta de Ca(OH)_2 (Pasta Calen); G1B- MIC: Polimixina B; G1C: associação CLX gel 2% + Ca(OH)_2

Tabela 2 – Resultados obtidos: médias de UFC/ml de *E. coli* no grupo G2* e seus respectivos subgrupos

	Coleta de Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
G2A					
1	2100000	0	0	0	0
2	45000000	0	0	0	0
3	55000000	0	0	0	0
4	160000000	0	0	0	0
5	400000000	0	0	0	0
6	200000000	0	0	0	0
7	69000000	0	0	0	0
8	610000000	0	0	0	0
9	240000000	0	0	0	0
10	1050000000	0	0	0	0
11	250000000	0	0	0	0
12	380000000	0	0	0	0
Média	288425000	0	0	0	0
G2B					
1	156000000	0	0	0	0
2	158000000	0	0	0	0
3	167000000	0	0	0	0
4	278000000	0	0	0	0
5	360000000	0	0	0	0
6	280000000	0	0	0	0
7	338000000	0	0	0	0
8	170000000	0	0	0	0
9	216000000	0	0	0	0
10	260000000	0	0	0	0
11	358000000	0	0	0	0
12	158000000	0	0	0	0
Média	241583333	0	0	0	0
G2B					
1	180000000	0	0	0	0
2	141000000	0	0	0	0
3	191000000	0	0	0	0
4	30700000	0	0	0	0
5	22500000	0	0	0	0
6	50000000	0	0	0	0
7	331000000	0	0	0	0
8	273000000	0	0	0	0
9	237000000	0	0	0	0
10	31800000	0	0	0	0
11	33000000	0	0	0	0
12	114000000	0	0	0	0
Média	136250000	0	0	0	0

* G2: Preparo biomecânico com CLX gel 2%

MIC = Medicação intracanal

G2A- MIC: Pasta de Ca(OH)_2 (Pasta Calen); G2B- MIC: Polimixina B; G2C: associação CLX gel 2% + Ca(OH)_2

Analisando as Tabelas 1 e 2, pôde-se verificar crescimento microbiano em todos os espécimes na coleta de confirmação, entretanto, após o preparo biomecânico, tanto o hipoclorito de sódio 2,5% quanto a clorexidina gel 2%, foram capazes de eliminar completamente *E. coli* nos canais radiculares de todos os espécimes.

Uma vez que, após a medicação intracanal, os valores de UFC/ml foram iguais a zero, não houve necessidade de aplicação de teste estatístico para resultados.

Nas Tabelas 3 e 4 estão representados os valores obtidos pela contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) em todas as coletas nos grupos 3 e 4.

Tabela 3 – Resultados obtidos: médias de UFC/ml de *E. coli* no grupo G3* e seus respectivos subgrupos

	Coleta de Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
G3A					
1	257000000	180000	39100	0	0
2	37000000	135000	360000	0	0
3	113000000	200000	1190000	0	0
4	374000000	48000	222000	0	0
5	231000000	162000	68000	0	0
6	236000000	299000	1800	0	0
7	213000000	3900	68000	0	0
8	219000000	84000	2100	0	0
9	125000000	400000	1840000	0	0
10	240000000	267000	109000	0	0
11	120000000	147000	90000	0	0
12	58000000	212000	7400	0	0
Média	185250000	178158	333117	0	0
G3B					
1	59000000	50000	550000	0	0
2	115000000	43600	1000	0	0
3	245000000	15000	1910000	0	0
4	134000000	50000	5350000	0	0
5	120000000	56000	720000	0	0
6	210000000	42000	3500000	0	0
7	250000000	51000	4000000	0	0
8	60000000	44000	6500000	0	0
9	180000000	35000	4500000	0	0
10	40000000	22000	6000000	0	0
11	16000000	25000	6500000	0	0
12	70000000	30000	3000000	0	0
Média	124916667	38633	3956750	0	0
G3C					
1	2380000000	50000	1780000	0	0
2	1660000000	27300	2340000	0	0
3	1640000000	35100	5250000	0	0
4	84000000	25000	4700000	0	0
5	100000000	90000	1500000	0	0
6	70000000	300000	2000000	0	0
7	32000000	100000	23000000	0	0
8	420000000	220000	1500000	0	0
9	800000000	42000	3200000	0	0
10	120000000	39000	3100000	0	0
11	22000000	38000	22000000	0	0
12	51000000	60000	40000000	0	0
Média	614916667	85533	9197500	0	0

* G3: Preparo biomecânico com solução salina fisiológica apirogênica

Medicação intracanal = MIC

G3A- MIC: Pasta de Ca(OH)_2 (Pasta Calen); G3B- MIC: Polimixina B; G3C: associação CLX gel 2% + Ca(OH)_2

Tabela 4 – Resultados obtidos: médias de UFC/ml de *E. coli* no grupo G4*

	Coleta de Confirmação	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
					G4
1	152000000	50000	3500000	20000	250000
2	95000000	50000	2850000	200	832000
3	1210000000	24500	1750000	35000	880000
4	235000000	14300	86000	163000	72000
5	230000000	60000	1700000	90000	22000
6	280000000	12000	18000000	150000	28000
7	25000000	81000	9500000	4500	35000
8	700000000	32000	6000000	24000	250
9	210000000	10000	3200000	60000	2000
10	600000000	25000	4000000	120000	3300
11	85000000	300000	200000	2000	200000
12	150000000	70000	120000	1100	150000
Média	331000000	60733	4242167	55817	206213

G4: Preparo biomecânico com solução salina fisiológica apirogênica e medicação intracanal solução salina fisiológica apirogênica

Com base nas Tabelas 3 e 4, pôde-se verificar que, na primeira coleta após o preparo biomecânico, houve redução dos microrganismos em relação à coleta de confirmação em todos os espécimes dos grupos instrumentados com soro fisiológico apirogênico. Verificou-se ainda que na segunda coleta (após 7 dias do PBM) houve um aumento na contagem dos microrganismos.

Ainda na Tabela 3, verificou-se que após a aplicação das medicações intracanaís: pasta de Ca(OH)_2 , polimixina B ou associação Ca(OH)_2 + CLX gel 2% por 14 dias (3ª coleta), houve total eliminação da *E. coli* do canal radicular. Entretanto, no grupo controle, que não foi utilizada nenhuma medicação intracanal, os microrganismos permaneceram viáveis durante todo o período experimental.

5.2 Quantificação de endotoxinas

A Figura 12 ilustra a microplaca de 96 poços após a realização do teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL).

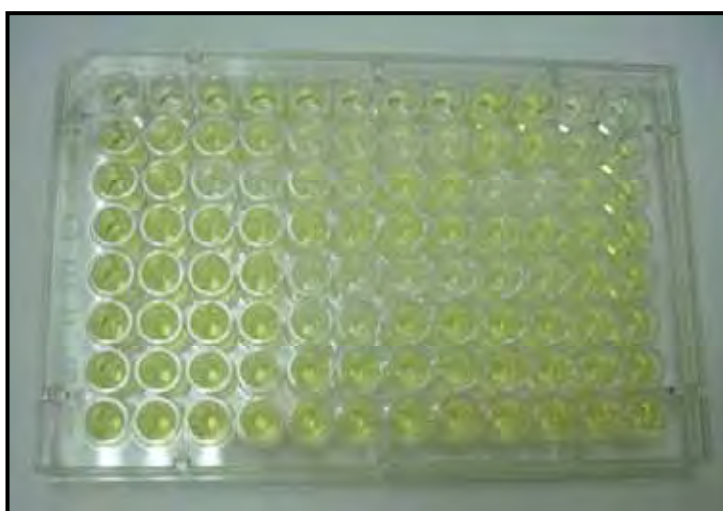


FIGURA 13 – Microplaca de 96 poços após a realização do teste cinético cromogênico

Os dados obtidos pelo teste de quantificação de endotoxinas dos canais radiculares em todas as coletas estão apresentados nas Tabelas 5, 6, 7 e 8.

Tabela 5 – Resultados obtidos: quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/ml) no grupo G1* seus subgrupos

	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
G1A				
1	48,1	650	8,96	22,7
2	95,3	781	13,0	28,5
3	140	746	8,44	4,07
4	67,1	2510	20,9	12,9
5	129	4980	69,2	9,98
6	399	562	15,5	77,1
7	235	563	17,5	8,88
8	443	10200	20,4	10,6
9	122	4010	13,0	12,1
10	78,1	343	9,18	135
11	96,9	621	20,4	17,3
12	47,9	238	12,1	8,99
Média			19,05	29,0
G1B				
1	815	979	20,80	6,07
2	211	184	12,4	21,4
3	902	406	10,9	13,2
4	299	6170	9,79	7,54
5	180	270	71,2	0,00
6	265	264	15,9	9,58
7	572	1060	18,1	10,4
8	136	350	119	0,00
9	31,8	737	41,7	9,05
10	695	724	42,8	9,58
11	66,3	781	25,6	15,8
12	420	315	17,3	12,7
Média			33,79	9,61
G1C				
1	298	1310	10,2	489
2	32,8	198	11,3	25,7
3	33,1	55,0	8,79	10,8
4	8,43	458	0,00	9,40
5	35,8	700	0,00	133
6	199	265	60,7	29,5
7	13,3	335	0,00	0,00
8	115	2010	0,00	25,8
9	7,28	64,5	0,00	0,00
10	8,76	524	8,60	22,0
11	14,1	560	8,09	118
12	34,4	300	0,00	8,36
Média	202,6**	531,63**	8,97	72,6

* G1: Preparo biomecânico com NaOCl 2,5%

MIC = Medicação intracanal

G1A- MIC: Pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Pasta Calen); G1B- MIC: Polimixina B; G1C: associação CLX gel 2% + $\text{Ca}(\text{OH})_2$

** Média dos 36 espécimes na 1ª e na 2ª coleta

Tabela 6 – Resultados obtidos: quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/ml) no grupo G2* e seus subgrupos

	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
G2A				
1	40,0	23,5	0,00	0,00
2	47,1	26,6	0,00	0,00
3	99,8	28,6	6,65	8,08
4	95,8	70,1	153	76,2
5	23,1	13,6	0,00	0,00
6	58,8	141	18,4	802
7	33,7	14,9	8,10	22,3
8	172	10,1	0,00	11,5
9	58,7	95,2	147	491
10	18,8	27,5	73,8	392
11	39,8	17,1	0,00	0,00
12	71,7	9,69	7,73	812
Média			34,6	217,9
G2B				
1	491	297	180	16,3
2	519	3040	88,0	47,20
3	484	1750	1050	91,10
4	81,1	472	193	12,0
5	728	1540	320	95,6
6	2090	788	233	28,8
7	295	277	288	54,4
8	1380	1460	172	173
9	2220	2970	62,2	88,0
10	1020	1510	59,7	82,3
11	425	1320	18,8	41,1
12	1120	904	77,4	80,5
Média			228,5	67,5
G2C				
1	178	255	94,0	9,47
2	88,0	233	11,2	6,94
3	313	325	0,00	13,8
4	361	210	34,2	2790
5	58,3	291	0,00	6,82
6	121	220	81,6	105
7	29,5	62,3	0,00	17,1
8	29,7	45,8	0,00	17,2
9	86,0	271	9,69	56,7
10	173	142	21,60	8,73
11	110	93,8	11,5	29,5
12	36,7	184	56,0	50,3
Média	366,6**	1256,2**	26,65	259

* G2: Preparo biomecânico com CLX gel 2%

MIC = Medicação intracanal

G2A- MIC: Pasta de Ca(OH)₂; G2B- MIC: Polimixina B; G2C: associação CLX gel 2% + Ca(OH)₂

** Média dos 36 espécimes na 1ª e na 2ª coleta

Tabela 7 – Resultados obtidos: quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/ml) no grupo G3* e seus subgrupos G3A, G3B, G3C

	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
G3A				
1	556	1360	11,7	173
2	362	1690	118	236
3	159	3370	0,00	47,5
4	504	2360	13,8	199
5	298	2290	0,00	11,7
6	1250	1270	8,97	379
7	142	1270	16,8	57,4
8	420	1820	66,3	90,7
9	615	4180	8,23	39,0
10	430	1160	16,2	103
11	1010	1340	9,89	99,8
12	694	2950	62,9	19,8
Média			27,7	121,3
G3B				
1	255	10600	67,5	20,1
2	391	10500	18,5	12,9
3	369	9200	42,4	15,6
4	547	11800	43,5	16,3
5	556	7910	55,8	120
6	974	5310	11,7	14,6
7	307	8790	32,6	46,2
8	283	14500	12,2	53,9
9	291	12800	61,7	171
10	345	17900	27,9	234
11	458	42100	192	160
12	2210	40400	14	14,1
Média			48,3	73,2
G3C				
1	245	48700	8,76	7,67
2	252	2950	8,98	76,9
3	819	2440	9,20	0,00
4	241	1930	0,00	8,92
5	622	4700	0,00	17,6
6	5810	25600	24,8	23,5
7	2430	44000	38,4	47
8	715	44600	20,9	107
9	508	17900	46	33,3
10	271	5970	0,00	0,00
11	391	12700	0,00	0,00
12	1260	12000	0,00	9,13
Média	750**	12232**	13,09	27,59

* G3: Preparo biomecânico com solução salina fisiológica apirogênica

MIC = Medicação intracanal

G3A- MIC: Pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$; G3B- MIC: Polimixina B; G3C: associação CLX gel 2% + $\text{Ca}(\text{OH})_2$

** Média dos 36 espécimes na 1ª e na 2ª coleta

Tabela 8 – Resultados obtidos: quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/ml) no grupo G4 (n=12).

	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta
	G4			
1	593	1710	731	2950
2	528	3900	740	2360
3	209	3820	841	3790
4	261	1640	2580	1100
5	540	5380	1070	6850
6	481	602	676	2530
7	369	16100	2540	2630
8	355	4148	2320	721
9	680	4900	2000	1000
10	2470	18300	8530	3830
11	1480	5160	5920	3740
12	1810	7630	4700	3180
Média	815	6108	2720	2890

* Preparo biomecânico com solução fisiológica apirogênica e medicação intracanal solução fisiológica apirogênica

As Figuras 12, 13, 14, e 15 representam a análise descritiva da distribuição dos valores de endotoxina obtidos após a 1ª, 2ª, 3ª e 4ª coletas, respectivamente. A distribuição não simétrica dos dados verificada nas figuras justifica a utilização do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (5%).

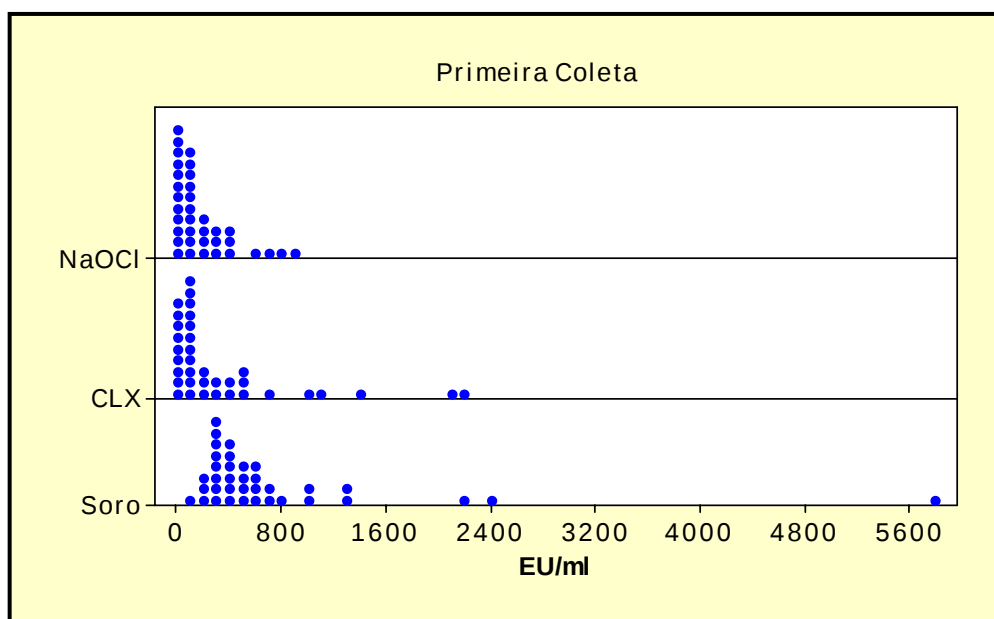


FIGURA 14 – Diagrama de pontos (Dotplot) dos valores de endotoxina obtidos na primeira coleta

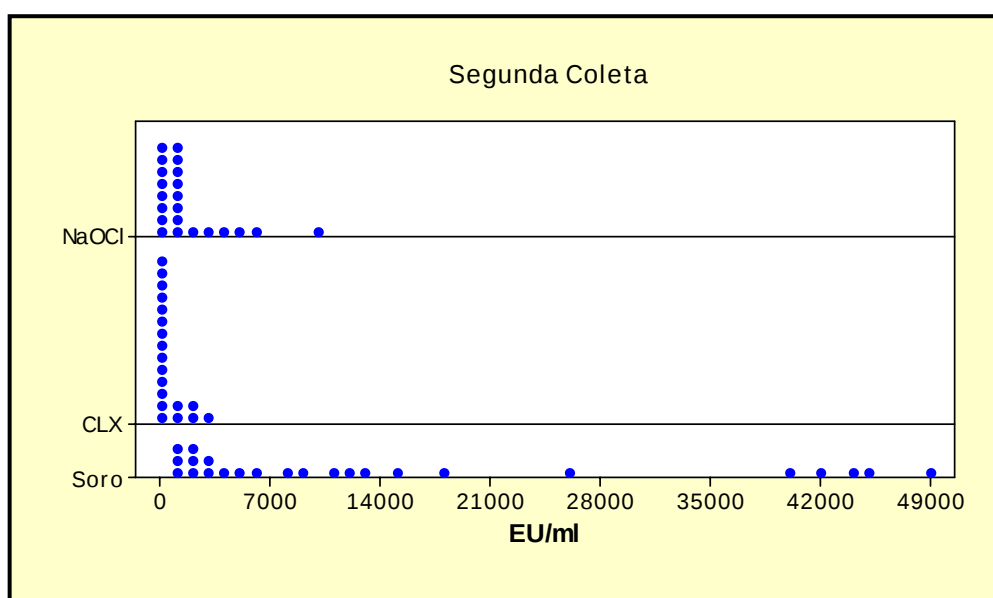


FIGURA 15 – Diagrama de pontos (Dotplot) dos valores de endotoxina obtidos na segunda coleta

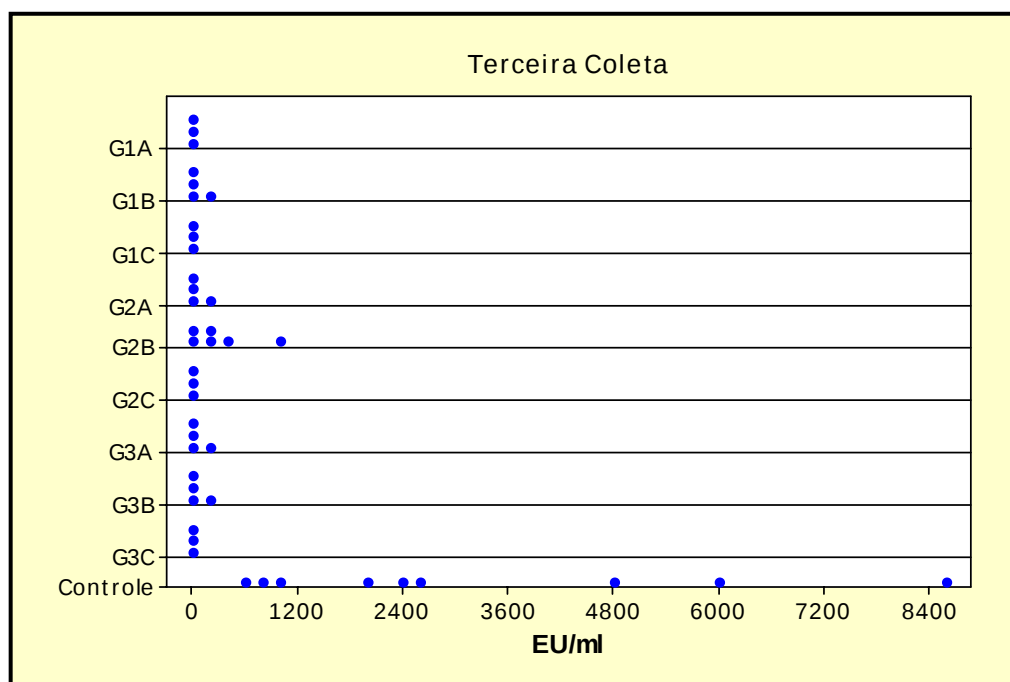


FIGURA 16 – Diagrama de pontos (Dotplot) dos valores de endotoxina obtidos na terceira coleta

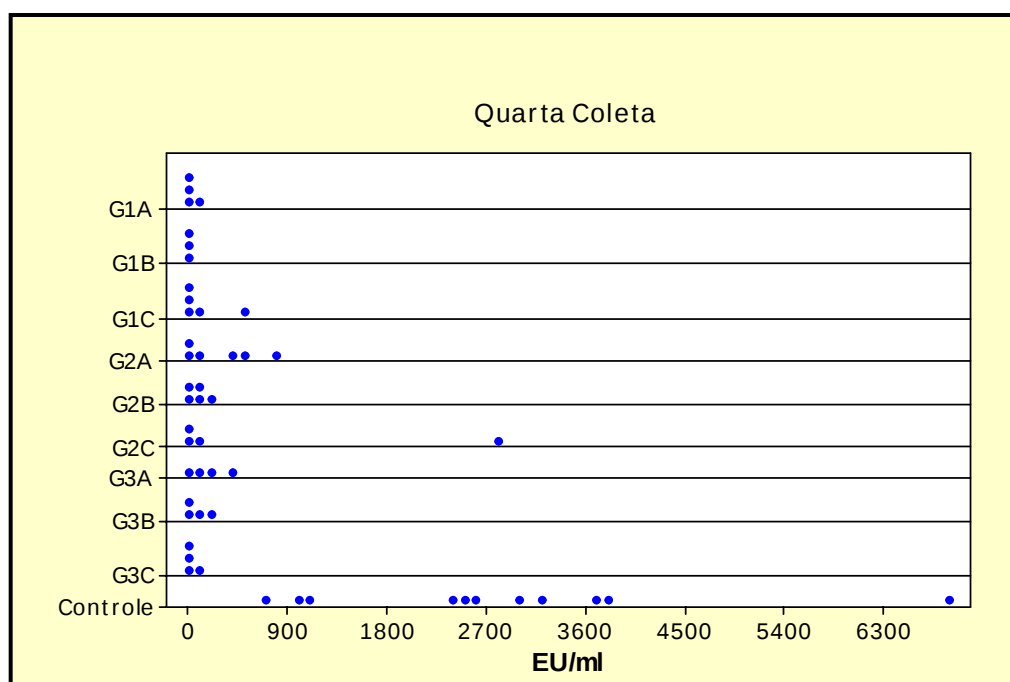


FIGURA 17 – Diagrama de pontos (Dotplot) dos valores de endotoxina obtidos na quarta coleta

Os dados foram analisados pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (5%) da primeira coleta e da segunda coleta, pôde-se verificar que houve diferença significativa entre os grupos (Tabelas 9 e 10), sendo o G1 (PBM: NaOCl) e o G2 (PBM: CLX) semelhantes entre si ($p>0,05$) e diferentes do G3 (SFA) ($p<0,05$). Os valores da média, desvio-padrão, mediana e grupos homogêneos estão expressos nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 – Estatística descritiva dos valores da média, desvio padrão e representação dos grupos homogêneos na primeira coleta.

Grupos	N	Média	Desvio-padrão	Mediana	Grupos Homogêneos*
1	36	202,6	232,3	118,5	B
2	36	366,6	550,7	104,9	B
3	36	750,0	1004	444	A

* letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

Tabela 10 – Estatística descritiva dos valores da média, desvio padrão e representação dos grupos homogêneos na segunda coleta.

Grupos	N	Média	Desvio-padrão	Mediana	Grupos Homogêneos*
1	36	1256	2049	563	B
2	36	555	790	227	B
3	36	12232	14186	6940	A

* letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

Aplicando-se a análise estatística na terceira e quarta coleta, pôde-se verificar que houve diferença significativa entre os grupos (Tabelas 11 e 12). Na terceira coleta (Tabela 11), os grupos G1A (PBM: NaOCl; MIC: Calen), G1B (PBM: NaOCl; MIC: PmB), G1C (PBM: NaOCl; MIC: $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{CLX}$), G2A (PBM: CLX; MIC: Calen), G2C (PBM: CLX;

MIC: $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{CLX}$), G3A (PBM: SFA + Calen), G3C (PBM: SFA; MIC: $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{CLX}$), foram estatisticamente diferentes do grupo controle G4 ($p < 0,05$). Os grupos G1C (PBM: NaOCl; MIC: $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{CLX}$), G2A (PBM: CLX; MIC: Calen), G2C (PBM: CLX; MIC: $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{CLX}$) e G3C (PBM: SFA; MIC: $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{CLX}$) apresentaram os menores valores de endotoxinas, sendo estatisticamente semelhantes aos grupos G1A (PBM: NaOCl; MIC: Calen), G1B (PBM: NaOCl; MIC: PmB), G3A (PBM: SFA; MIC: Calen), e G3B (PBM: SFA + PmB) ($p > 0,05$). Embora os grupos G2B (PBM: CLX; MIC: PMB) e G3B (PBM: SFA + PmB), que utilizaram a polimixina B como medicação intracanal, tenham diminuído a quantidade de endotoxina nos canais radiculares, esta não foi suficiente para indicar diferença estatística significativa em relação ao grupo controle (G4) ($p > 0,05$). Entretanto, o grupo G2B também foi semelhante aos grupos G1A, G1B e G3A, e G3B foi semelhante aos demais ($p > 0,05$).

Tabela 11 – Estatística descritiva dos valores da média, desvio padrão e representação dos grupos homogêneos na terceira coleta.

Grupos*	N	Média	Desvio-padrão	Mediana	Grupos Homogêneos*
1A	12	19,05	16,43	14,25	B C
1B	12	33,79	32,24	19,45	B C
1C	12	8,97	16,97	4,05	C
2A	12	34,6	57,7	7,19	C
2B	12	228,5	275,7	176,0	A B
2C	12	26,65	33,16	11,35	C
3A	12	27,7	35,9	12,8	B C
3B	12	48,3	49,3	37,5	A B C
3C	12	13,09	16,04	8,87	C
4	12	2720	2467	2160	A

* letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

Na quarta coleta também foi observada diferença estatística significativa entre os grupos (Tabela 12). O grupo G1B (PBM: NaOCl; MIC: PmB) apresentou menor valor de endotoxina sendo estatisticamente semelhante aos grupos G1A (PBM: NaOCl; MIC: Calen), G1C (PBM: NaOCl; MIC: $\text{Ca(OH)}_2 + \text{CLX}$), G2A (PBM: CLX; MIC: Calen), G2B (PBM: CLX; MIC: PmB), G2C (PBM: CLX; MIC: $\text{Ca(OH)}_2 + \text{CLX}$), G3B (PBM: SFA; MIC: PmB) e G3C (PBM: SFA; MIC: $\text{Ca(OH)}_2 + \text{CLX}$) ($p>0,05$). Os grupos G2B (PBM: CLX; MIC: PmB) e G3A (PBM: SFA; MIC: Calen), embora tenham diminuído a quantidade de endotoxina nos canais radiculares, esta não foi suficiente pra indicar diferença estatística significativa em relação ao grupo 4 (controle). Os demais grupos G1A, G1B, G1C, G2A, G2C, G3B, G3C promoveram redução significativa de endotoxinas em relação ao grupo controle G4 ($p<0,05$).

Tabela 12 – Estatística descritiva dos valores da média, desvio padrão e representação dos grupos homogêneos na quarta coleta.

Grupos*	N	Média	Desvio-padrão	Mediana	Grupos Homogêneos*
1A	12	29,0	38,6	12,5	B C
1B	12	9,61	6,05	9,58	C
1C	12	72,6	138,3	23,9	B C
2A	12	217,9	321,1	16,9	B C
2B	12	67,5	44,5	67,5	A B C
2C	12	259	797	17,2	B C
3A	12	121,3	108,1	95,3	A B
3B	12	73,2	77,6	33,2	B C
3C	12	27,59	33,89	13,37	B C
4	12	2890	1655	2790	A

* letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

6 DISCUSSÃO

6.1 Da metodologia

A utilização de dentes humanos em pesquisas *in vitro* enfrenta algumas dificuldades como obtenção dos dentes e padronização da amostra. Para esta pesquisa foram obtidos dentes de pacientes que foram indicados para exodontia, na maior parte dos casos por problemas periodontais. Apesar das dificuldades como idade do dente e variações anatômicas, no presente estudo foram utilizados dentes unirradiculados, que tiveram suas coroas seccionadas, padronizando o tamanho dos espécimes em $16 \pm 0,5$ mm. Os canais radiculares foram instrumentados até a lima Kerr nº 30 para padronização do diâmetro do canal radicular. Foi realizado o vedamento do ápice das raízes com resina fotopolimerizável e posterior impermeabilização das raízes com resina epóxi para garantir perfeito vedamento e impossibilitar a saída dos microrganismos e substâncias químicas auxiliares durante a instrumentação.

As raízes foram distribuídas aleatoriamente e fixadas com resina acrílica quimicamente ativada em placas de cultura de células de 24 poços, a fim de evitar a manipulação e conseqüente contaminação dos canais radiculares, além de facilitar a instrumentação. Após isto, os espécimes e todo material foram esterilizados com radiação gama cobalto 60, pela Empresa Brasileira de Radiação (EMBRARAD). Esta radiação é

capaz de neutralizar pirógenos provavelmente devido a destruição da porção polissacarídica e alteração do lipídeo A (Csako et al.¹⁰).

A escolha do tema deste trabalho foi devido ao conhecimento de que os microrganismos e seus produtos representam papel fundamental na etiologia das doenças pulpares e periapicais; quando da sua persistência no canal radicular induzem e mantêm reação inflamatória na região periapical (Kakehashi et al.²⁷). Desde a década de 80, com o aprimoramento dos resultados de cultura microbiológica, deu-se ênfase a presença de microrganismos anaeróbios nas infecções endodônticas (Mattison et al.³⁶; Sundqvist et al.⁶⁸; Seltzer e Farber⁶⁰; Leonardo et al.³²) e, Fabricius et al.¹⁷, verificaram que em dentes com necrose pulpar recente, as bactérias anaeróbias representam 50% da microbiota endodôntica e após 6 meses 90%. Além disto, sabe-se que as bactérias anaeróbias Gram-negativas possuem na sua parede celular externa endotoxinas, que são complexos lipopolissacarídeos (LPS). O LPS, molécula de alto peso molecular, é constituído de três partes. A primeira parte é o antígeno O que é formado por repetidas unidades oligossacarídicas, que são específicas de um grupo e determinadas pela identidade da respectiva bactéria, sendo esta região única para cada cepa bacteriana. O corpo oligossacarídico representa a segunda parte, região do núcleo, que contém ácido 2-keto-3-deoxioctônico (KDO) ou heptose, galactose, glicose. E a terceira parte é o lipídeo A, responsável pela parte tóxica da endotoxina (Caroff et al.⁷). Desta forma, estudar a ação de substâncias químicas que atuem sobre o LPS durante o tratamento endodôntico, é de fundamental importância para o sucesso desta terapia.

Apesar de *Escherichia coli* não ser uma bactéria comumente encontrada no interior de canais radiculares com polpa necrosada, sua endotoxina apresenta a estrutura básica do componente lipídico, que representa o centro ativo responsável pela toxicidade do LPS. A escolha da *Escherichia coli* neste estudo é devido a várias

pesquisas encontradas na literatura utilizando sua endotoxina para verificação da indução de lesões periapicais (Barthel et al.²; Mattison et al.³⁶; Haight-Ponce et al.²²; Nelson-Filho et al.⁴³). Além disso, estudar a ação de medicamentos e substâncias químicas auxiliares ao preparo biomecânico sobre endotoxina deve-se ao fato dos questionamentos feitos nos últimos anos (Buttler et al.⁶; Haight-Ponce et al.²²), será que somente as substâncias químicas auxiliares não seriam suficientes para neutralizar endotoxina? Ou será que a medicação intracanal é mesmo necessária para neutralizar endotoxina? Alguns estudos recentes (Oliveira et al.^{48,49}; Tanomaru et al.⁷⁰) já responderam parte destes questionamentos, mas o presente trabalho propôs a associação do preparo biomecânico à medicação intracanal.

Os canais foram contaminados com *E. coli* por 14 dias e após iniciou-se o preparo biomecânico. Previamente à definição deste período, foi realizado um estudo piloto onde os canais foram contaminados por 7, 14 e 21 dias seguidos da análise em MEV para verificar a penetração da *E. coli* nos túbulos dentinários. Foi observada penetração intensa da bactéria no interior dos túbulos dentinários em 14 dias sendo, portanto, esse período o tempo necessário para a contaminação da massa dentinária. Neste estudo piloto, as raízes não foram seladas com cimento provisório; foi colocada apenas uma bolinha de algodão na entrada dos canais radiculares. As placas permaneceram tampadas entre as coletas durante todo o período do experimento.

As substâncias químicas auxiliares utilizadas durante o preparo dos canais radiculares neste estudo foram: hipoclorito de sódio 2,5% e a clorexidina gel 2%. O hipoclorito de sódio é a substância mais utilizada na terapia endodôntica, apresentando muitas propriedades, entre elas, atividade antimicrobiana (Leonardo³⁰; Menezes et al.³⁸; Siqueira Jr et al.⁶³; Tanomaru et al.⁷¹). A solução do hipoclorito de sódio é indicada nas concentrações acima de 2,5% para os casos de dentes com necrose

pulpar, principalmente quando acompanhadas de lesão periapical visível radiograficamente. Como as endotoxinas estão presentes em canais radiculares com necrose pulpar, acompanhados ou não de lesões periapicais, optou-se pela utilização do hipoclorito de sódio na concentração de 2,5%.

A clorexidina gel 2% associada à solução salina fisiológica vem sendo utilizada na terapia endodôntica na instrumentação dos canais radiculares devido às suas propriedades de atividade antimicrobiana com efeitos residuais por até 168 horas (Weber et al.⁷⁸). Além disto, Tanomaru Filho et al.⁷² verificaram que o hipoclorito de sódio na concentração de 0,5% induz resposta inflamatória, entretanto, a clorexidina não induz resposta inflamatória significativa, sendo assim uma alternativa para auxiliar a instrumentação de canais radiculares. A clorexidina utilizada neste estudo foi manipulada na Farmácia de manipulação Byofórmula (São José dos Campos, SP, Brasil) sob a forma de gel a 2% com base em natrosol 0,8%. Nesta formulação, a clorexidina gel se torna menos viscosa, facilitando assim sua manipulação nos canais radiculares.

No preparo biomecânico dos canais radiculares, o batente apical foi realizado até a lima K nº 50 e escalonamento até a lima K nº 80. Este escalonamento foi realizado com o intuito de se obter conicidade ideal dos canais radiculares e em consequência disso uma irrigação-aspiração mais efetiva.

Em relação ao volume do hipoclorito de sódio utilizado a cada troca de lima, Leonardo³⁰ recomenda a utilização de, no mínimo, 2,4 ml de solução irrigadora, após o uso de cada instrumento. Dessa forma, neste estudo, optou-se pela utilização de 3 ml de solução irrigadora. No grupo da clorexidina gel, a clorexidina foi levada ao canal radicular com auxílio de uma seringa, até o total preenchimento do mesmo e, a cada

troca de instrumento, utilizou-se 3 ml de solução salina fisiológica apirogênica.

No presente estudo não foi realizada a neutralização da solução de hipoclorito de sódio e da clorexidina gel 2% antes da coleta microbiológica. Optou-se pela não neutralização, pois previamente ao estudo, foram realizados testes iniciais com todas as substâncias químicas auxiliares e medicações para verificar a ocorrência de alguma alteração na reação. Foi verificado que estas soluções não alteram a reação do teste lisado de amebócito de *Limulus*.

Embora o hipoclorito de sódio e a clorexidina sejam comumente utilizados na prática endodôntica, não têm sido verificada efetividade destas substâncias sobre a endotoxina durante o preparo biomecânico do canal radicular (Oliveira et al.⁴⁸; Tanomaru et al.⁷⁰).

Com relação às medicações intracanaís, o hidróxido de cálcio é o curativo de demora mais utilizado. Além de todas as suas propriedades, antimicrobiana, neutralizadora do pH ácido e indutora de mineralização (Leonardo³⁰), o hidróxido de cálcio tem ação sobre a endotoxina (Barthel et al.²; Safavi & Nichols^{56,57}; Tanomaru et al.⁷⁰). Entretanto, a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio deve ser complementada associando-o a outra substância química a fim de aumentar o espectro de ação no interior dos canais radiculares. A clorexidina vem ganhando espaço para ser utilizada associada ao hidróxido de cálcio, uma vez que a clorexidina atua contra aeróbios, leveduras e sobre *Enterococcus faecalis*, que são os microrganismos mais resistentes à ação do hidróxido de cálcio (Ercan et al.¹⁵; Gomes et al.²⁰; Menezes et al.³⁹). Desta forma, no presente estudo optou-se pela associação do hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2%. Estudos têm mostrado que esta associação apresenta satisfatória atividade antimicrobiana e reparadora, além da efetividade sobre endotoxinas presentes no canal radicular (Menezes et al.³⁹; Soares et al.⁶⁵; Vianna et

al.⁷⁵). O período de 14 dias de ação da medicação intracanal foi devido ao hidróxido de cálcio necessitar desse tempo para difundir-se nas áreas de propagação microbiana e desta forma ter ação satisfatória (Nerwich et al.⁴⁴; Takahashi et al.⁶⁹). Leonardo et al.³³, verificaram em um estudo *in vivo*, que os melhores resultados histopatológicos após utilização do hidróxido de cálcio como medicação intracanal, ocorreram de 15 a 30 dias.

Ainda com relação às medicações intracanaís, houve interesse em avaliar a polimixina B, pois Oliveira et al.⁴⁹ verificaram *in vitro* que a polimixina B foi capaz de inativar endotoxinas dos canais radiculares por 7 dias. A polimixina B utilizada no presente estudo foi manipulada na Farmácia de manipulação Ophtalmos Fórmulas Oficiais Ltda. (São Paulo, SP, Brasil), sob a forma de colírio, contendo 1 mg/ml de sulfato de polimixina B, o que corresponde a 10.000 UI, mesma concentração presente nas soluções otológicas.

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

O uso do LAL envolvido na detecção de endotoxinas bacterianas foi observado inicialmente por Bang¹ através de uma infecção por bactérias Gram-negativas no caranguejo *Limulus polyphemus* que resultou em uma coagulação intravascular fatal. Mais tarde, Levin e Bang³⁵, demonstraram que esta coagulação foi o resultado de uma ação entre a endotoxina e uma proteína coagulável presente nos amebócitos circulantes no *Limulus*. Seguindo o desenvolvimento de um anticoagulante adequado para o sangue do *Limulus*, os autores prepararam um lisado do amebócito que foi um indicador extremamente sensível à presença de endotoxina. Estes mesmos autores demonstraram ainda que a formação do coágulo foi resultado de uma reação enzimática

entre a endotoxina e uma proteína coagulável na circulação do amebócito de *Limulus*.

Alguns estudos utilizam o teste Gel Clot (Lisado do Amebócito de *Limulus*) para detecção de endotoxinas (Oliveira et al.^{48,49}). Este método é mais acessível e de menor custo por não necessitar do leitor cinético para detectar endotoxina. Neste método, são colocadas amostras dos canais radiculares juntamente com o reagente do LAL em tubos apirogênicos. Esses tubos são levemente agitados, permanecendo em banho-maria a 37° C durante 1 hora. Após esse período é verificada a formação ou não do gel inclinando-se os tubos (análise qualitativa).

O teste utilizado neste estudo foi o teste cromogênico do lisado do amebócito de *Limulus*, que é o método mais sensível e confiável para detecção de endotoxinas, permitindo quantificar a endotoxina com maior precisão. Neste teste, o leitor cinético acoplado a um microcomputador com *software* Wink QCL específico realiza o gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Este *software* calcula automaticamente os parâmetros da curva-padrão e os valores da quantidade de endotoxina das amostras dos canais radiculares. Este teste também é utilizado por outros autores (Jacinto et al.²⁶; Khabazz et al.²⁸; Nissan et al.⁴⁵; Schein & Schilder⁵⁹).

6.2 Dos resultados

A análise microbiológica referente à primeira coleta (imediatamente após o preparo biomecânico) mostrou completa eliminação de *E.coli* em todos os espécimes dos grupos do hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina gel 2%, entretanto, no grupo da solução salina fisiológica houve apenas redução dos microrganismos. Estes resultados mostraram que o preparo biomecânico com hipoclorito de sódio 2,5% e

clorexidina gel 2% foram efetivos na eliminação de *E. coli* em canais radiculares. Observa-se ainda que estas substâncias, associadas ao preparo do canal radicular, foram capazes de eliminar *E. coli* da massa dentinária, uma vez que mesmo decorridos 7 dias do preparo biomecânico, e com o canal contendo solução salina fisiológica apirogênica, não houve crescimento da bactéria. Outros estudos têm demonstrado atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio em diversas concentrações e da clorexidina gel ou solução 2% sobre *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* (Ferraz et al.¹⁸; Siqueira Jr et al.⁶³; Tanomaru Filho et al.⁷¹). Entretanto, apesar das substâncias químicas utilizadas no preparo biomecânico terem apresentado atividade antimicrobiana sobre *E. coli*, estas não foram capazes de eliminar as endotoxinas presentes no canal radicular.

Na primeira coleta, verificou-se que o grupo do hipoclorito de sódio 2,5% e da clorexidina gel 2% apresentaram menores quantidades de endotoxina (202 e 366 EU/ml, respectivamente) quando comparados ao grupo controle (750 EU/ml) que foi utilizado apenas solução salina fisiológica apirogênica como irrigante auxiliar da instrumentação dos canais radiculares. Estes resultados concordam com outros estudos que também verificaram que o preparo biomecânico com solução de hipoclorito de sódio e clorexidina gel 2% não é suficiente para inativar a endotoxina (Buttler et al.⁶; Oliveira et al.⁴⁸; Silva et al.⁶¹), sendo necessária a complementação da ação com medicações intracanaís. Verificou-se ainda na segunda coleta, após 7 dias, que a quantidade de endotoxina foi mais que o dobro para o grupo do hipoclorito de sódio 2,5% (531 EU/ml) e o triplo para o grupo da clorexidina gel 2% (1256 EU/ml). Isto comprova que o preparo biomecânico com hipoclorito de sódio ou clorexidina elimina completamente *E. coli* dos canais radiculares, entretanto, com a morte da bactéria, as endotoxinas permanecem na

massa dentinária necessitando desta forma, de medicações que atuem, inativando estas endotoxinas.

Comprovando a importância das substâncias químicas auxiliares na diminuição do número de microrganismos ou de sua eliminação, verificou-se que nos grupos onde a instrumentação foi realizada apenas com solução salina fisiológica, houve diminuição no número de *E. coli* presente após o preparo biomecânico, mas não eliminação do mesmo. A utilização da medicação intracanal foi necessária e mostrou-se eficaz contra as bactérias ainda presentes nos canais radiculares. Assim, tanto o hidróxido de cálcio, como a polimixina B e a associação hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2%, foram capazes de eliminar completamente *E. coli* dos canais radiculares. Uma vez que, na prática clínica, outros microrganismos estão presentes no sistema de canais radiculares e, além disto, muitos são resistentes a ação das substâncias químicas auxiliares utilizadas no preparo do canal radicular, a utilização de medicação intracanal faz-se necessária para eliminação dos microrganismos presentes.

Em relação à quantidade de endotoxinas, após a utilização de medicação intracanal, os resultados mostraram redução significativa da endotoxina com todas as medicações testadas, com valores bem menores quando comparados ao grupo controle, o qual não recebeu nenhuma medicação, e quando comparados com a segunda coleta. Em alguns espécimes, a pasta Calen e a associação hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% foram capazes de inativar completamente as endotoxinas. Já a polimixina B reduziu a quantidade de endotoxinas, entretanto não foi capaz de inativá-la completamente em nenhum dos espécimes. Isto demonstra que o hidróxido de cálcio, a polimixina B e a associação hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% apresentaram capacidade antimicrobiana sobre *E. coli*, mas somente a associação clorexidina gel 2% mais hidróxido de cálcio e a pasta Calen, em alguns

espécimes, foram capazes de neutralizar totalmente as endotoxinas nos canais radiculares.

Estudos *in vitro* e *in vivo* já mostraram que o hidróxido de cálcio é capaz de inativar endotoxinas. Safavi & Nichols⁵⁶, em 1993, verificaram que o hidróxido de cálcio hidrolisa o lipídeo A, resultando na liberação elevada de ácidos graxos livres. Em 1994, estes mesmos autores⁵⁷ identificaram a produção de prostaglandinas E2 nos sobrenadantes de monócitos estimulados pelo LPS, entretanto não a identificaram naqueles que foram tratados previamente com hidróxido de cálcio. Esses experimentos sugeriram que a ação biológica do LPS requer a presença de ácidos graxos hidroxilados ligados a junção éster e estas ligações são rompidas pelo tratamento com o hidróxido de cálcio. Ainda Barthel et al.², verificaram que o hidróxido de cálcio é capaz de eliminar a capacidade do LPS de induzir a produção de TNF- α em monócitos periféricos do sangue. A redução na produção de IL-1 β foi observada também quando o LPS foi tratado com hidróxido de cálcio em um estudo *in vitro* realizado por Olsen et al.⁵⁰. Em estudo em cães, Nelson Filho et al.⁴³ e Silva et al.⁶², concluíram que a endotoxina causa lesão periapical visível radiograficamente, entretanto quando associada ao hidróxido de cálcio, esta endotoxina fica desprovida de ação tóxica. Os resultados do presente estudo também concordam com o estudo de Tanomaru et al.⁷⁰ que, utilizando metodologia semelhante, verificaram que o preparo biomecânico com as soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina não foi capaz de inativar os efeitos da endotoxina, entretanto o hidróxido de cálcio inativou os efeitos induzidos pela endotoxina.

Neste estudo, verificou-se que a associação hidróxido de cálcio mais clorexidina foi a medicação intracanal mais efetiva na neutralização das endotoxinas. O mecanismo de ação desta associação sobre endotoxinas é o mesmo mecanismo de ação do hidróxido de cálcio citado anteriormente. Esta associação une as propriedades antimicrobianas da clorexidina com o potencial de mineralização e as

propriedades de neutralização das endotoxinas do hidróxido de cálcio. A menor ação da pasta Calen quando comparada a associação hidróxido de cálcio mais clorexidina gel 2% (sem diferença estatística significativa), provavelmente deve-se a liberação mais lenta de íons OH^- da pasta Calen quando comparada a associação do hidróxido de cálcio com a clorexidina, que teve uma ação mais rápida e conseqüentemente maior para o período utilizado.

A efetividade da polimixina B neste estudo foi semelhante ao trabalho de Oliveira et al.⁴⁹, 2005, que utilizaram a polimixina B como medicação intracanal por 7 dias e verificaram sua diminuição sobre endotoxinas. A neutralização da endotoxina pela polimixina B como prevenção da letalidade endotóxica têm sido observada em animais (Parviainen et al.⁵²; Rifkind⁵⁴; Rifkind e Palmer⁵⁵;). Além da letalidade endotóxica, têm sido observado também a neutralização da reação de Shwartzman em coelhos (Craig et al.⁹). Rifkind e Palmer⁵⁵ sugerem que alguns antibióticos polipeptídeos catiônicos, como a polimixina B, são capazes de neutralizar as endotoxinas pela combinação direta à carga eletronegativa do lipídeo A da molécula de endotoxina. Mais tarde, Morrison e Jacobs^{40,41} verificaram que a polimixina B tem a habilidade de se ligar com alta afinidade à porção do lipídeo A, alterando assim, a conformação tridimensional da molécula de LPS. Essa alteração conformacional possivelmente impede o complexo endotoxina-polimixina B de se ligar ao receptor CD14 nos monócitos, inibindo a liberação de mediadores inflamatórios (Evans et al.¹⁶). Entretanto, Oliveira et al.^{48,49} verificou efetiva neutralização da endotoxina após o preparo biomecânico com polimixina B ou como medicação intracanal por 7 dias. Provavelmente, a polimixina B, por ser um antibiótico, apresenta ação local imediata, perdendo sua efetividade após algumas horas no interior do canal radicular. Desta forma, como solução irrigadora, a polimixina B poderia ser uma opção para neutralizar endotoxina, mas como medicação intracanal não foi tão efetiva. Isto pode ser melhor explicado pela ação

sistêmica da polimixina B nos casos de sepsis por bactérias Gram-negativas e em choque endotóxico (Rikfind⁵⁴; Evans et al.¹⁶). Ao administrar polimixina B são necessárias doses repetidas para manter a ação neutralizadora da endotoxina e, no presente estudo, a polimixina B foi utilizada em dose única, permanecendo durante 14 dias no canal radicular.

Nesta pesquisa, o grupo controle com a instrumentação realizada apenas com o auxílio de solução salina fisiológica foi interessante para mostrar que o processo irrigação/aspiração reduz a quantidade de microrganismo e de endotoxina dos canais radiculares, embora não seja capaz de eliminá-los completamente. Entretanto, a utilização de substâncias químicas auxiliares que tenham propriedades antimicrobianas é fundamental para a completa eliminação dos microrganismos do canal radicular. No presente estudo, as substâncias químicas auxiliares testadas, hipoclorito de sódio e clorexidina eliminaram completamente *E. coli* dos canais radiculares e reduziram a quantidade de endotoxinas. Embora tenha ocorrido essa redução, a neutralização de endotoxinas no canal radicular não foi total. Somente a utilização da medicação intracanal foi capaz de reduzir significativamente e, em alguns espécimes até neutralizar totalmente as endotoxinas.

Dessa forma, é de fundamental importância a utilização de substâncias químicas auxiliares que tenham propriedades antimicrobianas e medicações intracanaís que possam ter maior ação nas camadas mais profundas dos túbulos dentinários, canais secundários e crateras de reabsorção. Resta ainda saber a real significância da endotoxina presente no canal radicular após a eliminação de todos os microrganismos presentes no sistema de canais. Por quanto tempo esta endotoxina teria ação após a morte do microrganismo? Qual a significância clínica desta endotoxina após a morte do microrganismo? Estas respostas devem ser objetos de estudo futuros para melhor compreensão dos mecanismos de manutenção das lesões periapicais.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- a) O preparo do canal radicular com a solução de hipoclorito de sódio 2,5% e a clorexidina gel 2%, como substâncias químicas auxiliares, promoveu a eliminação total de *Escherichia coli* nos canais radiculares e diminuiu significativamente a quantidade de endotoxinas, comparado ao grupo controle;
- b) Todas as medicações intracanaís utilizadas neste estudo foram efetivas sobre *Escherichia coli*;
- c) Somente a medicação intracanal é capaz de reduzir significativamente ou neutralizar completamente endotoxinas presentes nos canais radiculares, sendo que a associação hidróxido de cálcio P.A. e clorexidina gel 2% foi mais efetiva, seguido da pasta de hidróxido de cálcio, embora sem diferença estatística significativa. A polimixina B também apresentou capacidade de neutralizar endotoxinas, entretanto, foi menos efetiva que as demais medicações.

8 REFERÊNCIAS*

1. Bang FB. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. Bull Johns Hopkins Hosp. 1956;98(5):325-51.
2. Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. Int Endod J. 1997;30(3):155-9.
3. Basrani B, Santos M, Tjaderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J. et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002;94(2):240-5.
4. Berber VB, Gomes BPFA, Sena ME, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, Souza Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. Int Endod J. 2006;39(1):10-7.
5. 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.
6. Buttler TK, Crawford JJ. The detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypochlorite on endotoxins. J Endod. 1982;8(2):59-66.

* Baseado em:

Internacional Comité 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/bsd/uniform_requirements.html

7. Carrof M, Karibian D, Cavaillon JM, Cavaillon NH. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides.; *Microbes Infect.* 2002;4(9):915-26.
8. Corrigan JJ, Bell BM. Comparison between the polymyxins and gentamicin in preventing endotoxin-induced intravascular coagulation and leukopenia. *Infect Immun.* 1971;4(5):563-6.
9. Craig WA, Turner JH, Kunin CM. Prevention of the generalized Schwartzman reaction and endotoxin lethality by polymyxin B localized in tissues. *Infect Immun.* 1974;10(2):287-92.
10. Csako G, Elin RJ, Hochstein D, Tsai CH. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infect Immun.* 1983;41(1):190-6.
11. Dahlén G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res.* 1980;59(6):1033-40.
12. Dahlén G, Magnusson BC, Moller A. Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Esobacterium nucleatum* on the periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*. *Archs Oral Biol.* 1981;26(7):591-8.
13. Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza Filho FJ. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99(6):768-72.
14. Darrow DH, Keithley EM. Reduction of endotoxin-induced inflammation of the middle ear by polymyxin B. *Laryngoscope.* 1996;106(8):1028-33.
15. Ercan E, Dalli M, Dulgergil T. *In vitro* assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine

- against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;102(2):27-31.
16. Evans ME, Feola DJ, Rapp RP. Polymixin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. Ann Pharmacother. 1999;33(9):960-7.
 17. Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Möller AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. Scand J Dent Res. 1982;90(2):134-44.
 18. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. J Endod. 2001;27(7):452-5.
 19. Ferreira CM, Rosa OPS, Torres AS, Ferreira FBA, Bernardinelli N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. Braz Dent J. 2002;13(2):118-22.
 20. Gomes BPFA, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006; 102(4):544-50.
 21. 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(2):100-5.
 22. Haight-Ponce E, Endo H, Horiuchi H. Endotoxin activity measured by limulus assay. Endod Dent Traumatol. 1999;15(3):109-12.
 23. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1991;71(4):492-5.

24. Horiba N, Maekawa Y, Matsumoto T, Nakamura H. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. *J Endod.* 1990;16(7):331-4.
25. Horiba N, Maekawa Y, Yamauchi Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Complement activation by lipopolysaccharides purified from Gram-negative bacteria isolated from infected root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992;74(5):492-5.
26. Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol.* 2005;54(Pt 8):777-83.
27. 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(3):340-9.
28. Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in caries: association with pulpal pain. *Int Endod J.* 2000;33(2):132-7.
29. Khabbaz M, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91(5):587-93.
30. Leonardo MR. Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes Médicas; 2005.
31. Leonardo MR, Silva LAB, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in Endodontics. *J Appl Oral Sci.* 2004;12(2):93-8.
32. Leonardo MR, Silva LAB, Leonardo RT. Tratamento de canal radicular em sessão única: crença vs. Ciência. In: Feller C, Gorab R.

Atualização na clínica odontológica. São Paulo: Artes Médicas; 2000. cap.2,p.29-57.

33. Leonardo MR, Silveira FF, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Utrilla LS. Calcium hydroxide root canal dressing. Histopathological evaluation of periapical repair at different time periods. Braz Dent J. 2002;13(1):17-22.
34. 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.
35. Levin J, Bang FB. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. Thromb Diath Haemorrh. 1968;19(1):186-97.
36. Mattison GD; Haddix JE; Kehoe JC; Progulske-Fox A. The effect of Eikenella corrodens endotoxin on periapical bone. J Endod. 1987;13(12):559-65.
37. 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.
38. Menezes MM, Valera MC, Koga-Ito CY, Camargo CHR, Mancini MNG. *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. Int Endod J. 2004;37(5):311-9.
39. Menezes MM, Valera MC, Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Ação antimicrobiana da clorexidina gel associada ao hidróxido de cálcio sobre *C. albicans* [resumo Pc 038]. Braz Oral Res, 2004;18(supl):207.
40. Morrison DC, Jacobs DM. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharide. Immunochemistry. 1976;13(10):813-8.

41. Morrison DC, Jacobs DM. Inhibition of LPS-initiated activation of serum complement by polymyxin B. *Infect Immun*. 1976;13(1):298-301.
42. Morrison DC, Kline LF. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J Immunol*. 1977;118(1):362-8, 1977.
43. Nelson Filho P, Leonardo MR, Silva LAB, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod*. 2002;28(10):694-6.
44. Nerwich A, Figdor D, Endo D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod*. 1993;19(6):302-6.
45. Nissan R, Segal H, Pashley D, Stevens R, Trowbridge. Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin. *J Endod*. 1995;21(2):62- 4.
46. Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JAP. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J*. 2004;37(1):38-41.
47. Oliveira LD, Carvalho CAT, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. *Braz Oral Res*. 2005;19(1):5-10.
48. Oliveira LD, Carvalho CAT, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Efetividade *in vitro* de diferentes agentes irrigantes na neutralização de endotoxinas em canais radiculares [resumo Pb073]. *Braz Oral Res*. 2005;19(supl):166.
49. Oliveira LD, Leão MVP, Carvalho CAT, Camargo CHR, Valera MC, Jorge AOC. et al. *In vitro* effects of calcium hydroxide and polymix B on endotoxins in root canals. *J Dent*. 2005;33(2):107-14.

50. Olsen MH, DiFiore PM, Dixit SN, Veis A. The effects of calcium hydroxide inhibition on LPS induced release of IL-1 β from human monocytes in whole blood [abstract OR 30]. J Endod. 1999;25(4) (sp.iss):289.
51. Onçag O, 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.
52. Parviainen AK, Barton MH, Norton NN. Evaluation of polymyxin B in an ex vivo model of endotoxemia in horses. Am J Vet Res. 2001;62(1):72-6.
53. Pitts DL, Williams BL, Morton Jr TH. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. J Endod. 1982;8(1):10-8.
54. Rifkind D. Prevention by polymyxin B of endotoxin lethality in mice. J Bacteriol. 1967;93(4):1463-4.
55. Rifkind D, Palmer JD. Neutralization of endotoxin toxicity in chick embryos by antibiotics. J Bacteriol. 1966;92(4):815-9.
56. Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. J Endod. 1993;19(2):76-9.
57. Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. J Endod. 1994;20(3):127-9.
58. Safavi KE, Nichols FC. Effects of a bacterial cell wall fragment on monocyte inflammatory function. J Endod. 2000;26(3):1535.
59. Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. [tribute to Dr. Herbert Schilder]. J Endod. 2006;32(4):293-5.
60. Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994;78(5):634-45.

61. Silva LAB, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J*. 2004;15(2):109-114.
62. Silva LAB, Nelson Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin *in vivo*. *J Endod*. 2002;28(2):94-8.
63. Siqueira JF Jr, Rôças IS, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2,5% and 5,25% sodium hypochlorite. *J Endod*. 2000;26(6):331-4.
64. Soares JA, César CAS, Pires DR Jr, Aguiar CF, Silva PRM, Souza MSGS. Soluções irrigadoras versus dor pós endodontia em sessão única, em dentes com patologias periapicais. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2001;55(2):125-9.
65. Soares JA, Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Ito IY. Ação anti-séptica e reparadora da associação hidróxido de cálcio e clorexidina em dentes de cães com lesões periapicais [resumo Fc004]. *Pesq Odontol Bras*. 2003;17(supl.):104.,
66. Stashenko P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol*. 1990;6(3):89-96.
67. Stokes DC, Shenep LJ, Fishman M, Hildner WK, Bysani GK, Rufus K. Polymyxin B prevents lipopolysaccharide-induced release of tumor necrosis factor- α from alveolar macrophages. *J Infect Dis*. 1989;160(1):52-7.
68. Sundvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod*. 1992;18(9):427-30.
69. Takahashi G, Hosoya N, Takizawa H, Nakamura J. Periapical environment after applying Ca(OH)_2 into root canals *in vitro* [abstract 276]. *J Dent Res* 1996;75(suppl.):52.

70. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LAB. Effect of different irrigation solutions. *Int Endod J*. 2003;36(11):733-9.
71. Tanomaru JMG, Rodrigues VMT, Tanomaru Filho M, Spolidorio DMP, Ito IY. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras empregadas em Endodontia. *Rev Paul Odontol*. 2005;27(1):38-40.
72. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LAB, Aníbal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J*. 2002;35:735-9.
73. Vafaie NM, Dobeck JM, Warbington ML, Dibart S, Harris M, Skobe Z. DNA analyses of bacteria in symptomatic endodontically treated teeth [abstract OR 32] *J Endod*. 1999;25(4):290.
74. Valera MC, Rego JM, Jorge AOC. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. *J Endod*. 2001;27(6):401-8.
75. Vianna ME, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Avaliação *in vitro* do efeito dos procedimentos endodônticos sobre microrganismos e LPS [resumo Pa084]. *Braz Oral Res* 2006;20(supl.):161.
76. 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.
77. Wang CY, Stashenko P. The role of interleukin-1 α in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. *Oral Microbiol Immunol*. 1993;8(1):50-6.
78. Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or

- 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. *J Endod.* 2003;29(9):562-4.
79. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod.* 1997;23(4):229-31.
80. Wolff SM. Biological effects of bacterial endotoxins in man. *J Infect Dis.* 1973;128(Suppl.):259-269.
81. 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.
82. Zerella JA, Fouad AF, Spangberg LSW. Effectiveness of a calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate mixture as disinfectant during retreatment of failed endodontic cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100(6):756-61.

Anexo A – Parecer Comitê de Ética em Pesquisa

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

R. Eng. Francisco José Lemos, 790 - R. São Carlos
13.200-000 - J. 13.200-000

 **CERTIFICADO**

Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **067/2005-PH/CEP**, sobre "**Avaliação in vitro da ação de substâncias químicas auxiliares e medicações Intracanaís sobre Escherichia Coli e sua endotoxina em canais radiculares**", sob a responsabilidade de **LILIAN EIKO MAEKAWA**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 11 de outubro de 2005.



Prof. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Maekawa LE. *In vitro* evaluation of the action of auxiliary chemical substances and intracanal medications on *Escherichia coli* and its endotoxin in root canals [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of auxiliary chemical substances and intracanal medications on *Escherichia coli* (*E. coli*) and its endotoxin in root canals. The study was conducted on 120 single-rooted teeth. After sectioning of crowns, the root canals were contaminated with a suspension of *E. coli* for 14 days. After collection of confirmation, they were submitted to instrumentation up to K 50 file and step-back preparation up to K 80 file. Thereafter, twelve roots were used as control group (G4) and 108 roots were divided into 3 groups (n=36) according to the auxiliary chemical substance used: G1) 2.5% sodium hypochlorite; G2) 2% chlorhexidine gel (CLX); G3) apyrogenic saline solution. After biomechanical preparation (BMP), these groups were subdivided according to the intracanal medication (ICM) employed (n=12): A) calcium hydroxide (Ca(OH)_2), B) polymyxin B, and C) Ca(OH)_2 + 2% CLX gel. The control group (G4) was used apyrogenic saline solution without application of intracanal medication. Samples of the root canal content were collected immediately after PBM (1st collection), at 7 days after PBM (2nd collection), immediately after 14 days of ICM activity (3rd collection), and 7 days after removal of ICM (4th collection). The following aspects were evaluated for all collections: a) antimicrobial activity; b) quantification of endotoxin by the *Limulus* amebocyte lysate test. The auxiliary chemical substances and ICMs employed were able to completely eliminate *E. coli* from root canals. Results of the amount of endotoxin were analyzed by the Kruskal-Wallis and Dunn (5%) statistical tests. In the first and second collection, it was verified that groups G1 and G2 were statistically different from group G3 ($p < 0.05$). In the third collection, groups G1C, G2A, G2C and G3C showed the lowest endotoxin values and were statistically similar to groups G1A, G1B, G3A and G3B ($p > 0.05$). In the fourth collection, group G1B showed the lowest endotoxin value and was statistically similar to groups G1A, G1C, G2A, G2B, G2C, G3B and G3C ($p > 0.05$). It was concluded that PBM with solutions with antimicrobial activity was able to eliminate *E. coli* from the root canals; however, the endotoxin may only be neutralized with the use of ICM, especially the association of Ca(OH)_2 + 2% CLX gel.

KEYWORDS: *Escherichia coli*, endotoxin, sodium hypochlorite, chlorhexidine, calcium hydroxide, polymyxin B.