

ANA CLAUDIA CARVALHO XAVIER

**DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS, QUANTIFICAÇÃO DE
ENDOTOXINAS E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO EXTRATO
GLICÓLICO DE PRÓPOLIS EM DENTES COM NECROSE
PULPAR E LESÃO PERIAPICAL**



2011

ANA CLAUDIA CARVALHO XAVIER

**DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS, QUANTIFICAÇÃO DE
ENDOTOXINAS E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO EXTRATO GLICÓLICO DE
PRÓPOLIS EM DENTES COM NECROSE PULPAR E LESÃO
PERIAPICAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP - Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade em Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho

São José dos Campos

2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

X19d Xavier, Ana Claudia Carvalho.

Detecção de microrganismos, quantificação de endotoxinas e avaliação
in vivo do extrato glicólico de própolis em dentes necrose pulpar e lesão
periapical / Ana Claudia Carvalho Xavier. - São José dos Campos: [s.n.],
2011.

123. .f.: il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de
Odontologia de São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista,
2011.

Orientador: Prof. Claudio Antonio Talge Carvalho

1. Substâncias químicas auxiliares. 2 Própolis. 3. Endotoxinas. 4. Reação
em Cadeia Polimerase. 5. Microrganismos. Carvalho, Claudio Antonio
Talge. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de
São José dos Campos. III. Título

tD64

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

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 01 de Julho de 2011 .

Assinatura:

E-mail: anaccx@gmail.com

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa.Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

Faculdade de Odontologia de Bauru

Universidade de São Paulo – USP

Profa. Adj. Marcia Carneiro Valera

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 07 de junho de 2011.

DEDICATÓRIA

*Aos meu país: Ana Mara Carvalho de Souza Xavier e Jaide
dos Santos Xavier*

*Queridos pais, não há palavras suficientes para agradecer-
lhes por tudo de bom que fizeram e ainda fazem por mim...
Sempre me deram todo o apoio e amor que eu precisei, de
forma incondicional. Não tenham dúvidas de que só cheguei
até aqui por que vocês me ajudaram. Sei que muitas vezes
desistiram de coisas para que eu e a Mari pudéssemos viver
nossos sonhos... Obrigada! Vocês são pessoas muito especiais!
Amo muito vocês!*

“Sem seu amor, eu nada seria...”

À minha irmã: Mariana Carvalho Xavier

Mari, você é um presente muito especial que recebi em minha vida. Obrigada por me ajudar em minha pesquisa e por entender quando não pude ficar com você porque tinha minhas obrigações... Obrigada por estar sempre ao meu lado... Obrigada pelos momentos de diversão, e pelos momentos em que ao seu lado pude voltar a me divertir como criança... Sei que agora você já está grande, mas saiba que nunca vai deixar de ser minha gatinha. Te amo!

“ O amor é a força mais sutil do mundo ”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho:

*Agradeço ao meu orientador pela oportunidade de
aprendizado. Obrigada pela confiança depositada em mim e
pela compreensão e otimismo nas horas difíceis.
Obrigada por me mostrar que o trabalho é importante, mas
que a família deve ter um lugar especial em nossas vidas.
Meu eterno carinho e gratidão por tê-lo como orientador.*

À Profa. Adj. Marcia Carneiro Valera :

*Agradeço à senhora o carinho e dedicação oferecidos não só a
mim, mas a todos os seus alunos.
A senhora não é só um exemplo de profissional, mas de vida.
Obrigada pelos conselhos e por ter me recebido sempre de
braços abertos e sorriso no rosto.
Meu eterno carinho e admiração*

AGRADECIMENTOS

*“Amigos são anjos que nos deixam de pé quando nossas asas
têm problemas em se lembrar como voar”*

Cartecia

Agradeço...

À Deus, que sempre me deu forças para continuar lutando, e que colocou tantos anjos em minha vida para me ajudar...

*À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos –
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.*

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À FAPESP pela concessão do Auxílio à Pesquisa, o qual possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

Aos Professores da Disciplina de Endodontia pelo carinho e pelos ensinamentos. Agradeço ao Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo pela sua disposição em ajudar e pelo carinho. A Profa. Adj. Ana Paula Martins Gomes, pelo carinho e alegria de sempre. Ao Prof. Dr. Renato Miotto Palo pela alegria e descontração de todos os momentos. À Profa. Dra. Simone Helena G. de Oliveira, pela disposição e bom humor.

À Profa. Substituta Lillian Eiko Maekawa, por ter sido minha professora e amiga nesses últimos 3 anos. Gostaria de agradecer por tudo que me ensinou, e pelos ótimos momentos que passamos juntas. Você é uma grande amiga.

À Profa. Substituta Marcia Maciel Menezes Ferraz, pelo carinho e amizade. Obrigada por ter confiado em mim para ficar ao seu lado na Clínica Integrada, por dois anos. Obrigada também pela ajuda e pelos conselhos dados, tanto a respeito de minha vida profissional quanto da pessoal.

À Profa. Dra. Luciane Dias Oliveira, obrigada por todo apoio e carinho que me deu durante esta pesquisa.

À Prof. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, por nos permitir o uso do Laboratório da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Às minhas queridas amigas Adriana Chung e Flávia Goulart da Rosa Cardoso, que sempre estiveram ao meu lado, e me deram tanto apoio nos momentos de stress. Sem a ajuda de vocês este trabalho seria impossível. Obrigada também pelos ótimos momentos que passamos juntas, pelas idas ao cinema, pelas festas, pela amizade, pelo carinho, e pelo apoio. Além disso, agradeço profundamente pela companhia nas horas de clínica, laboratório, viagens de carro a Piracicaba e nas noites passadas em hotéis por causa da pesquisa. Considero vocês grandes amigas.

Às minhas amigas do mestrado e do doutorado: Gleyce, Claudinha, Tatê, Mari, Nádia, Paty, Raffa, Silvia e Aletéia, que passaram esses dois últimos anos comigo. Estivemos sempre juntas em pesquisas, na salinha da pós, na clínica, em congressos e viagens. Sempre com bom humor, e uma ótima convivência. Todas sempre me animando, me ajudando, me fazendo feliz. Adorei fazer o mestrado ao lado de todas vocês. Espero que cada uma, em seu caminho, consiga tudo o que deseja, e que continuemos sempre nos encontrando, nem que seja só para comer um escondidinho ou para dar risada.

Ao Marcos Sérgio Endo, ao Frederico Canato Martinho, que nos receberam de braços abertos no Laboratório da FOP. Vocês nos ensinaram muito, sempre com muito carinho e atenção. Obrigada pela ajuda. Esta pesquisa não seria a mesma sem vocês.

Às funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora: Dona Marinete, Rosângela, Fernanda e Josiana, pelo carinho e por ter nos ajudado em tantos momentos.

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

Ao Carlos Alberto Guedes, pelas orientações nos projetos e relatórios da FAPESP.

Aos pacientes que colaboraram e possibilitaram a realização desta pesquisa.

As minhas queridas amigas, Aline Osses e Sheylla Moreira, que sempre torceram por mim e me ajudaram em todas as áreas da minha vida. Obrigada pelo carinho, alegria, confiança e momentos divertidos. Vocês são muito especiais para mim...

Aos meus padrinhos, Janete dos Santos Xavier de Abreu e Israel de Abreu, que tanto me amam. Sempre me apoiando e me divertindo. Amo vocês!

Aos meus avôs, Gilbertina dos Santos Xavier e Jaime Martins Xavier (in memorian), Rita Carvalho de Souza (in memorian) e Alfredo Quirino Filho. Obrigada pelos cuidados, pelos ensinamentos, pelas histórias, pelo carinho e pela atenção... Obrigada por terem sempre uma palavra de conforto e por quererem tanto o meu bem. Amo vocês demais.

A todos os meus primos, em especial a Cláudia, a Déia, a Gabi, o Thiago e o Juninho, que sempre estiveram ao meu lado, de um jeito ou de outro. Obrigada pelo carinho, pela ajuda, pela amizade, pelos bons momentos e pelas festas. Vocês têm um lugar especial no meu coração.

Aos meus tios e tias, em especial a tia Rita e a Teté, que tanto torcem por mim...

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

Muito Obrigada!

*“A morte do homem começa no instante em que ele desiste de
aprender “*

Albino Teixeira

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	15
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 Microrganismos em canais radiculares.....	24
2.2 Métodos Moleculares de detecção de microrganismos.....	26
2.3 Endotoxinas (lipopolissacarídeos).....	28
2.4 Lesões Periapicais x Quantidade de Endotoxinas.....	32
2.5 Substâncias químicas auxiliares.....	33
2.5.1 Hipoclorito de sódio.....	33
2.5.2 Digluconato de Clorexidina.....	36
2.5.3 Própolis.....	38
3 PROPOSIÇÃO.....	41
4 MATERIAL E MÉTODO.....	42
4.1 Seleção de pacientes.....	42
4.2 Seleção de dentes.....	43
4.3 Divisão dos grupos experimentais.....	43
4.4 Anti-sepsia e Abertura coronária.....	44
4.5 Primeira coleta do conteúdo do canal radicular.....	46
4.5.1 Diluição da amostra para quantificação de endotoxinas.....	47
4.5.2 Diluição da amostra para semeadura de microrganismos e análise de PCR.....	48
4.6 Preparo Biomecânico.....	49
4.7 Segunda coleta do conteúdo do canal radicular.....	51

4.8 Medicação intracanal por 14 dias.....	52
4.9 Terceira coleta do conteúdo do canal radicular.....	52
4.10 Obturação dos canais radiculares.....	53
4.11 Análise microbiológica.....	53
4.11.1 Semeadura de microrganismos.....	53
4.11.2 Detecção de microrganismos através da técnica de PCR espécie-específico para o gene 16S rRNA.....	56
4.11.2.1 Isolamento do DNA bacteriano.....	56
4.11.2.2 Reação de PCR.....	57
4.11.2.3 Eletroforese.....	60
4.12 Quantificação de endotoxinas.....	63
4.12.1 Lisado de amebócitos de <i>Limulus</i> (LAL) – Teste cinético cromogênico (QCL).....	63
4.13 Correlação entre lesão periapical e quantidade de endotoxina.....	65
4.14 Análise Estatística.....	66
5 RESULTADOS.....	67
5.1 Análise de crescimento microbiológico.....	67
5.2 Quantificação de endotoxinas.....	71
5.3 Tamanho das lesões.....	76
5.4 PCR.....	79
6 DISCUSSÃO.....	85
6.1 Tema da pesquisa.....	85
6.2 Método utilizado.....	86
6.3 Resultados.....	90
7 CONCLUSÕES.....	94
8 REFERÊNCIAS.....	95
APÊNDICES.....	109
ANEXOS.....	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas do tratamento endodôntico: A - Isolamento do campo operatório; B - Profilaxia com escova de Robson e pasta profilática; C - Anti-sepsia com swab.....	45
Figura 2 - Figura 2 - Etapas do tratamento endodôntico: A - Remoção de tecido cariado sob irrigação com solução salina estéril e apirogênica; B - Finalização da cirurgia de acesso; C - 1ª coleta do conteúdo do canal radicular.....	46
Figura 3 - Coletas do conteúdo do canal radicular.....	47
Figura 4 - Diluição das amostras para quantificação de endotoxina.	48
Figura 5 - Diluição das amostras para semeadura de microrganismos.....	49
Figura 6 - Preparo biomecânico do canal radicular. A - Preparo coroa-ápice com Endo-Eze; B - Verificação da luz do canal radicular com lima manual Kerr nº15; C - Irrigação/aspiração do canal radicular.....	50
Figura 7 – Semeadura da matriz em 4 tipos de meios seletivos.....	54
Figura 8 – Semeadura da matriz, diluição -2 e -4, nos meios de crescimento: FAA e BHI.....	55
Figura 9 – Jarra de anaerobiose.....	55
Figura 10 – A: Eppendorfs na centrífuga; B: centrífuga utilizada; C: eppendorf com DNA no fundo do tubo e sobrenadante a ser removido; D: eppendorfs com filtro utilizados para o isolamento do DNA.....	57
Figura 11 – A: preenchimento do gel agarose com as amostras após processo de PCR; B: cuba de eletroforese; C: transiluminador de luz ultravioleta; D: documentação fotográfica.....	61
Figura 12 – Esquema de montagem da placa de 96 poços utilizada	

no teste cinético cromogênico LAL.....	64
Figura 13 – Substâncias utilizadas como padrão e equipamento utilizado no teste cinético cromogênico - A: reagente LAL; B: endotoxina padrão de <i>E.coli</i> ; C: água apirogênica; D: leitor cinético QCL; E: adição do reagente LAL.....	65
Figura 14 – Radiografias periapicais iniciais utilizadas para medição do tamanho apresentado pela lesão periapical.....	66
Figura 15 – Placas de petri com crescimento microbiano apresentado na 1ª coleta; A – Enterococcus; B – Mitis Salivarius; C – FAA; D – BHI.....	67
Figura 16 - Gráfico de pontos (<i>dot-plot</i>) e correspondente diagrama de caixa (<i>box-plot</i>) dos valores de redução, segundo os três tipos de solução irrigadora, da 2ª coleta em relação a 1ª coleta.....	75
Figura 17 - Gráfico de pontos (<i>dot-plot</i>) e correspondente diagrama de caixa (<i>box-plot</i>) dos valores de redução, segundo os três tipos de solução irrigadora, da 3ª coleta em relação a 1ª coleta.....	76
Figura 18 – Gráfico de colunas com as médias referentes a quantidade de endotoxina apresentadas de acordo com o tamanho da lesão verificada no Rx.....	78
Figura 19 – Quantidade de endotoxina presente de acordo com a classe referente ao tamanho da lesão.....	79
Figura 20 – Porcentagem de microrganismos detectados nas amostras analisadas por PCR, de acordo com as coletas.....	84

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Divisão dos grupos experimentais.....	51
Quadro 2 – Espécies microbianas, as sequências de primers utilizados para reação de PCR e fragmentos dos nucleotídeos.....	58
Quadro 2 - Proporção dos reagentes utilizados para confecção do <i>Master Mix</i>	59
Quadro 4 – Espécies microbianas e ciclos de temperatura das reações de PCR.....	62
Tabela 1 - Médias da quantidade de microrganismos (UFC/ml).....	68
Tabela 2 - Percentual de redução (%) de microrganismos (UFC/ml) da 2ª coleta em relação à 1ª coleta, e da 3ª coleta em relação à 1ª coleta.....	70
Tabela 3 – Média, desvio padrão, mediana e grupos homogêneos dos dados analisados estatisticamente.....	71
Tabela 4 – Médias da quantidade de endotoxina em cada coleta de cada grupo avaliado.....	72
Tabela 5 – Percentual de redução (%) da quantidade de endotoxinas.....	74
Tabela 6 – Análise descritiva dos percentuais de redução da 2ª coleta em relação à 1ª coleta (média, desvio padrão), e teste de Dunn (grupos homogêneos).....	75
Tabela 7 - Análise descritiva dos percentuais de redução da 3ª coleta em relação à 1ª coleta (média, desvio padrão), e teste de Dunn (grupos homogêneos).....	75
Tabela 8 – Tamanho das lesões, quantidade de endotoxinas presentes e sintomatologia inicial do paciente.....	77
Tabela 9 - Microrganismos detectados pelo PCR no grupo NaOCl	80

Tabela 10 - Microrganismos detectados pelo PCR no grupo CLX.	81
Tabela 11 - Microrganismos detectados pelo PCR no grupo PRO.	82
Tabela 12 – Microrganismos detectados através de PCR nas 3 coletas realizadas, e suas porcentagens.....	84
Tabela 13 - Valores de microrganismos obtidos em cada coleta (UFC/ml), nos meios FAA e BHI.....	120
Tabela 14 - Valores de microrganismos obtidos em cada coleta (UFC/ml), nos meios Mitis Salivarius, Saboraud Dextrose, Enterococcosel e MacConkey.....	121
Tabela 15 - Quantidade de endotoxina detectada em cada coleta e controle correspondente.....	122

Xavier ACC. Detecção de microrganismos, quantificação de endotoxinas e avaliação *in vivo* do extrato glicólico de própolis em dentes com necrose pulpar e lesão periapical [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

Este estudo avaliou *in vivo* a ação do extrato glicólico de própolis 12%, como substância química auxiliar em tratamentos endodônticos de dentes com necrose pulpar e lesão periapical. A avaliação foi realizada através da cultura e detecção de microrganismos por Reação em Cadeia Polimerase (PCR) e da quantificação de endotoxinas. Além disso, foi avaliada a correlação entre o tamanho da lesão periapical e a quantidade de endotoxinas presente. Foram selecionados 30 dentes, os quais foram divididos em 3 grupos (n=10), de acordo com a substância química auxiliar utilizada para a instrumentação: NaOCl) Hipoclorito de sódio 1%; CLX) Clorexidina gel 2%, intercalada com solução salina; PRO) Extrato glicólico de própolis 12%, intercalado com solução salina. As radiografias iniciais foram digitalizadas e as lesões periapicais foram medidas através de software específico. Foram realizadas 3 coletas do conteúdo do canal radicular: após a abertura coronária, após instrumentação e após 14 dias da medicação intracanal. A medicação intracanal utilizada foi o hidróxido de cálcio com propilenoglicol. Em todas as coletas realizou-se: detecção de microrganismos por PCR; avaliação do crescimento microbiológico em diferentes meios de cultura e quantificação de endotoxinas através do teste cinético cromogênico (LAL). Os resultados foram analisados através dos testes de Kruskal Wallis, Dunn (nível de significância 5%) e correlação linear de Pearson. A quantidade de microrganismos e endotoxinas, nas 2ª e 3ª coletas, diminuiu em relação à 1ª coleta, em todas as soluções avaliadas ($p < 0,05$). Os canais apresentaram diversidade microbiana, com predominância de *Parvimonas micra*, *Tanerella forsythia* e *Prevotella nigrescens*. Concluiu-se que o extrato glicólico de própolis 12% apresentou atividade antimicrobiana e anti-endotóxica semelhante aos demais irrigantes e que *Parvimonas micra* foi o microrganismo mais presente. Há indícios de que quanto maior a lesão periapical maior a quantidade de endotoxina presente.

Palavras-chave: Substâncias químicas auxiliares. Própolis. Endotoxinas. Reação em Cadeia Polimerase. Microrganismos.

Xavier ACC. *In vivo* evaluation of propolis glycolic extract in teeth with pulp necrosis and periapical lesion [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

ABSTRACT

The aim of this study was *in vivo* evaluated of 12% propolis glycolic extract action in root canal treatments, through the culture of microorganisms, quantification of endotoxins and detection of microorganisms by molecular method of polymerase chainreaction (PCR). A total of 30 human teeth were divided into 3 groups (n=10) according to the auxiliary chemical solution used for biomechanical preparation: NaOCl) sodium hypochlorite 1%; CLX) 2% chlorhexidine gel; PRO) 12% propolis glycolic extract. Collections were performed immediately after coronary open, after instrumentation and after 14 days with intracanal medication. For all collections were performed the following tests: microorganisms detection by PCR; assessment of microbiological growth and analyzing the amount of endotoxi (*Limulus amoebocyte lysate*). The results showed a decrease in the amount of microorganisms and endotoxins in the 2nd and 3rd collections of all irrigation solutions. The canals showed microbial diversityy, but *Parvimonas micra* was predominantly. It was concluded thar all solutions are evaluated antimicrobial and anti-endotoxic similar. The most common microorganism present in root canals with pulp necrosis and periapical lesion was *Parvimonas microns*. There is a evidence that the higher amount of endotoxins is in the biggest lesions.

Keywords: Root canals Irrigants. Polymerase Chain Reaction, Endotoxins, Propolis

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos e seus subprodutos são considerados os agentes etiológicos do desenvolvimento de lesões pulpares e periapicais (Nair et al., 1990; Lin et al., 1992). Uma vez que a persistência destes microrganismos e subprodutos no canal radicular, após o tratamento endodôntico, pode induzir uma reação inflamatória e o desenvolvimento de periodontite apical crônica (Kakehashi et al., 1965), estes agentes são considerados os grandes responsáveis pelo insucesso do tratamento (Gomes et al, 1996, 2004).

Atualmente sabe-se que as infecções endodônticas são polimicrobianas, sendo que mais de 200 espécies bacterianas (Gomes et al., 1996 e 2004; Lopes, Siqueira, 1999; Jung et al., 2000) e alguns microrganismos, como leveduras, (Kubo et al., 1997; Nair, 1990) já foram isolados de canais radiculares infectados.

Em canais radiculares com necrose pulpar foi observada uma microbiota complexa, através de estudos moleculares (Siqueira Jr, Rôças, 2004; Subramanian, Mickel, 2009). Nestes estudos, tanto espécies facilmente identificadas pela cultura de microrganismos, como *Enterococcus faecalis* e *Peptostreptococcus micros*, quanto espécies de difícil detecção, como *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium alocis* e *Tannerella forsythia*; puderam ser facilmente detectadas através de métodos moleculares. Uma vez presentes nos canais radiculares, esses microrganismos podem estar envolvidos na patogenicidade dos insucessos endodônticos, especialmente se desenvolverem uma relação de sinergismo (Gomes et al., 2008).

Algumas pesquisas realizadas demonstraram que em canais radiculares portadores de necrose pulpar e lesão periapical crônica há predominância de microrganismos anaeróbios, particularmente os Gram-negativos (Vafaeie et al., 1999; Leonardo, 2000).

Na parede celular destas bactérias Gram-negativas encontra-se a endotoxina, a qual é composta de polissacarídeos e lipídeos, podendo ser chamada de lipopolissacarídeo (LPS). Liberadas durante multiplicação ou morte celular, as endotoxinas têm potente ação citotóxica, causando diversos efeitos biológicos que podem levar a uma reação inflamatória ou imunológica e a uma reabsorção óssea periapical (Wang, Stashenko, 1993; Yamasaki et al., 1992).

Estudo realizado em 2006, indicou que o LPS adere-se nos tecidos mineralizados da região apical e periapical (Schein, Schilder), agindo como um potente estimulador da reabsorção óssea. Em 2002, Nelson Filho et al., avaliaram radiograficamente a região apical e periapical de dentes de cães, com aplicação de endotoxina bacteriana intracanal (LPS de *Escherichia coli*) associada, ou não, ao hidróxido de cálcio. Como resultado verificou-se que lesões periapicais foram observadas no grupo das endotoxinas, e que a lâmina dura continuou intacta no grupo do hidróxido de cálcio com endotoxina. Com isso concluiu-se que a endotoxina pode causar lesões periapicais visíveis radiograficamente. Outros estudos também sugeriram que a endotoxina é um dos principais fatores etiológicos envolvidos nas patologias pulpares e periapicais (Barthel et al., 1997; Jacinto et al., 2005).

Estudos realizados in vivo, avaliaram a correlação entre o tamanho da lesão periapical visível radiograficamente, tanto em dentes com necrose pulpar quanto em dentes com necessidade de retratamento endodôntico, e a quantidade de endotoxina presente nos canais radiculares (Endo, 2011; Mattison et al., 1987; Martinho, 2007).

Assim, nos dias atuais, o tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar e reação periapical crônica deve ter como

objetivo, além da eliminação dos microrganismos, a inativação de endotoxinas e demais produtos tóxicos (Maekawa, 2007). O preparo biomecânico do canal radicular é uma das principais etapas do tratamento endodôntico e está diretamente relacionado com esta desinfecção dos canais, uma vez que seu objetivo consiste na limpeza e na modelagem do canal, através do uso de instrumentos endodônticos, de substâncias químicas auxiliares e do processo de irrigação-aspiração.

O hipoclorito de sódio é, atualmente, uma das substâncias químicas auxiliares mais utilizadas durante a instrumentação e a irrigação dos canais radiculares. Dentre as suas principais propriedades encontram-se: capacidade de dissolver matéria orgânica, ação lubrificante e capacidade de neutralização do conteúdo tóxico do canal radicular (Leonardo, 2005; Okino et al., 2004; Tanomaru et al., 2005; Valera et al., 2001). Apesar destas ótimas propriedades, o hipoclorito de sódio 2,5% não apresenta elevada efetividade sobre as endotoxinas (Maekawa, 2007), e sua utilização em altas concentrações pode causar irritação nos tecidos periapicais (Önçag et al, 2003).

Devido as suas características antimicrobianas, seu efeito residual e sua biocompatibilidade, a clorexidina 2% é outra importante substância química auxiliar (Ferreira et al., 2002; Menezes, 2004; Leonardo, 2005; Tanomaru et al. 2005; D'Arcangelo et al., 2007; Ferraz et al., 2007). Embora comumente utilizada na prática endodôntica, a clorexidina 2% também não demonstra alta efetividade sobre as endotoxinas, durante o preparo biomecânico do canal radicular (Tanomaru et al., 2003; Oliveira et al., 2005). Assim, pesquisadores têm avaliado outras soluções auxiliares, visando uma associação de atividade antimicrobiana, capacidade de neutralização de endotoxinas e biocompatibilidade.

Em diferentes países, produtos naturais têm sido utilizados como alternativa na área da saúde. Muitos extratos e óleos naturais demonstraram certa atividade biológica tanto *in vitro* quanto *in*

vivo, o que justificou, por parte da medicina tradicional, investigações centradas em suas atividades antimicrobianas (Martinez et al, 1996).

Dentre os extratos naturais utilizados na Odontologia, destaca-se a própolis, a qual consiste em uma substância utilizada pelas abelhas na preservação da temperatura de sua colméia e no impedimento tanto da entrada de agentes estranhos quanto da propagação de agentes epidemiológicos (Burdock, 1998).

O extrato de própolis apresenta atividades antiinflamatórias, analgésicas, antimicrobianas e cicatrizantes (Grange, Davey, 1990; Barbosa et al., 2009). Segundo Koo et al. (2000) o crescimento de diversas bactérias como *S. mutans* e *S. sanguis*, é significativamente reduzido pelo extrato de própolis 10%. Esta substância também seria capaz de afetar o crescimento de bactérias anaeróbias. Em estudo realizado por Ferreira (2003) verificou-se que a utilização de extrato de própolis 10%, clorexidina gel 2% ou hidróxido de cálcio como curativo de demora em dentes de cães com lesão periapical induzida promove redução bacteriana de forma semelhante.

Com base no fato de que mesmo após a utilização de substâncias químicas auxiliares, com atividade antimicrobiana, durante o preparo biomecânico alguns microrganismos e endotoxinas podem permanecer no sistema de canais radiculares e túbulos dentinários, é interessante a utilização de medicações intracanaís.

Atualmente, o hidróxido de cálcio tem sido muito utilizado como medicação intracanal, em associação com diferentes substâncias, devido a suas diversas qualidades: capacidade de indução de mineralização (Leonardo, 2005), propriedades antimicrobianas (Leonardo 2000) e efetiva ação sobre LPS (Nelson Filho et al, 2002). Com isso, pode-se considerar esta medicação como uma opção adequada a um estudo *in vivo*.

Sabendo-se que o sucesso do tratamento endodôntico está diretamente ligado à eliminação dos agentes agressores presentes

em canais radiculares, tanto em infecções primárias quanto secundárias, podemos justificar uma busca constante por substâncias capazes de eliminar estes microrganismos.

Como observado em diversos estudos, bactérias Gram-negativas são significantes no aparecimento e na manutenção das lesões periapicais. Estas bactérias geralmente não são identificadas pelos métodos convencionais de cultura microbiológica, fazendo-se necessária a utilização de métodos moleculares.

O método molecular de avaliação pela reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma alternativa que possibilita a detecção e identificação dos microrganismos responsáveis pelo aparecimento e pela persistência das lesões periapicais endodônticas.

Uma vez que estas bactérias Gram-negativas são responsáveis pela liberação de endotoxinas, substância com grande atividade citotóxica, considera-se de grande importância a realização de estudos *in vivo* sobre substâncias químicas que possam ser utilizadas na neutralização destas endotoxinas e na eliminação dos microrganismos.

Considerando-se que recentes estudos *in vitro* obtiveram resultados promissores quando da utilização da própolis como irrigante do canal radicular (Valera et al., 2010; Molina, 2008), a avaliação *in vivo* poderá confirmar a indicação desta substância para a prática clínica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microrganismos em canais radiculares

Até o final do século XIX, quando Miller (1894) realizou um estudo sobre a associação entre bactérias e patologias pulpares, o papel dos microrganismos no desenvolvimento e na perpetuação das alterações pulpares era desconhecido. Esta associação foi demonstrada através da análise por bacterioscopia do esfregaço das amostras coletadas de canais radiculares, onde foi observada a presença de uma grande variedade de células bacterianas. Também foi observada uma grande dificuldade no cultivo de algumas dessas bactérias, as quais puderam ser visualizadas apenas por microscopia. O autor sugeriu que a microbiota de dentes com canal radicular exposto ao meio bucal é variada, e que os microrganismos presentes dependem da região (se na câmara pulpar ou no canal radicular).

Através de um estudo realizado em 1965 por Kakehashi et al. foi confirmado o importante papel das bactérias na etiopatogenia de doenças pulpares. Neste estudo, foi realizada a exposição pulpar de dentes de rato (convencionais e germ-free) ao meio bucal e, através de análises histológicas observou-se a resposta tecidual. Os resultados demonstraram inflamação severa ou necrose pulpar nas polpas dos dentes de ratos convencionais, enquanto que em ratos germ-free o mesmo não ocorreu. O autor concluiu que os microrganismos estão diretamente ligados a etiologia das alterações pulpares e periapicais.

Com a evolução dos métodos de cultivo de microrganismos, a microbiota dos canais radiculares foi constantemente

pesquisada e novas espécies bacterianas foram detectadas. Em diversos estudos foi observada a presença de uma grande quantidade de microrganismos nos canais radiculares, englobando tanto bactérias anaeróbias quanto fungos.

Em estudo realizado por Bergenholtz (1974) foi investigada a presença de bactérias em dentes traumáticamente necrosados, com câmara pulpar intacta. Em 64% das amostras coletadas dos 84 dentes avaliados, foi observada cultura positiva. A microbiota observada neste estudo era do tipo mista, com uma média de 4,3 espécies por canal radicular. Foi verificado que 78% destas espécies eram microrganismos anaeróbios estritos, pertencentes aos gêneros: *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* e *Corynebacterium*.

Em 1987, Yoshida et al analisaram microbiologicamente 36 canais radiculares de dentes com presença de lesão periapical, correlacionando o crescimento de bactérias e sintomas clínicos. Os autores observaram que a identificação de diversas espécies bacterianas anaeróbias estritas está relacionada à presença de sintomatologia dolorosa. Em casos com sintomatologia aguda, encontrou-se, principalmente, a presença de *Peptococcus magnus* e de espécies do gênero *Bacteroides*; enquanto que nos casos assintomáticos houve principal presença de bactérias entéricas e estreptococos orais.

Estudo realizado por Sundqvist et al (1989) analisou a microbiota de canais radiculares de dentes com presença de lesão perirradicular. Dos 72 dentes avaliados, 22 dentes apresentaram pelo menos uma espécie de bacilos produtores de pigmentos negros, e 95,4% dos microrganismos isolados eram de espécies anaeróbias estritas.

Em 2001, Peciulienė et al. analisaram a presença de diversos microrganismos em dentes com periodontite apical crônica. Foram analisados 40 pacientes, os quais passaram por tratamento endodôntico com substâncias variadas. Foi verificada a presença de fungos e bacilos Gram-negativos facultativos, sempre associados a

Enterococcus faecalis. Os autores concluíram que houve maior prevalência de bactérias entéricas, sendo o *E. faecalis* isolado em 21 de 33 culturas positivas.

Estudo realizado por Vianna et al. em 2008 demonstrou a presença de *Enterococcus faecalis*, em 55% dos dentes analisados, onde havia presença de necrose pulpar e evidência radiográfica de periodontite apical, com ausência de doença periodontal conjunta.

Gomes, em 1995, reportou que apesar da identificação, até o momento, de mais de 300 espécies habitando a cavidade bucal, apenas algumas espécies, são capazes de colonizar o canal radicular.

Ao se considerar o fato de que 50% da microbiota endodôntica não é cultivável e, por consequência deste fato, encontra-se subestimada, principalmente quanto à presença de espécies anaeróbias estritas. Surge uma nova era para o diagnóstico em microbiologia, através da utilização de métodos moleculares de detecção microbiana.

2.2 Métodos Moleculares de detecção de microrganismos

Através do advento das técnicas moleculares, diversas pesquisas vêm usufruindo seus benefícios, uma vez que estas técnicas propiciam maior sensibilidade e confiabilidade nos resultados obtidos.

Baumgartner, Falker (1991) identificaram, através de testes bioquímicos, 50 espécies bacterianas presentes nos 5 milímetros apicais de 10 canais radiculares com exposição pulpar e lesão perirradicular. Destas 50 espécies, 68% eram anaeróbias estritas. Entre as espécies bacterianas detectadas verificou-se a presença de: *Bacteroides intermedius* (n=5), *Peptostreptococcus anaerobius* (n=5), *Veillonella parvula* (n=5), *Bacteroides buccae* (n=5), *Enterococcus faecalis* (n=4), *Fusobacterium nucleatum* (n=3) e *Streptococcus mutans* (n=3).

Em 1999, Bogen, Slots utilizaram primers específicos para a detecção de *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*, através do método de reação em cadeia polimerase (PCR). Foram utilizados 20 dentes fechados com lesões periapicais associadas a infecções endodônticas persistentes. *P. endodontalis*, *P. nigrescens* e *P. intermedia* não foram detectados em nenhuma das amostras estudadas. A baixa ocorrência de bacilos produtores de pigmentos negros (BPPN) nestas lesões pode explicar a estabilidade relativa da doença.

Jung *et al.* (2001) identificaram espiroquetas orais e suas associações com outras através do método de PCR (16S rRNA). Esta avaliação foi realizada em dentes com lesão periapical e os resultados indicaram a presença de: *Porphyromonas gingivalis* (27,4%), *Treponema maltophilum* (26%), *Bacteroides forsythus* (15%) e *Treponema socranskii* (2,7%). Associações microbianas significantes foram identificadas entre as espécies de *T. maltophilum*, *B. forsythus* e *P. gingivalis*. Os autores sugeriram que a espécie *T. maltophilum* deve ser incluída em estudos etiológicos de infecções endodônticas.

Siqueira Jr., Rôças (2003), utilizaram a metodologia de PCR (16rDNA) na tentativa de correlacionar novas espécies bacterianas, até então não identificadas nas infecções endodônticas primárias pelo método de cultura. Os autores demonstraram que as espécies *Flifactor alocis*, *Treponema maltophilum*, *Treponema lecithinolyticum*, *Treponema socranskii*, *Propionibacterium propionicus*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Bacteroides forsythus* estavam relacionadas às diferentes formas de infecções endodônticas primárias, considerando-os como potenciais patógenos endodônticos.

Gomes *et al.* (2005b) avaliaram através do método de cultura e nested PCR a presença de *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* em 100 amostras coletadas de canais radiculares de dentes

com lesão periapical. Enquanto que *P. gingivalis* foi raramente isolado por cultura (1%), este microrganismo pode ser detectado em 38% das amostras através do método de PCR. *P. endodontalis* não foi isolado por cultura, porém foi detectado através de PCR em 25% das amostras. *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia*, e *P. nigrescens* foram mais freqüentemente identificadas nos casos de infecção endodôntica primária. Tanto o método de cultura quanto o método molecular utilizado, detectaram grande presença de microrganismos produtores de pigmentos negros.

Em 2011, Roças, Siqueira realizaram um estudo clínico comparando a atividade de soluções irrigantes sobre microrganismos de canais radiculares com necrose pulpar e ausência de sintomatologia. Através de análise por PCR os autores detectaram presença bacteriana em todos os canais estudados. Algumas das espécies microbianas mais resistentes as soluções testadas foram: *Streptococcus spp* e *Porphyromonas endodontalis*.

2.3 Endotoxinas (lipopolissacarídeos)

Os resultados de diversos estudos na área de identificação de microrganismos (Gomes et al, 2004b, 2005; Martinho et al 2010), vêm possibilitando a correlação da presença de determinados microrganismos, em especial anaeróbios estritos Gram-negativos (Vafaie et al, 1999; Leonardo, 2000; Leonardo et al, 2004) com sinais e sintomas clínicos, fístulas e reabsorções ósseas.

Essas bactérias Gram-negativas contêm em sua parede celular um lipopolissacarídeo (LPS), também chamado de endotoxina. A endotoxina é substância composta de polissacarídeos e lipídeos, sendo liberada pela célula durante a sua duplicação ou morte. O LPS é uma

molécula de alto peso molecular constituída por 3 partes: antígeno O, formado por repetidas unidades oligossacarídeas e único para cada cepa bacteriana; corpo 25, região do núcleo; e lipídeo A, o qual é responsável pelo efeito tóxico do LPS (Caroff, 2002).

Diversos estudos indicam que as endotoxinas atuam indiretamente, estimulando macrófagos, neutrófilos e fibroblastos, desencadeando a liberação de mediadores químicos, os quais podem gerar uma série de efeitos biológicos, o que levaria a uma reação inflamatória, imunológica ou a uma reabsorção óssea periapical.

Em 1975, Schein, Schilder realizaram um estudo *in vivo* com intuito de quantificar os níveis de endotoxinas em dentes com necessidade de tratamento endodôntico. Os resultados obtidos demonstraram que os dentes com ausência de vitalidade pulpar, presença de sintomatologia e lesão periapical apresentam as maiores quantidades de endotoxinas.

Em estudo realizado em 1980, Dhalén, Bergenholtz. avaliaram a quantidade de endotoxina presente em 13 dentes com necrose pulpar. Seus resultados indicaram viabilidade bacteriana, diferentes tipos de exsudato inflamatório e presença de LPS em todas as amostras coletadas. Os autores concluíram que a atividade das endotoxinas está relacionada com a presença e o número de bactérias Gram-negativas presentes nos canais radiculares.

Em estudos realizados através da inoculação de endotoxina de *Salmonella Minnesota* (Pittis et al, 1983) e de *E.coli* (Mattison et al, 1987; Nelson Filho et al, 2002) em cães, foi verificado que a endotoxina tem papel importante na inflamação periapical e reabsorção óssea.

Em 1987, Mattison et al. realizaram um estudo avaliando o efeito do LPS sobre o tecido ósseo. Eles injetaram endotoxinas provenientes de *Escherichia coli* e *Eikenella corrodens* em dentes de cães. Radiografias e amostras sanguíneas foram coletadas durante 12

semanas quando, então, os cães foram sacrificados para a realização dos testes histológicos. Radiograficamente detectou-se lesões maiores e uma evolução mais rápida da doença periapical em dentes inoculados com endotoxina de *Eikenella corrodens*. Os testes histológicos demonstraram significativa destruição óssea periapical e presença de grande infiltrado de células inflamatórias. Os autores concluíram que endotoxinas de bactérias Gram-negativas têm papel importante na iniciação e na perpetuação da inflamação periapical e da destruição óssea.

Wang, Stashenko realizaram um estudo em 1993 com intuito de identificar o mediador que quando estimulado causa reabsorção óssea periapical. A pesquisa foi realizada em ratos e indicou que a reabsorção óssea gerada por infecção bacteriana é, primeiramente, mediada pela IL-1 α . Portanto o LPS agiria como um potente estimulador da reabsorção óssea através da síntese e liberação de citocinas.

Em 1995, Nissan et al observou que a endotoxina é capaz de penetrar 0,5mm nos túbulos dentinários em um curto período de tempo (15min a 4 horas e meia). E em 2005, Oliveira et al. verificaram que a endotoxina pode se difundir pelos túbulos dentinários em direção ao cimento, atingindo a região externa da raiz após 24 horas.

Estudos realizados por Jacinto et al. (2005), Martinho e Gomes (2008), verificaram que a endotoxina está presente em altas concentrações no interior de canais radiculares de dentes sintomáticos, havendo uma relação positiva entre a concentração de endotoxina no canal radicular e a presença de sinais e sintomas. Foi verificado que a quantidade de endotoxinas em dentes com necrose pulpar está diretamente relacionada à presença e a quantidade de bactérias Gram-negativas presentes no sistema de canais radiculares (Dhalén, Bergenholtz., 1980; Yamazaki et al., 1992).

Para a realização da quantificação de endotoxinas, tanto em trabalhos *in vitro* quanto *in vivo*, utiliza-se o Lisado de amebócito de *Limulus* (LAL). Este lisado é preparado a partir do amebócito circulante do

caranguejo ferradura (*Limulus polyphemus*) e, quando exposto a endotoxinas, tem sua opacidade e sua viscosidade aumenta, tornando-se um gel duro (Levin, Bang, 1968).

Bang (1956) foi que, inicialmente, observou o possível uso do LAL na detecção de endotoxinas. Ao observar uma infecção por bactérias Gram-negativas no caranguejo *Limulus polyphemus*, o autor verificou a presença de uma coagulação intravascular fatal.

Em 1968, Levin, Bang conseguiram demonstrar que esta coagulação é resultado de uma reação enzimática entre a endotoxina e uma proteína coagulável presente nos amebócitos circulantes deste tipo de caranguejo. Com o desenvolvimento de um anticoagulante adequado para o sangue do *Limulus*, os autores prepararam um lisado do amebócito, o qual se mostrou um indicador extremamente sensível à presença de endotoxina.

Para o cálculo da quantidade de endotoxina presente em uma amostra, compara-se o tempo de reação da amostra com o lisado, ao tempo da reação da curva-padrão, a qual contém quantidades de endotoxinas conhecidas. Através do software WinKQCL (Cambrex Bio Ciência Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), presente em um computador acoplado ao leitor cinético, calcula-se, automaticamente, os parâmetros da curva-padrão e os valores da quantidade de endotoxinas presente.

Maekawa, em 2007, utilizou o teste cinético cromogênico (LAL) para avaliar a ação de medicações intracanais com própolis e gengibre sobre endotoxinas. Os resultados obtidos indicaram que todas as medicações avaliadas foram capazes de diminuir a quantidade de endotoxinas, sem eliminá-las completamente, e que as medicações envolvendo associação com hidróxido de cálcio foram mais eficazes na neutralização das endotoxinas.

Estudo realizado por Vianna et al. em 2007 sugeriu que o principal responsável pela redução de microrganismos (99,96%), durante o tratamento endodôntico, é o preparo biomecânico. Os autores

verificaram que mesmo após a eliminação bacteriana, a quantidade de endotoxina após a instrumentação é elevada, diminuindo apenas 44,4%. Foi observado que após a utilização da medicação intracanal houve redução de apenas 1,4% destas endotoxinas.

Estudo de Cardoso et al (2011), avaliou a atividade do hipoclorito de sódio 2,5%, da solução de clorexidina 2%, e do hipoclorito de sódio acrescido de surfactante, sobre microrganismos e endotoxinas. A avaliação endotóxica foi realizada através do teste cinético cromogênico LAL, e indicou que todas as soluções avaliadas diminuíram a quantidade de endotoxinas. Apesar de não haver diferença estatística significativa, a solução que apresentou uma melhor efetividade sobre as endotoxinas foi o hipoclorito de sódio com surfactante. Nenhuma das soluções testadas neutralizou completamente as endotoxinas.

Assim, podemos admitir que há necessidade de realização de novos estudos, que avaliem novas substâncias auxiliares e medicações intracanaís, as quais possam neutralizar de forma adequada estas endotoxinas.

2.4 Lesões Periapicais x Quantidade de Endotoxinas

Diversos estudos indicaram que a endotoxina é capaz de iniciar e perpetuar uma reabsorção óssea periapical (Pittis et al, 1983; Mattison et al, 1987; Wang, Stashenko, 1993; Nelson Filho et al, 2002), assim sendo, é interessante a verificação da existência uma correlação positiva entre a quantidade de endotoxina presente no canal radicular e o tamanho da lesão periapical verificado radiograficamente.

Em estudo realizado por Mattison et al. (1987), onde endotoxinas provenientes de *Escherichia coli* e *Eikenella corrodens* foram injetadas em dentes de cães. Foram detectadas, radiograficamente,

lesões maiores e uma evolução mais rápida da doença periapical em dentes inoculados com estas endotoxinas. Com isso, os autores concluíram que as endotoxinas de bactérias Gram-negativas têm papel importante na destruição óssea.

A maior presença de endotoxina em canais com necrose pulpar e lesão periapical foi verificada em 1991, por Horiba et al. Estes autores realizaram um estudo onde foram feitas coletas de 30 dentes, e concluíram que existe uma maior quantidade de endotoxinas em dentes sintomáticos, e em dentes com necrose pulpar e lesão periapical, quando comparados a dentes sem estas características.

Estudo recente realizado por Endo (2011), avaliou a presença de microrganismos e endotoxinas em canais radiculares com necessidade de retratamento endodôntico e detectou uma correlação positiva entre elevados níveis de endotoxinas e lesão periapical maior que 5 mm o que, de acordo com o autor, indicaria a participação da endotoxina na reabsorção óssea periapical.

Diante deste resultado, torna-se interessante a avaliação da quantidade de endotoxinas presentes em dentes com necrose pulpar e lesão periapical primária, para a verificação de uma possível relação desta quantidade com o tamanho da lesão.

2.5 Substâncias químicas auxiliares

2.5.1 Hipoclorito de Sódio

Introduzido como solução irrigadora em Endodontia por Walker em 1936, o hipoclorito de sódio é hoje uma substância química

auxiliar amplamente utilizada, estando disponível comercialmente nas concentrações: 0,5%, 1%, 2,5% e 5,25%.

Sua grande utilização como solução irrigante durante o preparo biomecânico se deve a uma série de características como: ação lubrificante e desodorizante, capacidade de neutralização do conteúdo séptico-tóxico dos canais radiculares, capacidade de dissolução de matéria orgânica e ação antimicrobiana (Valera et al., 2001; Leonardo, 2005; Okino et al., 2004; Tanomaru et al., 2005).

A solução de hipoclorito de sódio tem sua ação quando o hipoclorito de sódio (NaOCl sal) reage com a molécula de água (H_2O), gerando o NaOH (hidróxido de sódio), que é uma base forte, e o HOCl (ácido hipocloroso), que é um ácido fraco. O hidróxido de sódio formado atua como um solvente orgânico de gordura, num fenômeno denominado saponificação. Enquanto isso, o ácido hipocloroso gera o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio, uma vez que libera cloro, o qual se liga ao grupamento NH dos aminoácidos, interferindo no metabolismo celular (Vianna, 2002).

Em 1971, Senia et al. verificaram a ação do hipoclorito de sódio (5,25%) como solvente tecidual de tecidos pulpare de 61 molares. Após irrigação com hipoclorito e sódio e solução salina (controle) durante diferentes tempos, foram realizados cortes da região apical, os quais foram corados e analisados em microscópio óptico. Concluiu-se que o Clorox (NaOCl) gera maior dissolução de tecido pulpar do que a solução salina. Não os autores questionam o efeito deste agente irrigante nos 3mm apicais de dentes com canais atrésicos.

Em 1999, Ayhan et al. avaliaram o efeito antimicrobiano de soluções irrigadoras (NaOCl 5,25% e 0,5%, clorexidina 2%, álcool 21% e paramonoclorofenol) contra diversos microrganismos, através de halos de inibição em ágar. Os resultados mostraram que o NaOCl foi o mais efetivo contra todos os microrganismos testados, e que sua efetividade diminui proporcionalmente à sua concentração. O álcool e a clorexidina

não apresentaram diferença estatisticamente significativa, e apresentaram os menores halos de inibição.

Em 2003, Beltz et al. verificaram, em dentes bovinos, a capacidade de dissolução de componentes orgânicos e inorgânicos de diversas soluções irrigantes: NaOCl (5,25%, 2,6%, 1,3%), EDTA 17% e MTAD. Os autores observaram que: a solubilização pulpar foi semelhante para NaOCl 5,35% e 2,6%; o EDTA e o MTAD tiveram efeitos de solubilização semelhantes, tanto na dentina (cerca de 70%) quanto no tecido pulpar (51%).

Naenni et al. (2004) avaliaram a capacidade de dissolução de tecido necrótico de diferentes soluções irrigantes: NaOCl 1%, clorexidina 10%, peróxido de hidrogênio 3% e 30%, ácido peracético 10% e ácido cítrico 10%. Os resultados demonstraram que apenas o NaOCl apresentou capacidade de dissolução de tecido necrótico. Os autores concluíram que este fator pode ser determinante na escolha do agente irrigante a ser utilizado.

Em 2008, Menezes et al. avaliaram a concentração fungicida mínima (CFM) do NaOCl 5,25% e da clorexidina 2% sobre cepas de *C. albicans*. Os autores concluíram que ambas as substâncias apresentam efetiva atividade fungicida sobre *C. albicans*, sendo que a CFM da clorexidina foi menor que a do hipoclorito para todas as cepas avaliadas.

Apesar de suas ótimas propriedades, o hipoclorito de sódio não possui efetividade sobre as endotoxinas (Maekawa, 2007), e sua utilização em altas concentrações pode causar irritação nos tecidos periapicais (Önçag et al., 2003).

Em estudo de 2003, Önçag et al. compararam as propriedades antimicrobianas e a toxicidade do NaOCl 5,25%, da clorexidina 2% e 0,2% e da clorexidina 0,2% associada ao cetrimide (Cetrexidin®). Canais radiculares foram instrumentados com auxílio dos irrigantes e permaneceram vazios por 48 horas. Os efeitos tóxicos foram

avaliados através da injeção das substâncias no subcutâneo de ratos. Os resultados indicaram que o Cetrexidin® foi mais efetivo sobre *E.faecalis* e bactérias anaeróbias. Ao fim de 2 semanas, a toxicidade do NaOCl 5,25% foi superior aos outros irrigantes.

Como opção ao hipoclorito de sódio, devido a sua toxicidade, surgiu a clorexidina.

2.5.2 Digluconato de Clorexidina

A clorexidina surgiu como uma opção ao hipoclorito, por ser considerada uma substância biocompatível (Tanomaru et al., 2002; Semenoff et al., 2008), com atividade antimicrobiana de amplo espectro de ação (Ferraz et al., 2001; Ferreira et al., 2002; Gomes et al., 2009; Valera et al., 2009) e efeito residual variando de 48 horas a 7 dias (Leonardo et al., 1999; Weber et al., 2003).

Em 2001, estudo realizado por Ferraz et al. avaliou-se a clorexidina gel como substância química auxiliar. Os resultados indicaram que a clorexidina gel apresentou capacidade lubrificante e atividade antimicrobiana contra a maioria dos microrganismos normalmente encontrados em canais radiculares infectados. Os autores citam que uma das vantagens da clorexidina gel sobre a líquida seria uma menor formação de *smear layer*.

Tanomaru et al. (2002) estudaram a resposta inflamatória gerada por soluções irrigadoras (hipoclorito de sódio a 0,5% e clorexidina 2%) quando injetadas na cavidade peritoneal de ratos. Concluiu-se que o hipoclorito de sódio foi capaz de induzir reações irritativas nos tecidos e respostas inflamatórias severas, enquanto que a clorexidina não induziu uma resposta inflamatória significativa, sendo biocompatível aos tecidos.

Vianna et al. (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana da clorexidina gel e líquida a 0,2%, 1% e 2% e do NaOCl 0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25%. De acordo com os resultados, tanto a CLX gel quanto a líquida a 2% foram eficazes contra *S. aureus* e *C. albicans*. Todos os irrigantes avaliados foram eficazes contra *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia*. O tempo necessário para a eliminação de microrganismos foi semelhante nos grupos: CLX líquida 1% e 2%, NaOCl 5,25%. Concluiu-se que a ação antimicrobiana está relacionada ao tipo, concentração e forma de apresentação dos irrigantes.

Em 2008 a biocompatibilidade da clorexidina foi avaliada em por Semenoff et al., através de um estudo com ratos. Os autores verificaram que a clorexidina foi capaz de diminuir a reação inflamatória, de forma semelhante ao hidróxido de cálcio.

Em 2009, Valera et al. avaliaram a ação da clorexidina e de medicações intracanaís sobre *E. coli* e sua endotoxina. Canais de 48 dentes foram contaminados com *E. coli*, instrumentados com solução de clorexidina 2% e divididos em grupos: pasta de Ca(OH)_2 , polimixina B, Ca(OH)_2 + clorexidina gel 2%, solução fisiológica (grupo controle). A clorexidina apresentou melhores resultados que a solução fisiológica. Observou-se diferença estatística do Ca(OH)_2 + clorexidina gel 2% em relação a pasta de Ca(OH)_2 e a polimixina B. Os autores concluíram que somente as medicações intracanaís são capazes de diminuir significativamente a quantidade de endotoxinas.

Observando-se as limitações de cada solução irrigadora atualmente utilizada, deu-se início a uma busca de outros agentes biocompatíveis aos tecidos periapicais e com propriedades adequadas à prática clínica. Dentre estes novos estudos podemos destacar os realizados com substâncias naturais.

2.5.3 Própolis

A própolis é uma substância utilizada pelas abelhas na preservação da temperatura de sua colméia, e no impedimento da entrada de agentes estranhos e da propagação de agentes epidemiológicos (Marcucci, 1995). A palavra própolis tem origem grega, sendo a combinação de Pro (defesa) e polis (cidade), que combinadas indicam algo que defende a cidade, ou seja, a colméia (Burdock, 1998).

A composição da própolis depende da flora da região onde é produzida. Sua coloração pode variar de amarelo-esverdeado a marrom-escuro. Apesar desta variação, em geral, a própolis é composta por 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias (Burdock, 1998). Sua composição química é complexa, sendo que mais de 200 constituintes já foram identificados. Alguns autores atribuem aos flavonóides, aos ácidos aromáticos e aos ésteres, a capacidade antimicrobiana apresentada por esta substância (Grange, Davey, 1990; Burdock, 1998; Bankova et al, 1995; Koo et al., 2000, Grange et al, 2005; Scazzocchio et al, 2005).

De acordo com pesquisas realizadas, o extrato de própolis apresenta atividade antiinflamatória, analgésica e antimicrobiana (Grange & Davey, 1990; Burdock, 1998; Koo et al., 2000; Lotufo et al., 2005)

Estudos indicam que o mecanismo de atividade antimicrobiana da própolis é complexo e provavelmente encontra-se baseado na inibição da RNA-polimerase bacteriana (Bosio, 2000; Uzel et al, 2005).

Martin, Pileggi (2004) avaliaram o extrato de própolis a 50% e 100% como meio de armazenamento de dentes avulsionados e concluíram que estes extratos são melhores que HBSS (solução salina

balanceada de Hanks), leite ou saliva, na manutenção da viabilidade das células do ligamento periodontal.

Estudo *in vivo*, realizado por Santos et al em 2007, avaliou a eficácia da pomada de própolis sobre feridas crônicas, e constatou a presença de ação terapêutica, baixo custo e estímulo a cicatrização.

Ferreira (2007) avaliou a ação antimicrobiana da própolis sobre bactérias anaeróbias comumente isoladas em canais radiculares com necessidade de tratamento endodôntico. Os resultados deste estudo indicaram eficiente atividade antimicrobiana sobre microrganismos como *Prevotella nigrescens* e *Fusobacterium nucleatum*.

Em 2008, estudo *in vitro* e *ex vivo*, realizado por Simões et al, avaliou a ação de diferentes concentrações de extratos de própolis como anti-sépticos bucais, constatando que sua ação farmacológica é a mesma dos anti-sépticos industrializados.

Estudos *in vitro* realizados recentemente (Molina, 2008; Maekawa, 2010; Valera et al., 2010) demonstraram grande efetividade, por parte do extrato glicólico de própolis, sobre microrganismos presentes em canais radiculares necrosados. De acordo com Swerts et al (2005), a própolis teria a vantagem de ser um produto natural, o que reduziria a possibilidade de reações adversas aos tecidos bucais.

Com relação à citotoxicidade da própolis, Lotufo (2003) verificou que a solução de própolis em propilenoglicol é biocompatível, não afetando ou impedindo o crescimento e a viabilidade celular dos fibroblastos da mucosa bucal humana.

Em 2004, Al-Shaher et al compararam a citotoxicidade da própolis e do hidróxido de cálcio em fibroblastos do ligamento periodontal e da polpa. Os autores verificaram que, em concentrações similares, o hidróxido de cálcio foi extremamente tóxico, sendo 10 vezes mais citotóxico que a própolis. Assim, os autores sugeriram que a própolis pode

ser uma alternativa viável como medicação intracanal, por causa da sua baixa citotoxicidade.

Outro estudo comparando a biocompatibilidade da própolis com *Casearia sylvestris*, Otosporin e solução salina, em tecido subcutâneo de ratos machos da linhagem Wistar, foi realizado por Silva et al (2004), que verificaram que a própolis foi a medicação que apresentou menor potencial irritativo e maior efetividade na redução do exsudato inflamatório agudo. Os autores sugerem ainda a aplicação destes produtos naturais como uma alternativa para o tratamento endodôntico. Assim sendo, torna-se importante a avaliação deste extrato natural *in vivo*.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como proposta:

- a) Avaliação da atividade antimicrobiana e anti-endotóxica da solução de hipoclorito de sódio 1,0%, da clorexidina gel 2,0% e do extrato glicólico de própolis 12%, através da quantificação de endotoxinas e da análise do crescimento microbiológico;
- b) Detecção de microrganismos e determinação da microbiota presente;
- c) Avaliação da correlação entre a quantidade de endotoxina presente no canal radicular e o tamanho da lesão periapical visível radiograficamente.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual Paulista – Campus de São José dos Campos – Faculdade de Odontologia, sob o número 075/2009-PH/CEP (ANEXO A).

4.1 Seleção de pacientes

A seleção dos pacientes foi realizada através de anamnese, exame clínico e exame radiográfico de pacientes encaminhados para a clínica de Endodontia, do departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP. Foram selecionados pacientes com dentes que apresentavam necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente. Estes pacientes apresentavam boa saúde geral e ausência de antibioticoterapia nos últimos 3 meses.

Os pacientes selecionados assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A) antes do início do tratamento endodôntico.

4.2 Seleção de dentes

Neste estudo foram utilizados 30 dentes humanos (anteriores ou pré-molares), dos pacientes anteriormente selecionados. Para a seleção dos elementos dentários observou-se:

- a) integridade do elemento ou presença de selamento com material restaurador;
- b) ausência de bolsas periodontais com profundidade maior que 4mm, devido à possibilidade da lesão endo-periodontal;
- c) ausência de tratamento endodôntico prévio;
- d) possibilidade de realização de adequado isolamento absoluto.

Foram descartados do estudo dentes com presença de edema e dor espontânea, além de dentes onde o acesso a toda a extensão do canal não era possível.

4.3 Divisão dos grupos experimentais

Os dentes foram divididos em 3 grupos experimentais (n=10), de acordo com a substância química auxiliar a ser utilizada durante o preparo biomecânico:

- a) NaOCl: Irrigação com solução de Hipoclorito de Sódio 1% (Byofórmula – São José dos Campos – São Paulo – Brasil);
- b) CLX: Clorexidina gel 2% (Byofórmula – São José dos Campos – São Paulo – Brasil), intercalada com solução salina fisiológica esterilizada e apirogênica;
- c) PRO: Extrato glicólico de própolis 12% (Apisflora – Ribeirão Preto – Brasil), intercalado com solução salina fisiológica esterilizada e apirogênica.

4.4 Anti-sepsia e Abertura coronária

Na primeira sessão de atendimento clínico foi preenchido um questionário abordando o histórico médico e dental do paciente (APÊNDICE B). Além disso, foi realizado o exame clínico inicial onde foram avaliados os sinais e sintomas presentes, tais como: presença de fístula/exsudato, alteração de cor, dor à percussão vertical e à palpação, presença de cárie, extrusão ou mobilidade.

Realizou-se uma radiografia inicial com posicionador do dente a ser tratado endodônticamente. Os pacientes foram, então, anestesiados e o elemento dentário a ser tratado foi isolado individualmente, com auxílio de grampo de isolamento absoluto e lençol de borracha (Figura 1A). Foi realizada profilaxia com escova de Robinson e pasta profilática (Figura 1B) e anti-sepsia do campo operatório através da aplicação, com swab, de água oxigenada 30 volumes, hipoclorito de

sódio 5,25% e tiosulfato de sódio 5%, para a inativação do hipoclorito de sódio (Figura 1C). Todos os passos subsequentes foram realizados de forma asséptica. Para isso, as limas e todos os demais instrumentais e materiais utilizados na pesquisa foram submetidos à radiação gama Cobalto 60 (20 Kgy por 6 horas) para esterilização e eliminação de endotoxinas pré-existentes (Oliveira et al, 2005 e 2007; Maekawa, 2007; Cardoso et al, 2011).



Figura 1 - Etapas do tratamento endodôntico: A - Isolamento do campo operatório; B - Profilaxia com escova de Robson e pasta profilática; C - Anti-sepsia com swab.

O início da abertura coronária foi realizado com auxílio de brocas esféricas diamantadas estéreis acionadas em alta rotação, sob refrigeração com solução salina fisiológica esterelizada e aprotogênica, removendo-se cáries e/ou restaurações existentes (Figura 2A). Antes da exposição da câmara pulpar, o campo operatório foi novamente desinfetado com água oxigenada 30 volumes, hipoclorito de sódio 5,25% e tiosulfato de sódio 5%. Com auxílio de brocas esféricas diamantadas realizou-se a exposição da câmara pulpar, a completa remoção do teto e a localização dos canais radiculares (Figura 2B). Ao fim da abertura coronária realizou-se a 1ª coleta do conteúdo do canal radicular (Figura 2C).

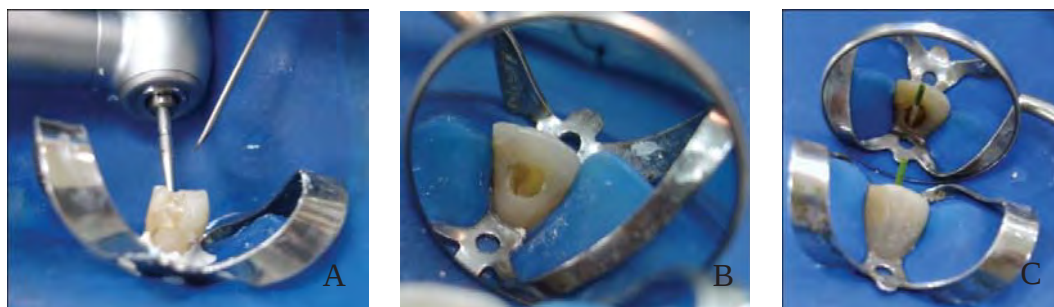


Figura 2 - Etapas do tratamento endodôntico: A - Remoção de tecido cariado sob irrigação com solução salina estéril e apirogênica; B - Finalização da abertura coronária; C - 1ª coleta do conteúdo do canal radicular.

4.5 Primeira coleta do conteúdo do canal radicular

As amostras foram coletadas através da utilização de cones de papel absorventes estéreis e apirogênicos, introduzidos no canal radicular até o comprimento pré-odontométrico, permanecendo neste por 1 minuto. O comprimento pré-odontométrico foi determinado com base na radiografia inicial (CPO = comprimento aparente do dente na radiografia inicial subtraído de 3 mm).

Foram utilizados 4 cones de papel absorventes, de numeração compatível com o canal radicular, para cada coleta, sendo que o primeiro cone foi utilizado para a quantificação de endotoxinas, e os demais foram utilizados para a semeadura das amostras e a identificação dos microrganismos por PCR (Figura 3).

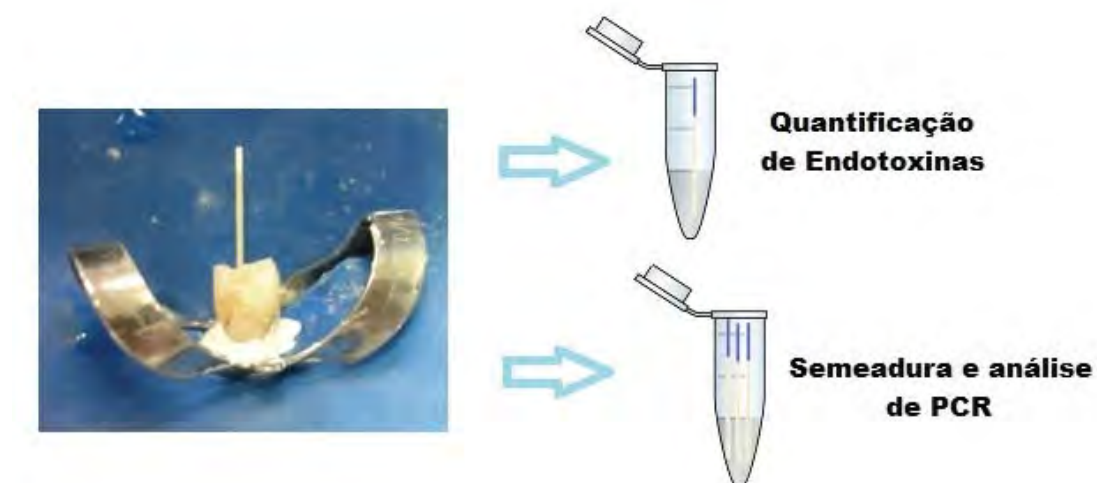


Figura 3 - Coletas do conteúdo do canal radicular.

4.5.1 Diluição da amostra para quantificação de endotoxinas

A amostra coletada do canal radicular com auxílio de um cone de papel absorvente estéril e apirogênico foi armazenada em tubos estéreis e apirogênicos de 1,5ml (eppendorfs – Axygen - USA), contendo 1ml de solução fisiológica estéril e apirogênica (matriz). A partir do qual foram realizadas diluições seriadas (-1 e -2), para posterior quantificação de endotoxinas.

Para a realização das diluições (Figura 4), a matriz foi agitada em Vórtex (Modelo AP-56 - Phoenix – Araraquara – SP – Brasil) por 1 min. Através da utilização de micropipetas, foram transferidos 100µl da matriz para um novo eppendorf, contendo 900 µl de água apirogênica (diluição -1). O eppendorf (diluição -1) foi então agitado por 60 segundos e transferiu-se 100µl deste para outro eppendorf contendo 1000 µl de água apirogênica (diluição -2).

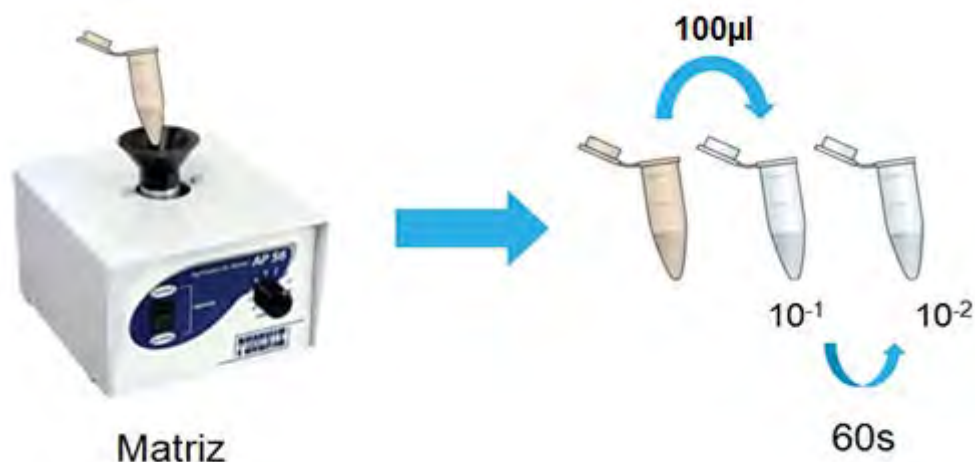


Figura 4 - Diluição das amostras para quantificação de endotoxina.

4.5.2 Diluição da amostra para semeadura de microrganismos e análise em PCR.

A amostra coletada através de 3 cones de papel estéreis foi armazenada em eppendorf (matriz) contendo 1 ml de meio de transporte pré-reduzido VMGA III - *Viability Medium Goteberg Agar* (Dahlén et al., 1993; APÊNDICE C). A partir da qual foram realizadas diluições seriadas (-1, -2, -3 e -4), para posterior semeadura de microrganismos.

Para a realização das diluições (Figura 5), a matriz foi agitada em Vórtex até a sua solubilização. Através da utilização de micropipetas, foram transferidos 100 µl da matriz para um novo eppendorf, contendo 1000 µl de caldo BHI (diluição -1). O novo eppendorf (diluição -1) foi então agitado por 60 segundos e transferiu-se 100 µl deste para outro eppendorf contendo 900 µl de água apirogênica (diluição -2). Este procedimento foi repetido até a diluição -4.

Após a diluição e a semeadura das amostras em meios seletivos, as matrizes foram congeladas a -70°C até a sua utilização.

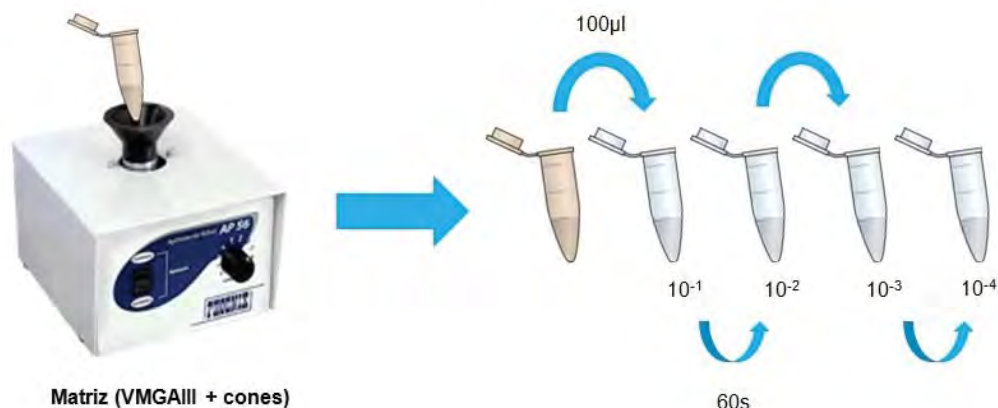


Figura 5 - Diluição das amostras para semeadura de microrganismos.

4.6 Preparo biomecânico

O terço cervical e médio dos canais radiculares foram preparados através da técnica coroa-ápice, com uso de instrumentos oscilatórios (Endo-Eze – Ultradent Endodontics – USA). As limas do sistema Endo-Eze foram adaptadas ao contra-ângulo Endo-Eze, em um micro-motor (Kavo do Brasil Ltda, Joinville, SC, Brasil). O preparo foi realizado com movimentos de rotação alternada de 30 graus para cada lado. Utilizou-se uma lima Kerr nº15 (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland) entre cada lima do sistema oscilatório, e irrigação de acordo com os grupos de solução irrigadora (Figura 6C).

Para a realização do preparo (Figura 6), utilizou-se uma lima tipo Kerr nº 10 (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland) na exploração inicial para localização da luz do canal e, em seguida, foi utilizado o instrumento 13/060 do sistema Endo-Eze (Figura 6A), com objetivo de remover interferências cervicais e neutralizar o conteúdo séptico-tóxico do canal radicular, usando os mesmos princípios do “*crown down pressureless technique*”, sempre tendo como medida

limitadora o CPO. Em seguida, utilizou-se um instrumento manual (lima Kerr nº15) para verificação da manutenção da luz do canal (Figura 6B).

Na sequência, foi utilizado o instrumento oscilatório 13/.045, sem pressão apical, com o objetivo de continuar removendo interferências, variando a conicidade do canal e progredindo em direção apical, sempre mantendo como medida limitadora o CPO. Este passo foi seguido pela utilização da lima manual Kerr nº15 (*Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland*), instrumento oscilatório 13/.035, lima manual Kerr nº15 e instrumento oscilatório 10/.025, até a medida limitadora do CPO.

Ao atingir o CPO, foi inserido no canal radicular um instrumento manual para a realização da odontometria. Após a obtenção do comprimento do dente, foi realizado o desbridamento foraminal e deu-se início ao preparo apical (0,5 a 1 mm aquém do ápice radiográfico) com a utilização de 4 limas manuais tipo Kerr (*Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland*).



Figura 6 - Preparo biomecânico do canal radicular. A - Preparo coroa-ápice com Endo-Eze; B - Verificação da luz do canal radicular com lima manual Kerr nº15; C - Irrigação/aspiração do canal radicular.

A realização da neutralização do conteúdo séptico do canal radicular e o preparo biomecânico deu-se de acordo com os grupos (Quadro 1) de soluções irrigadoras (n=10): NaOCl: irrigação com 5 ml de solução de hipoclorito de sódio 1% a cada troca de lima; CLX: preenchimento do canal com gel de Clorexidina 2% e irrigação com 5 ml de solução salina fisiológica a cada troca de lima; PRO: preenchimento do

canal com extrato glicólico de própolis 12% e irrigação com 5 ml de solução salina fisiológica a cada troca de lima.

Quadro 1 - Divisão dos grupos experimentais

Grupo (N=10)	Solução irrigante
NaOCl	Hipoclorito de sódio a 1%
CLX	Clorexidina gel a 2%
PRO	Extrato glicólico de própolis a 12%

Terminado o preparo biomecânico, os canais radiculares foram irrigados com 10 ml de solução salina fisiológica, para remoção da solução irrigadora e, logo em seguida, realizou-se a 2ª coleta do conteúdo do canal radicular.

4.7 Segunda coleta do conteúdo do canal radicular

As amostras foram coletadas através de cones de papel absorventes estéreis e apirogênicos, com o mesmo diâmetro do último instrumento manual utilizado no preparo biomecânico, introduzidos no canal radicular até o comprimento de trabalho e permanecendo neste por 1 minuto. Foram utilizados 4 cones de papel absorventes, os quais foram processados da mesma forma que na 1ª coleta do conteúdo do canal radicular.

4.8 Medicação intracanal por 14 dias

Após a realização da segunda coleta, os canais foram preenchidos com solução de EDTA 17%(Biodinâmica – PR - Brasil) durante 3 minutos e lavados com 10 ml de solução salina fisiológica, para posterior colocação da medicação intracanal. O hidróxido de cálcio P.A. (Biodinâmica – PR - Brasil) foi associado ao propilenoglicol (Byofórmula – São José dos Campos – SP – Brasil), o qual agiu como veículo na preparação da medicação intracanal. A medicação foi introduzida nos canais radiculares com auxílio de lentulo, até o completo preenchimento do canal.

Com o intuito de evitar a contaminação do elemento dentário por microrganismos da microbiota bucal foi confeccionada uma “rolha” de hidróxido de cálcio P.A. na entrada do canal, e o dente foi selado com cimento de ionômero de vidro restaurador. A medicação intracanal foi mantida no canal radicular por 14 dias.

4.9 Terceira coleta do conteúdo do canal radicular

Após 14 dias da colocação da medicação intracanal, o paciente foi novamente submetido à anestesia, isolamento e antisepsia do campo operatório (tomando todos os cuidados de forma semelhante à primeira sessão de atendimento). Realizou-se a abertura coronária, remoção da medicação intracanal com lima Kerr nº30 e irrigação com 20 ml de solução salina fisiológica estéril e apirogênica. Em seguida, foi feita a 3ª coleta de forma semelhante às coletas anteriormente descritas, tanto para análise em PCR e semeadura dos microrganismos e quanto para a quantificação de endotoxina.

4.10 Obturação dos canais radiculares

Terminada a 3ª coleta, os dentes foram obturados pela técnica do cone único, complementada por cones secundários, quando necessário, com utilização do cimento AH *Plus*. Foi realizada a radiografia final para comprovação de adequado preenchimento do canal radicular.

4.11 Análise microbiológica

4.11.1 Semeadura de microrganismos

A atividade antimicrobiana das soluções irrigadoras foi avaliada através da contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml), obtidas através da semeadura das amostras coletadas em meios de cultura.

Após a diluição da matriz obtida em cada coleta (-1, -2, -3 e -4), alíquotas de 50 µl da matriz foram semeadas, em duplicata, em 4 meios seletivos (FIGURA 7), os quais foram preparados de acordo com as instruções do fabricante:

- a) Placas de Mitis Salivarius – meio seletivo para *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* e *Enterococcus spp*;
- b) Placas de Enterococcosel – meio seletivo para *Enterococcus spp*;

c) Placas de Sabouraud Dextrose – meio seletivo para de leveduras;

d) Placas de MacConkey – meio seletivo para espécies de enterobactérias.

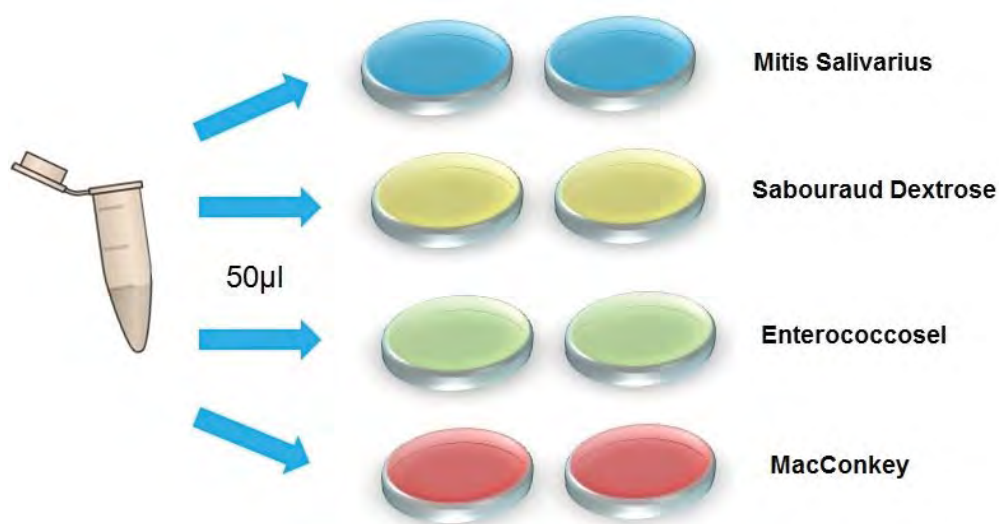


Figura 7 – Semeadura da matriz em 4 tipos de meios seletivos

Além disso, a matriz e as diluições -2 e -4 foram semeadas em meios de crescimento não-seletivos (FIGURA 8):

a) Brain Heart Infusion (BHI) acrescido com 5% de sangue desfibrinado de carneiro – com o intuito de permitir o crescimento de microrganismos aeróbios ou facultativos (APÊNDICE D);

b) Fastidious Anaerobe Ágar (FAA), acrescidos com 5% de sangue de carneiro, 600µL de Menadiona 1mg/L (*Vitamin K3*; 2-Methyl-1,4-naphthoquinone – SIGMA M5625) e 600µL de Hemina 1mg/L (*Hemin Bovine Minimum 80%* – SIGMA H5533) (APÊNDICE E).

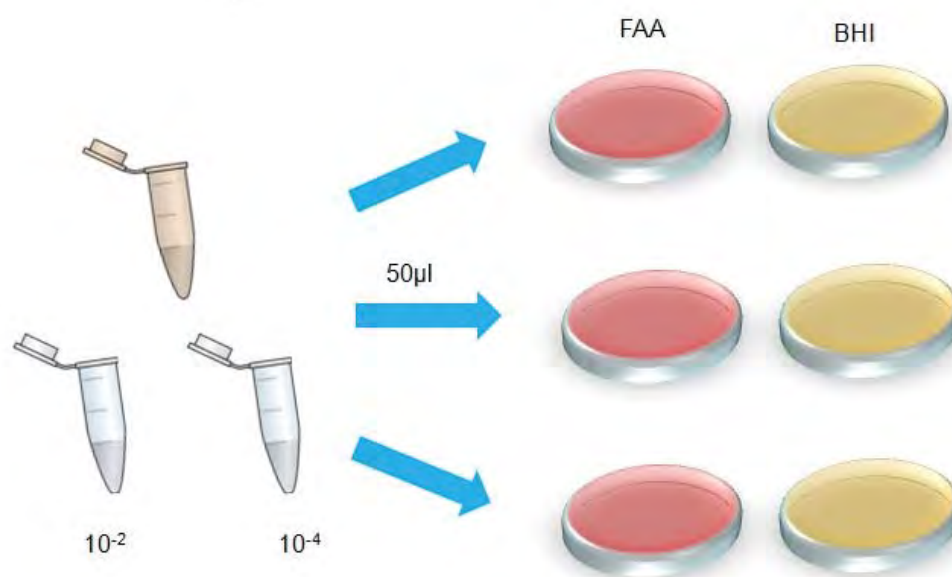


Figura 8 – Semeadura da matriz das diluições -2 e -4, nos meios de crescimento: FAA e BHI.

As placas de cultura contendo FAA com sangue de carneiro foram mantidas em jarras de anaerobiose por 14 dias (Probac – Brasil – Figura 9), enquanto que as demais placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas.



Figura 9 – Jarra de anaerobiose.

4.11.2 Detecção de microrganismos através da técnica de PCR espécie-específico para o gene 16S rRNA.

Esta análise foi realizada em parceria com o laboratório de pesquisa da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Através da técnica de PCR (Reação em Cadeia Polimerase) realizou-se a detecção, nas amostras coletadas, dos microrganismos: *Enterococcus faecalis*, *Filifactor alocis*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tanarella forsythia*, *Treponema denticola*.

Para esta detecção foram empregados primers espécie-específicos, direcionados à região do gene 16S rRNA no DNA bacteriano. As sequências dos oligonucleotídeos foram obtidas a partir de referências na literatura.

4.11.2.1 Isolamento do DNA bacteriano

Para a realização do isolamento do DNA (Figura 10) bacteriano foi utilizado o kit QIAamp DNA (QIAGEN, Chatsworth, CA, EUA). Os procedimentos para o isolamento do DNA foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

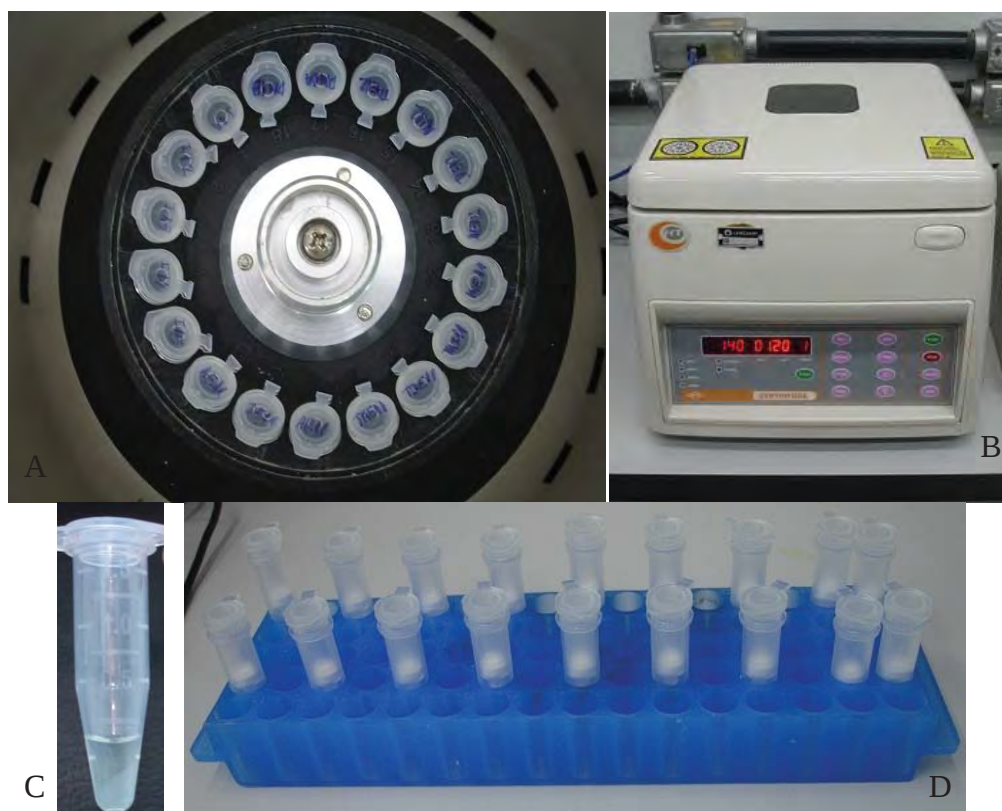


Figura 10 – A: eppendorfs na centrífuga; B: centrífuga utilizada; C: eppendorf com DNA ao fundo e sobrenadante a ser removido; D: eppendorfs com filtro utilizados para o isolamento do DNA.

4.11.2.2 Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada, inicialmente, em todas as amostras com *primer universal* e, depois de confirmada a presença de DNA bacteriano, com *primers* espécies-específicos (Quadro 2).

A reação de PCR foi realizada através da mistura de 1,5 µl do DNA isolado da amostra com 25 µl da mistura de reagentes (*Master Mix*), contendo as quantidades especificadas no Quadro 3.

Quadro 2 – Espécies microbianas, as sequências de primers utilizados para reação de PCR e fragmentos dos nucleotídeos.

Espécie	Sequência	Fragmento
Universal (Viana et al, J Clin Microb 2006; 44(4):1274-82)	F: TCC TAC GGG AGG CAG CAG T R: GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	466 bp
E.faecalis (Sedgley et al, Oral Microb Immun 2005, 20(1):10- 19)	F: CCG AGT GCT TGC ACT CAA TTG G R: CTC TTA TGC CAT GCG GCA TAA AC	138 bp
F.alocis (Siqueira, Rôças, JOE 2004, 30(12):851-854)	F: CAG GTG GTT TAA CAA GTT AGT GG R: CTA AGT TGT CCT TAG CTG TCT CG	594 bp
P.micra (Conrads et al, Clin Infec Dis 1997, 25(2):94-7)	F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG R: ATA TCA TGC GAT TCT GTG GTC TC	207 bp
P.endodontalis (Siqueira et al, JOE 2001, 27(3):164-167)	F: GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC R: CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC	672 bp
P.gingivalis (Siqueira et al, JOE 2001, 27(3):164-167)	F: AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG R: ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	404 bp
P.intermedia (Siqueira et al, JOE 2001, 27(3):164-167)	F: TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG R : TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	575 bp
P.nigrescens (Siqueira et al, JOE 2001, 27(3):164-167)	F: ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG R: CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG A	804 bp
T.forsythia (Slots et al, Clin Infect Dist 1995, 20(2): 304- 307)	F: GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA R: TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	641 bp
T.denticola (Slots et al, Clin Infect Dist 1995, 20(2): 304- 307)	F: TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T R: TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	316 bp

Quadro 2 - Proporção dos reagentes utilizados para confecção do *Master Mix*.

Reagentes	Quantidade (l)
Tampão (10x <i>Reaction buffer</i>)	2,5
<i>dNTPs</i>	0,5
<i>MgCl₂</i>	1,25
<i>H₂O Milli-Q</i>	17,625
<i>Primer Forward</i> 100 µm	0,75
<i>Primer Reverse</i> 100 µm	0,75
<i>Taq Platinum</i>	0,125

Todos os reagentes utilizados são da Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil.

A *PlatinumTaq DNA Polymerase* (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) utilizada neste estudo inicia sua ação apenas em temperatura adequada, podendo ser acrescentada diretamente no *Master Mix*, sem necessidade de pré-aquecimento.

As reações de PCR foram realizadas em aparelho termociclador convencional (MJ96G, Biocycler Termocicladores, Curitiba, PR, Brasil), onde a mistura foi submetida a vários gradientes de temperatura. As temperaturas de anelamento utilizadas para cada primer estão especificadas o Quadro 4.

Utilizou-se como controle positivo o DNA genômico purificado dos microrganismos investigados e, como controle negativo água *Milli-Q* esterilizada.

4.11.2.3 Eletroforese

Após a reação de PCR as amostras foram analisadas quanto à presença dos microrganismos estudados. Esta análise foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (Figura 11). Para esta, utilizou-se gel de agarose a 1% (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e solução tampão composta por Tris-borato EDTA 10x diluído (pH 8,0) e corada com brometo de etídeo (5 µg/ml – Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil).

Um marcador de peso molecular de 100bp (DNA ladder, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) foi incluído no primeiro espaço de gel de agarose. Para a realização do processo de eletroforese utilizou-se, durante 40 minutos, uma carga de 80 volts. Com o auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta pode-se observar, após o processo, as bandas obtidas.

A documentação fotográfica do gel de agarose foi obtida através do sistema Image Master-VDS (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra), sendo que captura das imagens foi realizada pelo programa LISCAP Image Capture software, fornecido pelo mesmo fabricante.

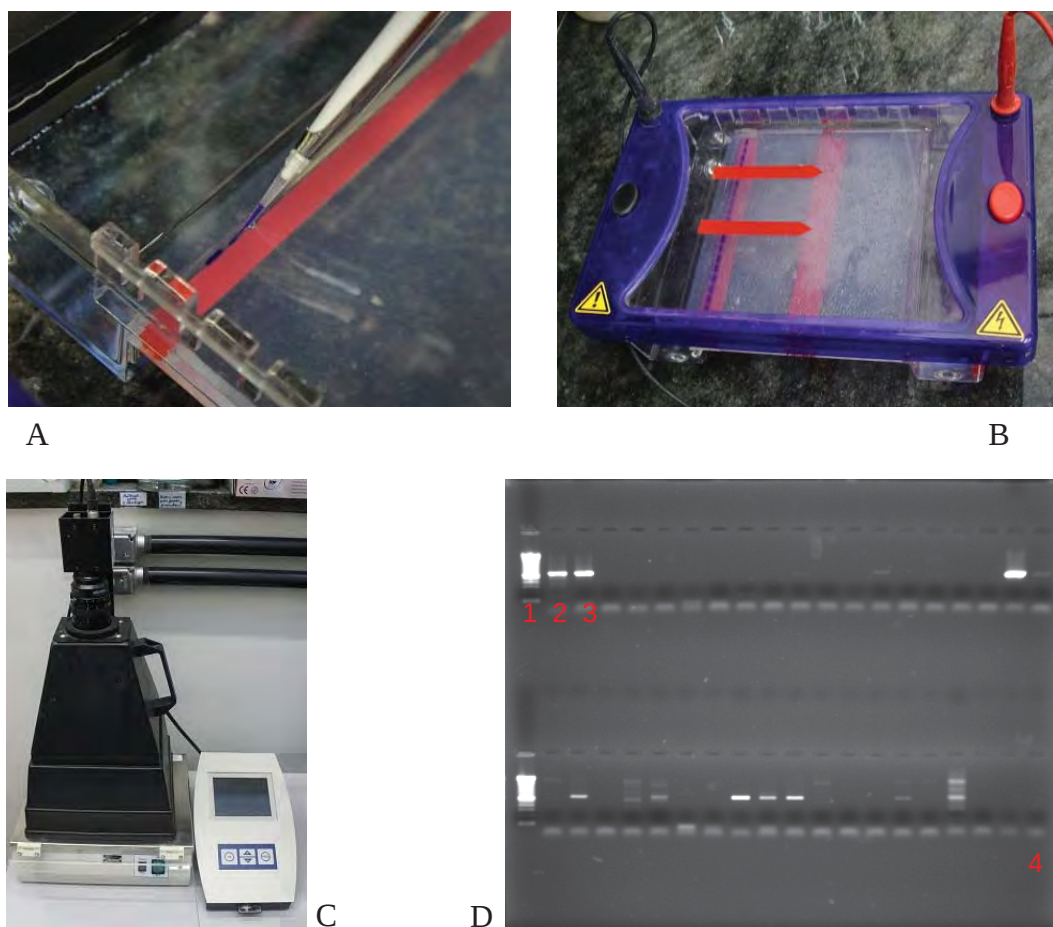


Figura 11 – A: preenchimento do gel agarose com as amostras após processo de PCR; B: cuba de eletroforese; C: transiluminador de luz ultravioleta; D: documentação fotográfica (1 – ladder, 2 – controle positivo, 3 – amostra com detecção do microrganismo avaliado, 4 – controle negativo).

As reações positivas foram determinadas através da presença de bandas que apresentavam o comprimento apropriado ao microrganismo testado. Os comprimentos dos fragmentos encontram-se no Quadro 2.

Quadro 4 – Espécies microbianas e ciclos de temperatura das reações de PCR.

Espécie	Ciclos
Universal	Desnaturação inicial 95°(10min); 40 ciclos: 95°(10s), 60°(10s); extensão final 72°(25s)
<i>E.faecalis</i>	Desnaturação inicial 95°(2min); 36 ciclos: 95°(1min), 57°(1min), 72°(1min); extensão final 72°(7min)
<i>F.alocis</i>	Desnaturação inicial 95° (2min); 26 ciclos: 95° (30s), 58° (1min), 72° (1min); extensão final 72°(2min)
<i>P.micra</i>	Desnaturação inicial 95°(2min); 36 ciclos: 94°(30s), 60°(1min), 72°(2min); extensão final 72°(10min)
<i>P.endodontalis</i>	Desnaturação inicial 95°(2min); 36 ciclos: 94°(30s), 58°(1min), 72°(2min); extensão final 72°(10min)
<i>P.gingivalis</i>	Desnaturação inicial 95°(2min); 36 ciclos: 94°(30s), 60°(1min), 72°(2min); extensão final 72°(2min)
<i>P.intermedia</i>	Desnaturação inicial 95°(2min); 36 ciclos: 94°(30s), 58°(1min), 72°(2min); extensão final 72°(10min)
<i>P.nigrescens</i>	Desnaturação inicial 95°(2min); 36 ciclos: 94°(30s), 58°(1min), 72°(2min); extensão final 72°(10min)
<i>T.forsythia</i>	Desnaturação inicial 95°(1min); 36 ciclos: 95°(30s), 60°(1min), 72°(1min); extensão final 72°(2min)
<i>T.denticola</i>	Desnaturação inicial 95°(2min); 36 ciclos: 94°(30s), 60°(1min), 72°(2min); extensão final 72°(10min)

4.12 Quantificação de endotoxinas

Para a verificação da neutralização das endotoxinas presentes nos canais radiculares foi utilizado o teste cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (análise quantitativa). Este teste foi realizado em duplicata para todas as coletas do conteúdo do canal radicular: imediatamente após abertura do elemento dentário, imediatamente após instrumentação e imediatamente após a medicação intracanal.

4.12.1 Lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL) – Teste cinético cromogênico (QCL)

As amostras coletadas do canal radicular foram submetidas à análise quantitativa de LPS pelo método cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (cinético QCL - LAL) no mesmo dia em que foram coletadas. 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 (Figura 12), foram adicionados 100 µl de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas do canal radicular (100 µl) e os controles positivos (10 µl). Os testes foram realizados em duplicata. A placa foi incubada no leitor cinético QCL a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ por 10 min, o qual estava acoplado a um microcomputador com software WinKQCL (Lonza)

específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Após, foram adicionados em cada poço da placa 100 μ l do reagente cinético cromogênico do LAL, com uma micropipeta multicanal e ponteiros apirogênicos.

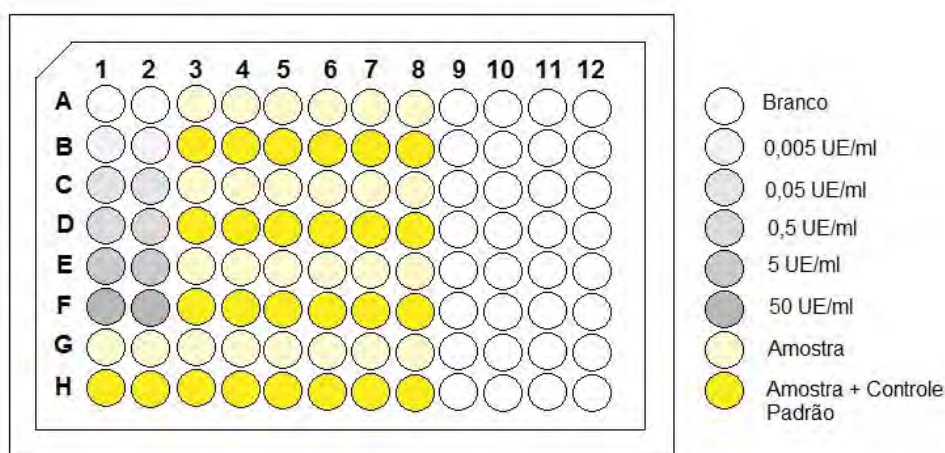


Figura 12 – Esquema de montagem da placa de 96 poços utilizada no teste cinético cromogênico LAL.

Após o início do ensaio cinético, o *software* da leitora de microplacas monitorou, de forma contínua, 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 o denominado tempo de reação. O *software* WinKQCL automaticamente calculou uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os parâmetros da curva-padrão foram impressos no relatório de impressão.



Figura 13 – Substâncias utilizadas como padrão e equipamento utilizado no teste cinético cromogênico - A: reagente LAL; B: endotoxina padrão de *E.coli*; C: água apirogênica; D: leitor cinético QCL; E: adição do reagente LAL.

4.13 Correlação entre lesão periapical e quantidade de endotoxina

Todos os pacientes tiveram suas radiografias iniciais digitalizadas e processadas no software Image Tools, onde foi realizada a medição do tamanho das lesões periapicais visíveis nas radiografias.

A medição foi realizada através da verificação da medida (em mm) do maior diâmetro da lesão.

Para a verificação da existência da correlação entre o diâmetro da lesão periapical e a quantidade de endotoxina presente no canal radicular foi utilizado o teste estatístico de Correlação Linear de Pearson.

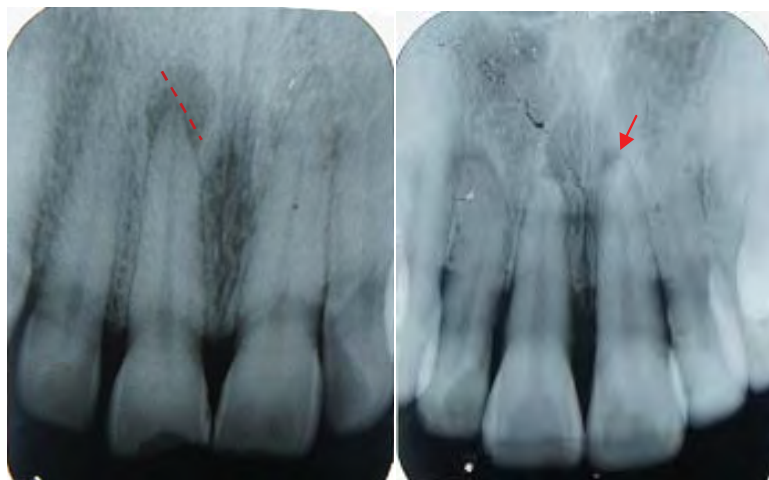


Figura 14 – Radiografias periapicais iniciais utilizadas para medição do maior diâmetro apresentado pela lesão periapical.

4.14 Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos através do teste de quantificação de endotoxinas e da análise do crescimento microbiológico será realizada através dos testes de Kruskal Wallis e Dunn, com nível de significância 5%. Estes testes estatísticos serão realizados com base nos percentuais de redução destes dados.

Os resultados obtidos através do teste de PCR serão avaliados de acordo com uma análise descritiva.

Para a avaliação da correlação entre o tamanho da lesão periapical e a quantidade de endotoxinas presente, será utilizado o teste de Correlação Linear de Pearson.

5 RESULTADOS

5.1 Análise de crescimento microbiológico

A Figura 15 (A, B, C e D) ilustra placas de petri contendo os microrganismos após semeadura referente à primeira coleta do conteúdo do canal radicular.

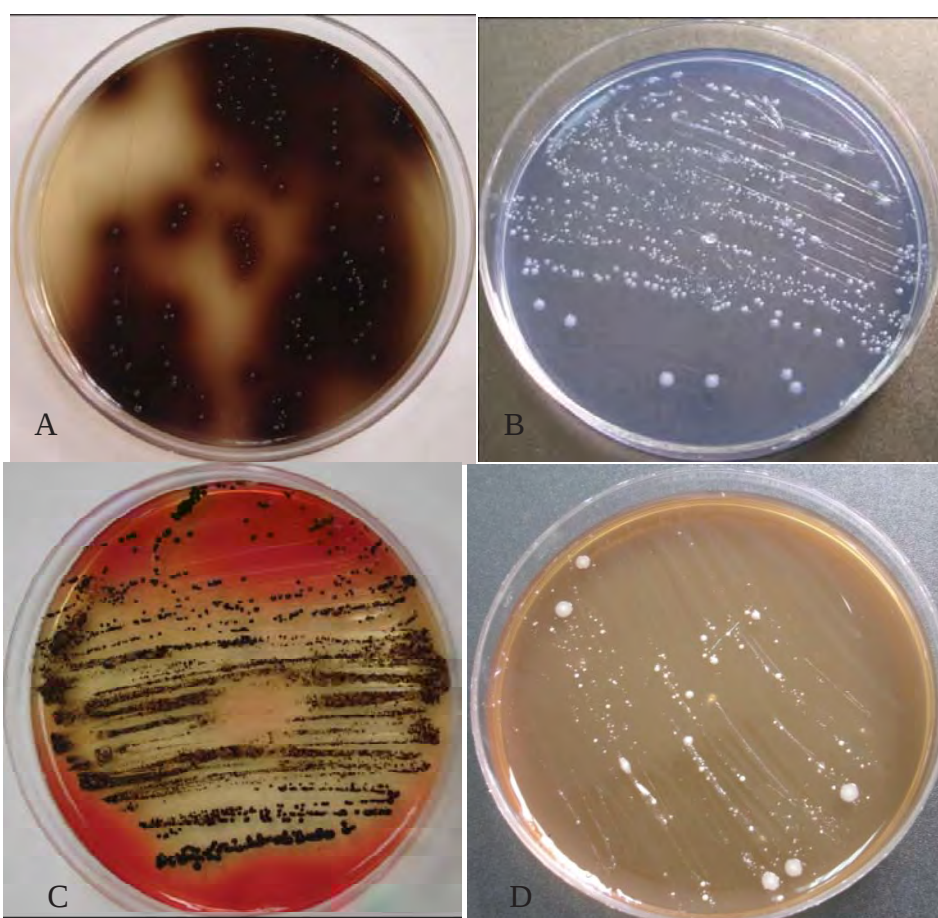


Figura 15 – Placas de petri com crescimento microbiano apresentado na 1ª coleta; A – Enterococcosel; B – Mitis Salivarius; C – FAA; D – BHI.

O crescimento microbiano das amostras coletadas foi determinado através da contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) (Tabela 14 e 15 – APÊNCICE F), sendo que as médias de UFC/ml de cada solução irrigadora e de cada meio seletivo utilizado encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Médias da quantidade de microrganismos (UFC/ml)

	Coleta	NaOCl	CLX	PRO
FAA (Anaeróbios)	1^aC	10722432	1145066	28889864
	2^aC	60210	420018	1240056
	3^aC	462	3498	1100538
BHI (Aeróbios e/ou anaeróbios facultativos)	1^aC	69686	14800	18224602
	2^aC	22	0	30422
	3^aC	68	56	30600
Mitis Salivarius (Streptococcus*)	1^aC	2488	46	666
	2^aC	0	0	2
	3^aC	4	0	1016
Sabouraud Dextrose (Leveduras)	1^aC	2244	0	210
	2^aC	0	0	62
	3^aC	0	0	0
Enterococcus (Enterococcus**)	1^aC	970	10	250
	2^aC	0	0	0
	3^aC	0	0	0
MacConkey (Enterobactérias***)	1^aC	0	0	0
	2^aC	0	0	8
	3^aC	0	2	180

*Indicativo de estreptococos. **Indicativo de Enterococos. ***Indicativo de Enterobactérias.

Observando-se os dados obtidos, pode-se verificar que diversas amostras obtidas na 1^a coleta não geraram crescimento microbiológico, principalmente nos meios Sabouraud Dextrose (indicativo

de leveduras) e MacConkey (indicativo de enterobactérias), o que indica uma composição microbiana diferente dentro do canal radicular ou uma inviabilidade dos microrganismos presentes. De acordo com as médias apresentadas, podemos observar que em todas as soluções houve diminuição na quantidade de microrganismos após o preparo biomecânico (2ª coleta). Este aumento só não ocorreu no meio seletivo MacConkey, no grupo irrigado com extrato glicólico de própolis, pois a média da 1ª coleta foi 0.

Pode-se observar um elevado crescimento de microrganismos anaeróbios em todas as amostras, o que indica a predominância deste tipo de microrganismo dentro dos canais radiculares avaliados.

A estatística deste trabalho foi realizada com base nos percentuais de redução referentes à diminuição de UFC/ml dos microrganismos da 2ª coleta em relação à 1ª coleta, e da 3ª coleta em relação à 1ª coleta (Tabela 2).

Pode-se observar que em diversas coletas não foi possível o cálculo do percentual de redução devido ao não crescimento microbiano na 1ª coleta realizada. Além disso, podemos verificar que em grande parte das amostras houve considerável diminuição no número de microrganismos, sendo que apenas poucos casos apresentaram aumento na quantidade destes.

Os percentuais de redução obtidos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo teste de Dunn (nível de significância 5%). A realização destes testes foi feita juntando-se todos os meios seletivos utilizados e comparando as soluções irrigadoras. A Tabela 3 mostra a estatística descritiva dos percentuais de redução e os resultados dos testes estatísticos realizados.

Tabela 2 - Percentual de redução (%) de microrganismos (UFC/ml) da 2ª coleta em relação à 1ª coleta, e da 3ª coleta em relação à 1ª coleta

	Anaeróbios		Aeróbios e anaeróbios facultativos		Estreptococos		Leveduras		Enterococo		Enterobactérias	
	2x1	3x1	2x1	3x1	2x1	3x1	2x1	3x1	2x1	3x1	2x1	3x1
NaOCI	96,3	99,99	100	100								
	100	77	100	100								
	99,71	100	100	100								
	93,75	-800	100	-150								
	99,31	99,99										
	99,99	99,99	99,95	100	100	75						
	99,75	100	100	64								
CLX	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
			96,37	100	100	100	100	100	100	100		
			100	98								
	-16,67	99,99										
	99,99	99,99	100	99,95	100	100						
	93,94	-5051,5							100	100		
	99,9	99,1										
PRO	100	100	100	100								
	100	100										
	99,99	63,33	100	46,5	100	-300	100	100	100	100		
	-60	76	100	100								
	99,97	99,5	99,49	100	100	100						
	100	100										
	-270,37	83,33										
PRO	99,99	100	100	100								
	-2213,1	100	88,75	100								
	-614,29	100	72,22	100								
	99,95	100	-1000	100								
	75,83	100	96,49	100	99,34	100	70,19	100	100	100		

Valores em branco indicam impossibilidade de cálculo devido ao não crescimento de microrganismos na 1ª coleta. Valores negativos indicam aumento da quantidade de microrganismos.

Tabela 3 – Média, desvio padrão, mediana e grupos homogêneos dos dados analisados estatisticamente

Grupo	2ªC x 1ªC			3ªC x 1ªC		
	Média e DP*	Mediana	GH*	Média e DP*	Mediana	GH*
NaOCl	99,38 ± 1,58	100	A	46,35 ± 191,73	100	A
CLX	88,83 ± 35,04	100	A	-368,59 ± 1553,15	99,99	A
PRO	- 82,91 ± 504,61	99,96	A	78,75 ± 80,04	100	A

*DP = Desvio padrão; GH = grupos homogêneos, onde letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa

De acordo com o teste de Kruskal-Wallis houve diferença estatística entre as soluções ($p=0,042$) quando avaliada a 2ª coleta em relação a 1ª coleta. No entanto, ao se realizar o teste de Dunn, o mesmo não detecta onde se encontra diferença, e diz que todos os grupos são semelhantes entre si. Já ao avaliarmos a 3ª coleta em relação a 1ª coleta, o teste de Kruskal-Wallis não detecta diferença estatística significativa ($p=0,39$) entre as soluções avaliadas.

De acordo com os dados da Tabela 3, podemos observar que todas as soluções irrigadoras apresentam medianas semelhantes, tanto na 2ª coleta em relação a 1ª coleta quanto na 3ª coleta em relação a 1ª coleta. Sendo assim, de acordo com a análise estatística apresentada, podemos observar que as 3 soluções avaliadas possuem capacidade antimicrobiana semelhante.

5.2 Quantificação de endotoxinas

Os dados obtidos através do teste de quantificação de endotoxinas de todas as amostras coletadas encontram-se na Tabela 13 (APÊNDICE F). Enquanto que os valores médios da quantidade de endotoxinas (EU/ml) de todas as coletas dos grupos avaliados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Médias da quantidade de endotoxina em cada coleta de cada grupo avaliado

Grupo	1ª coleta		2ª coleta		3ª coleta	
	Média e DP*	Mediana	Média e DP*	Mediana	Média e DP*	Mediana
NaOCl	175,53 ±	114,5	12,68 ±	13,4	7,24 ±	3,42
	226,96		7,05		11,15	
CLX	65,62 ±	47,9	29,61 ±	19,75	5,84 ±	5,36
	64,64		24,98		5,25	
PRO	150,68 ±	58,4	14,86 ±	9,97	10,58 ±	13,85
	266,82		15,10		9,1	

*DP = Desvio padrão.

De acordo com as medianas apresentadas, podemos verificar a presença de grande quantidade de endotoxina na 1ª coleta e a diminuição desta na 2ª coleta, fato provocado pelo preparo biomecânico e pela ação da solução irrigadora. A 3ª coleta também apresenta menor quantidade de endotoxina em relação a 1ª coleta, fato provocado pela junção da atividade do preparo biomecânico de da solução irrigadora com a ação da medicação intracanal.

A estatística realizada neste estudo foi baseada nos percentuais de alteração referentes à diminuição da quantidade de endotoxina (EU/ml) da 2ª coleta em relação a primeira coleta e da 3ª coleta em relação a 1ª coleta (Tabela 5).

Através dos percentuais de redução podemos verificar que na maioria dos casos houve diminuição da quantidade de endotoxina na 2ª coleta em relação a 1ª coleta, mas que em poucos casos pudemos observar um aumento desta quantidade na 2ª coleta. Pode-se verificar, também que em todos os casos houve diminuição na quantidade de endotoxina ao fim do tratamento endodôntico (3ª coleta em relação a 1ª coleta).

A análise descritiva dos percentuais de redução obtidos encontra-se nas Tabelas 6 e 7. Pode-se visualizar estes dados através dos gráficos das Figuras 16 e 17.

Além da análise descritiva, realizou-se o teste estatístico de Kruskal-Wallis e de Dunn (nível de significância 5%).

O teste estatístico de Kruskal-Wallis realizado indicou ausência de diferença estatística entre as soluções estudadas tanto na 2ª coleta em relação a 1ª coleta ($kw = 4,895$; $gl = 2$; $p\text{-valor} = 0,0865 > 0,05$), quanto na 3ª coleta em relação a 1ª coleta ($kw = 0,2218$; $gl = 2$; $p\text{-valor} = 0,895 > 0,05$).

Tabela 5 – Percentual de redução (%) da quantidade de endotoxinas

GRUPOS	2 ^a C x 1 ^a C	3 ^a C x 1 ^a C
NaOCl	98.57	90.73
	81.57	88.42
	50.55	42.54
	-222.08	48.59
	93.8	99.18
	-186.78	6
	89.1	96.9
	-122.73	23.04
	98.4	100
	92.36	99.6
CLX	-2.07	23.45
	-168.62	56.66
	73.52	93.74
	-210.3	81.03
	77.51	82.31
	86.23	100
	32.79	86.01
	82.62	100
	-31.97	19.72
	18.44	91.3
PRO	96.05	100
	93.44	99.36
	78.27	98.27
	92.9	57.09
	32.13	80.25
	72.26	85.1
	97.24	98.09
	94.05	88.31
	50.82	83.64
	38.02	34.74

Valores negativos indicam aumento na quantidade de endotoxinas.

Tabela 6 – Análise descritiva dos percentuais de redução da 2ª coleta em relação à 1ª coleta (média, desvio padrão), e teste de Dunn (grupos homogêneos)

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	GH*
NaOCL	10	7,3	130,2	85,3	A
CLX	10	-4,2	105,7	25,6	A
PRO	10	74,52	25,31	85,59	A

*GH = grupos homogêneos, onde letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa.

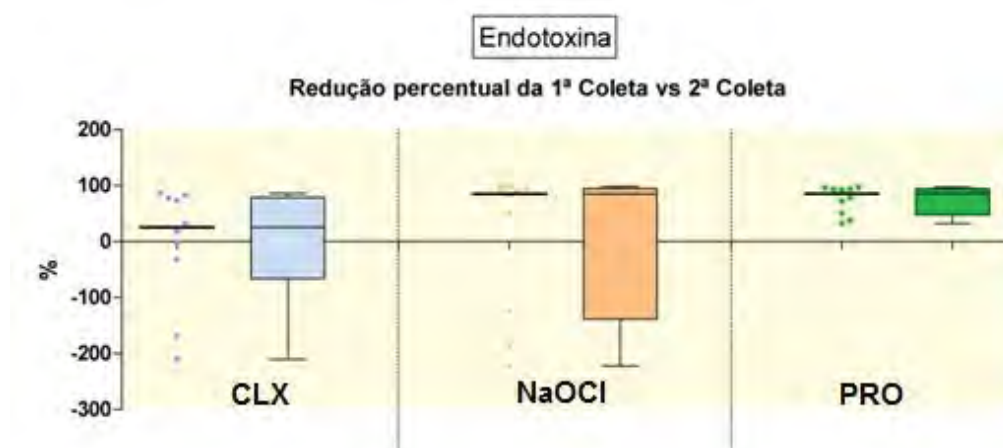


Figura 16 - Gráfico de pontos (*dot-plot*) e correspondente diagrama de caixa (*box-plot*) dos valores de redução, segundo os três tipos de solução irrigadora, da 2ª coleta em relação a 1ª coleta.

Tabela 7 - Análise descritiva dos percentuais de redução da 3ª coleta em relação à 1ª coleta (média, desvio padrão), e teste de Dunn (grupos homogêneos)

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana	GH
NaOCL	10	69,5	35,9	89,6	A
CLX	10	73,42	30	84,16	A
PRO	10	82,48	21,23	86,71	A

*GH = grupos homogêneos, onde letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa.

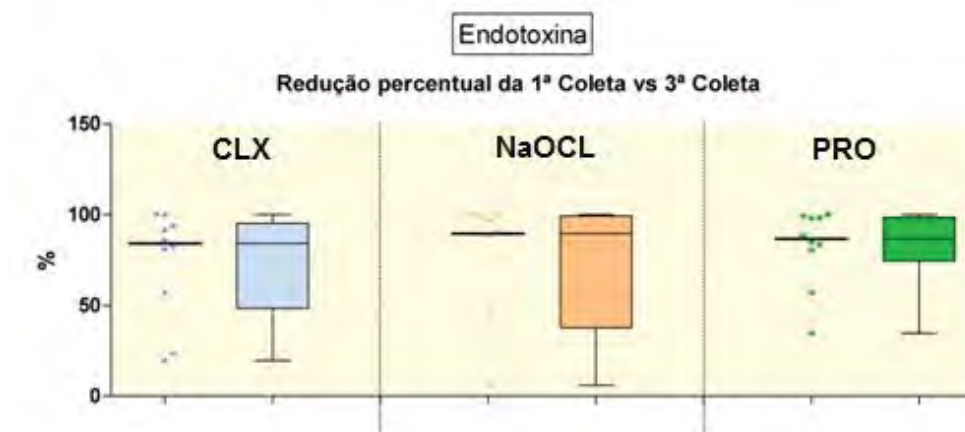


Figura 17 - Gráfico de pontos (*dot-plot*) e correspondente diagrama de caixa (*box-plot*) dos valores de redução, segundo os três tipos de solução irrigadora, da 3ª coleta em relação a 1ª coleta.

De acordo com estes resultados, pode-se verificar que a ação anti-endotóxica das 3 soluções avaliadas é semelhante.

5.3 Tamanho das lesões

A Tabela 8 mostra o maior diâmetro das lesões (em milímetros) presentes nos dentes utilizados para este estudo, assim como a quantidade de endotoxinas apresentada na 1ª coleta, a sintomatologia apresentada pelo paciente antes do início do tratamento e a quantidade total de microrganismos detectada na coleta inicial de cada elemento tratado endodonticamente.

Os resultados apresentados indicam que as maiores quantidades de microrganismos não se encontram, necessariamente, nas lesões de maiores diâmetros e nem nas com maior quantidade de endotoxina.

Tabela 8 – Tamanho das lesões, quantidade de endotoxinas presentes e sintomatologia inicial do paciente

Grupo	Lesão Mm	Endotoxinas EU/ml	Percussão	Palpação	Microrganismos
NaOCl	4	394			5400220
	2	127			2020
	1	3,62	+	+	16960
	7	2,49			520
	4	102			57600000
	4	6,66			28080080
	2	154			8500
	3	6,51			10400000
	8	710	+	+	0
	4	249			16849600
CLX	2	14,5			2000
	5	4,43			3600000
	8	83,1			6314460
	5	29,1			1180
	4	85,4			460
	8	146	+		760
	10	14,3	+		42000
	2	198			0
	2	14,7			0
	3	66,7			1632000
PRO	5	84,4			30574660
	10	26,7			7000
	2	13,9			1191100
	5	32,4			1400000
	3	11,7			336080
	6	141			1080
	8	889	+		349600000
	4	202	+		168560
	5	84,4	+		45600000
	12	21,3			2688000

Na Figura 18 pode-se observar o gráfico da quantidade de endotoxinas conforme o tamanho da lesão. Pode-se verificar que a maior quantidade de endotoxina foi encontrada nos canais com lesões de 8 mm de diâmetro.

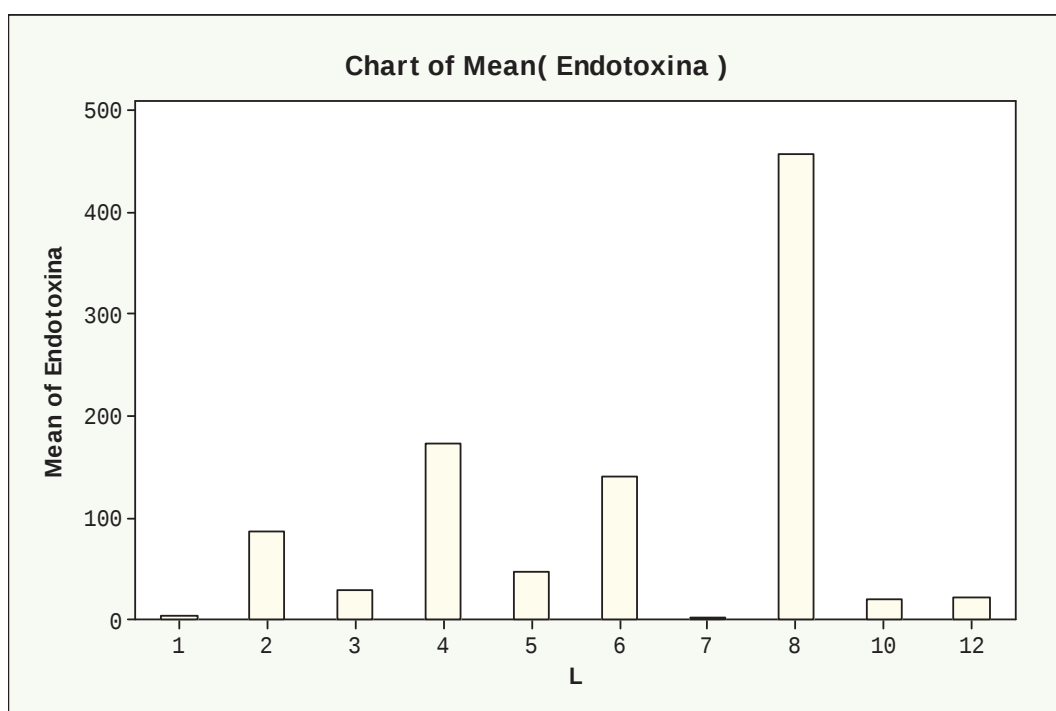


Figura 18 – Gráfico de colunas com as médias referentes a quantidade de endotoxina apresentadas de acordo com o tamanho da lesão verificada no Rx.

Ao se dividir as medidas das lesões em 3 classes (1 a 3,9mm, 4 a 7,9mm e 8 a 12mm) pode-se observar, com a realização do teste de correlação linear de Pearson, diferença estatística significativa entre as classes e a presença de uma correlação positiva porém fraca entre o tamanho da lesão e a quantidade de endotoxinas presentes ($p\text{-valor}=0,043<0,05$; $r=0,372$ – Figura 19).

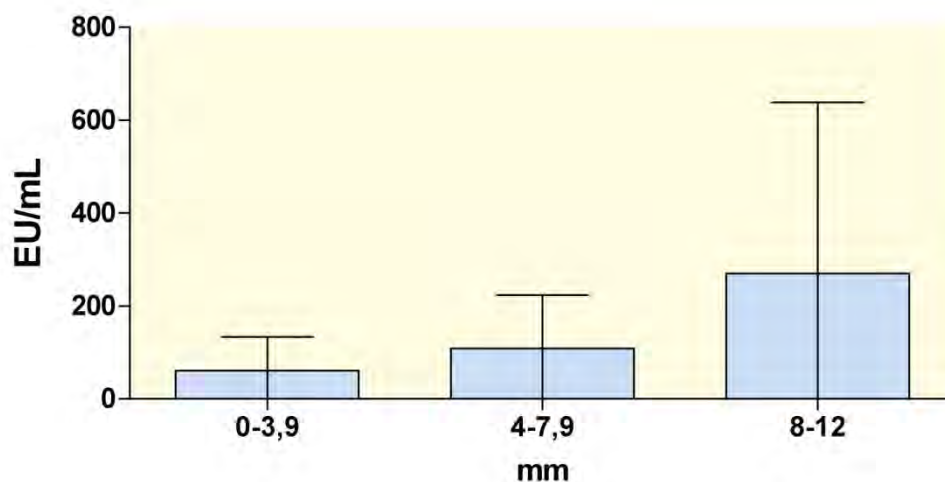


Figura 19 – Quantidade de endotoxina presente de acordo com a classe referente ao tamanho da lesão.

Diante dos resultados observados podemos verificar que a quantidade de endotoxina tende a aumentar de acordo com o aumento no tamanho da lesão.

5.4 PCR

As Tabelas 9, 10 e 11 indicam todas as detecções realizadas através do método de PCR. Todas as amostras coletadas dos canais radiculares utilizados nesta pesquisa, independentemente da coleta (1ª, 2ª ou 3ª coleta), apresentaram DNA bacteriano quando empregada a detecção de DNA através do *primer universal*, direcionado ao gene 16S rRNA.

Pode-se verificar que todos os microrganismos investigados neste estudo foram detectados em pelo menos uma das amostras analisadas.

Tabela 9 - Microrganismos detectados pelo PCR no grupo NaOCl

Grupo	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
NaOCl	<i>P. micra</i> <i>P. gingivalis</i> <i>T. denticola</i>	<i>P. micra</i> <i>T. denticola</i>	<i>P. micra</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. nigrescens</i>
	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i>	<i>P. nigrescens</i>	<i>P. micra</i>
	<i>P. micra</i> <i>E. faecalis</i>	-	<i>E. faecalis</i>
	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. nigrescens</i>	-
	<i>P. micra</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. nigrescens</i>	-	<i>P. nigrescens</i>
	<i>T. denticola</i> <i>T. forsythia</i>	<i>T. forsythia</i>	<i>P. gingivalis</i>
	<i>P. nigrescens</i>	-	-
	<i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>	-	-
	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>	<i>P. nigrescens</i>	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>
	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i>	<i>P. micra</i> <i>P. gingivalis</i> <i>T. forsythia</i>

Tabela 10 - Microrganismos detectados pelo PCR no grupo CLX

Grupo	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
CLX	<i>P. micra</i>	-	<i>P. micra</i>
	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. intermédia</i>	<i>P. micra</i>	-
	<i>P. micra</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>	<i>P. micra</i>	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. denticola</i>
	<i>P. micra</i> <i>P. intermédia</i>	<i>P. micra</i>	<i>P. micra</i>
	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>	<i>P. micra</i> <i>T. denticola</i>	-
	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i> <i>F. alocis</i>	<i>P. micra</i>	-
	<i>P. micra</i> <i>P. gingivalis</i> <i>T. forsythia</i>	<i>P. micra</i>	<i>T. denticola</i>
	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>T. denticola</i>	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. nigrescens</i>	<i>P. micra</i>
	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i>	<i>P. micra</i>	-
	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>	<i>P. micra</i> <i>T. forsythia</i>	<i>P. micra</i>

Tabela 11 - Microrganismos detectados pelo PCR no grupo PRO

Grupo	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
PRO	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. nigrescens</i>	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>	-
	<i>P. micra</i> <i>T. forsythia</i>	<i>P. micra</i>	-
	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i>	-	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>
	<i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>	<i>P. micra</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>	<i>P. micra</i> <i>T. denticola</i>
	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i> <i>F. alocis</i>	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>	<i>P. micra</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>
	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i>	<i>P. micra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i>
	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>	-	-
	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i> <i>F. alocis</i>	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. denticola</i>	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>
	<i>P. micra</i> <i>P. gingivalis</i> <i>T. forsythia</i> <i>T. denticola</i>	<i>P. gingivalis</i> <i>T. forsythia</i>	<i>T. denticola</i>
	<i>P. endodontalis</i> <i>E. faecalis</i>	<i>P. micra</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i>	<i>P. micra</i> <i>P. endodontalis</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. forsythia</i>

Foi verificado um total de 245 detecções de microrganismos nos 30 canais analisados neste estudo. Nas diversas

coletas podemos verificar o seguinte número de detecções (Tabela 12): 119 (1ª coleta), 79 (2ª coleta), 77 (3ª coleta).

Na 1ª coleta foram detectados os seguintes microrganismos: *Enterococcus faecalis* (2/30), *Filifactor alocis* (3/30), *Parvimonas micra* (24/30), *Porphyromonas endodontalis* (11/30), *Porphyromonas gingivalis* (7/30), *Prevotella intermedia* (5/30), *Prevotella nigrescens* (15/30), *Tanerella forsythia* (16/30), *Treponema denticola* (11/30).

Após o preparo biomecânico (2ª coleta) foram encontradas as mesmas espécies, com exceção de *Enterococcus faecalis* e *Filifactor alocis*. Houve predominância da detecção de *Parvimonas micra* (18/30), *Prevotella nigrescens* (9/30) e *Tanerella forsythia* (8/30). Pode-se observar uma diminuição no número de detecções.

Após o tempo de medicação intracanal (3ª coleta), foram detectadas as mesmas espécies da 2ª coleta, com exceção de *Prevotella intermedia*. As espécies predominantes foram: *Parvimonas micra* (18/30), *Tanerella forsythia* (6/30), *Treponema denticola* (7/30) e *Prevotella nigrescens* (6).

Na Tabela 12 pode-se verificar o número de microrganismos de cada espécie detectado em cada coleta, independente da solução irrigadora utilizada.

É possível verificar que as espécies mais presentes em todas as coletas realizadas são: *Parvimonas micra* (presente em 66,7% das amostras), *Tanerella forsythia* (33,3%) e *Prevotella nigrescens* (33,3%).

Na Figura 20 pode-se observar um gráfico de colunas com a porcentagem de detecção apresentada por cada microrganismo, no teste de PCR, de acordo com a coleta realizada. Verifica-se que na maioria dos microrganismos há uma redução no percentual de detecção dos mesmos da 1ª coleta para a 2ª e 3ª coleta.

Tabela 12 – Microrganismos detectados através de PCR nas 3 coletas realizadas, e suas porcentagens

Microrganismos	1ªC (%)	2ªC (%)	3ªC (%)	Total (%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	2 (6,7)	0 (0)	0 (0)	2 (2,2)
<i>Filifactor alocis</i>	3 (10)	0 (0)	0 (0)	3 (3,3)
<i>Parvimonas micra</i>	24 (80)	18 (60)	18 (60)	60 (66,7)
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	11 (36,7)	4 (13,3)	4 (13,3)	19 (21,1)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	7 (23,3)	4 (13,3)	3 (10)	14 (15,6)
<i>Prevotella intermedia</i>	5 (16,7)	3 (10)	0 (0)	8 (8,9)
<i>Prevotella nigrescens</i>	15 (50)	9 (30)	6 (20)	30 (33,3)
<i>Tanerella forsythia</i>	16 (53,3)	8 (26,7)	6 (20)	30 (33,3)
<i>Treponema denticola</i>	11 (36,7)	5 (16,7)	7 (23,3)	23 (25,6)

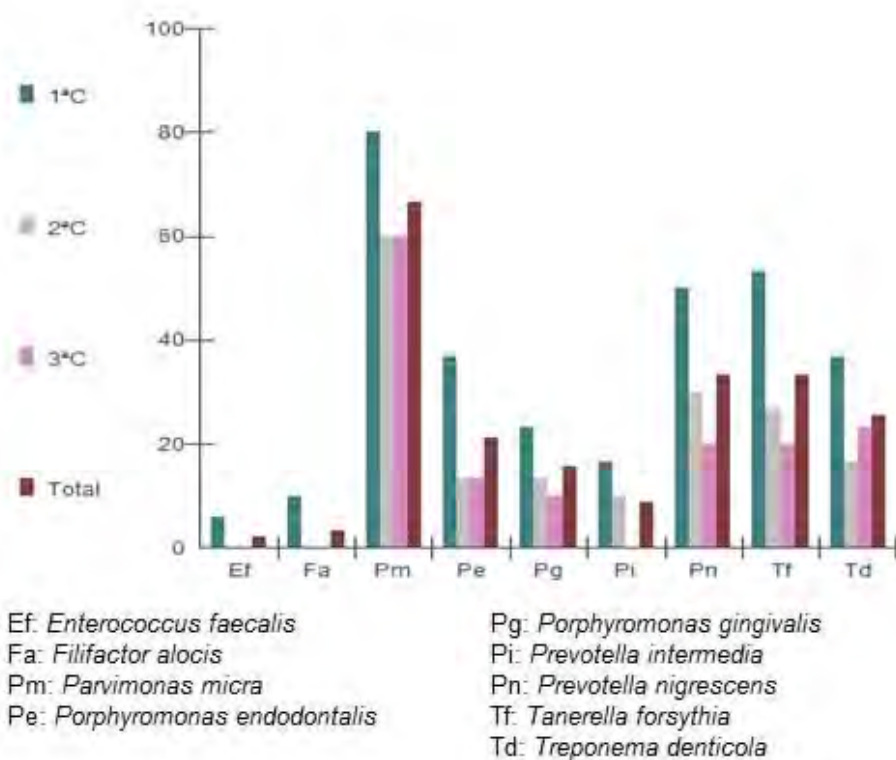


Figura 20 – Porcentagem de microrganismos detectados nas amostras analisadas por PCR, de acordo com as coletas.

6 DISCUSSÃO

6.1 Sobre o tema da pesquisa

Sabe-se que a necessidade do tratamento endodôntico é determinada, principalmente, pela presença de agentes agressores, tanto microrganismos quanto endotoxinas, nos canais radiculares (Miller, 1894; Kakehashi, 1965; Mattison et al., 1987), e que a permanência destes após a realização do tratamento é fator determinante no insucesso (Gomes et al 1996 e 2004; Siqueira Jr 2001). Com isso, justifica-se uma busca constante por substâncias auxiliares ao tratamento endodôntico capazes de eliminar os microrganismos e neutralizar seus subprodutos.

Devido a sua capacidade de dissolução de matéria orgânica (Beltz et al., 2003) e de neutralização do conteúdo tóxico do canal radicular (Leonardo, 2005; Okino et al., 2004; Tanomaru et al., 2005; Valera et al., 2001), o hipoclorito de sódio é, hoje, uma das soluções mais utilizadas durante a irrigação do preparo biomecânico. No entanto esta substância é considerada tóxica aos tecidos periapicais, principalmente quando utilizado em altas concentrações (Önçag et al., 2003).

A clorexidina surgiu como uma opção de agente irrigante biocompatível com os tecidos periapicais (Tanomaru et al., 2002; Semenoff et al., 2008). Apesar de apresentar atividade antimicrobiana semelhante ao hipoclorito de sódio (Vianna et al., 2007; Cardoso et al., 2011) esta substância demonstra baixo ou nenhum efeito sobre endotoxinas (Oliveira et al. 2007; Gomes et al., 2009). Com isso, diversas

substâncias vêm sendo testadas na busca de uma solução irrigante que proporcione uma maior chance de sucesso ao tratamento endodôntico.

Algumas substâncias fitoterápicas começaram a ser avaliadas com este intuito e, devido a sua capacidade antiinflamatória, analgésica e antimicrobiana (Grange , Davey, 1990; Burdock, 1998; Koo et al., 2000; Lotufo et al., 2005), a própolis começou a receber atenção especial por parte de alguns autores.

Diversos estudos realizados *in vitro* demonstraram que a própolis atua de forma adequada sobre alguns microrganismos comumente existentes nos canais radiculares (Molina, 2008; Maekawa, 2010; Valera et al., 2010), com isso fez-se necessária a avaliação desta substância *in vivo*, uma vez que a microbiota apresentada neste tipo de estudo é complexa, compreendendo mais de 50 espécies bacterianas (Baumgartner e Falker 1991).

6.2 Sobre o método utilizado

Para a realização de um trabalho *in vivo*, uma das grandes dificuldades é a padronização dos espécimes, uma vez que os mesmos são escassos. Com o intuito de se promover esta padronização foram selecionados pacientes com necessidade de tratamento endodôntico devido a presença de necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente; foram excluídos da pesquisa pacientes que haviam ingerido antibiótico por até 3 meses antes do início do tratamento, de forma que este não pudesse interferir na microbiota presente; pacientes com sintomatologia aguda; pacientes com a câmara pulpar exposta no meio bucal e pacientes com doença periodontal.

Outra dificuldade a ser observada em um estudo *in vivo* é a cooperação apresentada pelos pacientes. Diversos casos foram

perdidos devido ao comparecimento do paciente à primeira sessão e o não retorno no tempo adequado para a segunda sessão, o que interferia no tempo da medicação, podendo alterar os resultados da ação da mesma.

Com o intuito de verificar a atividade antimicrobiana das soluções irrigadoras avaliadas (hipoclorito de sódio 1%, clorexidina gel 2% e extrato glicólico de própolis 12%) optou-se pela cultura de microrganismos, pois, apesar deste tipo de técnica não ser capaz de promover o crescimento de todas as espécies bacterianas presentes (Rolph et al., 2001), ela nos permite visualizar facilmente a diminuição de microrganismos gerada pelo tratamento endodôntico, uma vez que permite apenas o crescimento de bactérias viáveis.

Esta técnica de cultura é utilizada em diversas pesquisas para a avaliação de substâncias irrigadoras (Cardoso et al., 2011) e medicações intracanaís (Maekawa, 2010), sendo que os meios de cultura utilizados são escolhidos de acordo com os microrganismos a serem avaliados.

Com o intuito de permitir o crescimento de microrganismos aeróbios, facultativos e anaeróbios, foram utilizados diversos meios de cultura, sendo que os meios seletivos e o BHI foram mantidos em estufa bacteriológica a 37°C e o FAA permaneceu em jarras de anaerobiose, simulando um ambiente sem oxigênio e propiciando o crescimento anaeróbio.

Diversas pesquisas realizadas indicam a predominância de microrganismos anaeróbios, principalmente Gram-negativos, em canais com presença de necrose pulpar e lesão periapical crônica (Vafaeie et al., 1999; Leonardo, 2000). Uma vez que as bactérias Gram-negativas apresentam endotoxinas em suas paredes celulares, e que estas endotoxinas têm potente ação citotóxica, podendo gerar reações inflamatórias, imunológicas e reabsorções ósseas (Wang , Stashenko,

1993; Yamasaki et al., 1992), é importante a avaliação das soluções irrigadoras frente a estas substâncias.

Apesar de alguns estudos utilizarem o teste Gel Clot para a detecção de endotoxinas (Oliveira et al., 2005; Oliveira et al., 2007), por ser um método mais acessível e de menor custo, por não necessitar do leitor cinético, optou-se pela utilização do teste cromogênico do lisado do amebócito de *Limulus*, o qual é mais sensível para a detecção de endotoxinas, proporcionando uma quantificação mais precisa. Outros autores também utilizaram este tipo de teste quando da avaliação de endotoxinas (Schein, Schilder, 1975; Jacinto et al., 2005; Maekawa et al., 2010; Valera et al., 2010).

Além da avaliação das substâncias foi proposta a identificação da microbiota presente neste tipo de canal radicular estudado (com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente), através da detecção de alguns microrganismos específicos. Para isso optou-se pela técnica de PCR, a qual nos permite verificar a presença de determinados microrganismos através de *primers espécie-específico*. Esta técnica já foi utilizada em diversos estudos onde foi verificada a presença de bactérias anaeróbias estritas Gram-negativas em canais radiculares (Gomes et al., 2005; 2006; 2007). Portanto optou-se pela investigação de microrganismos através de *primers* de espécies Gram-negativas e Gram-positivas comumente detectadas, na literatura, em infecções primárias.

As amostras foram adquiridas através de 3 coletas realizadas durante o tratamento endodôntico: 1ª coleta – após cirurgia de acesso (para determinar a quantidade inicial de microrganismos e endotoxinas, além da microbiota existente); 2ª coleta – após preparo biomecânico (para avaliar a eliminação de microrganismos e a inativação de endotoxinas por parte do preparo biomecânico e da ação das soluções irrigantes); 3ª coleta – após os 14 dias da medicação intracanal (para avaliar a redução final dos microrganismos e endotoxinas).

Alguns estudos realizam estas coletas através do preenchimento do canal radicular, com solução salina fisiológica aprotínica, e da aspiração com seringas descartáveis (Maekawa et al., 2010; Valera et al., 2010; Cardoso et al., 2011). No entanto, como as amostras a serem avaliadas por PCR seriam mantidas em meio específico (VMGAIII), optou-se pela coleta de todas as amostras através de cones de papéis estéreis e aprotínicos. Técnica também utilizada por outros autores (Martinho, 2007; Endo, 2011)

A medicação intracanal escolhida para o estudo foi o hidróxido de cálcio, devido a suas propriedades antimicrobiana (Bystrom et al., 1985), neutralizadora de pH ácido, indutora de mineralização (Leonardo et al., 2002) e por sua ação sobre endotoxinas (Barthel et al., 1997; Tanomaru et al., 2003; Maekawa et al., 2010; Valera et al., 2010). O período de 14 dias determinado para o tempo de permanência da medicação intracanal deu-se pela necessidade deste tempo por parte do hidróxido de cálcio para se difundir nas áreas de propagação microbiana, gerando uma ação satisfatória (Takahashi et al., 1996).

Foram realizadas medidas do maior diâmetro apresentado pela lesão periapical na radiografia inicial com o intuito de se realizar uma correlação entre a quantidade de endotoxinas e a reabsorção óssea gerada, uma vez que alguns estudos indicam que a endotoxina tem papel fundamental na iniciação e na perpetuação do processo de reabsorção óssea (Mattison et al., 1987; Wang, Stashenko, 1993).

Com o intuito de gerar uma medição precisa, as radiografias foram digitalizadas e utilizou-se o software Image Tools.

6.3 Sobre os resultados

De acordo com os resultados apresentados, houve diminuição da quantidade de microrganismos da 2ª coleta, em relação a 1ª coleta, em todas as soluções irrigadoras. Este fato se deve tanto a eliminação dos microrganismos pela ação mecânica do preparo biomecânico quanto pela atividade antimicrobiana das soluções irrigadoras avaliadas.

Estudos demonstram que só o preparo biomecânico já promove uma grande remoção microbiana (Valera et al., 2009), uma vez que diversos tratamentos endodônticos realizados apenas com solução salina foram capazes de diminuir a quantidade de microrganismos na 2ª coleta (in vitro). No entanto estes mesmos estudos demonstram diferença estatisticamente significativa entre a solução salina e o hipoclorito de sódio ou outras soluções irrigantes testadas, o que comprovaria que a ação antimicrobiana destas soluções é fundamental para se promover uma eliminação bacteriana adequada. O conjunto ação mecânica + ação antimicrobiana chega a eliminar 100% dos microrganismos em alguns casos (Maekawa et al., 2010; Valera et al., 2010; Cardoso et al., 2011).

Algumas amostras analisadas nesta pesquisa não promoveram crescimento microbiano na 1ª coleta, o que não permitiu avaliar a diminuição bacteriana nestes casos. Este fato pode ter origem na inviabilidade dos microrganismos presentes no canal radicular, na ausência destes microrganismos (em caso de trauma, por exemplo), ou no fato do microrganismo presente não ser cultivável. Alguns estudos indicam que diversos microrganismos que têm sua presença detectada pelo método de PCR, não são identificados quando da cultura da amostra obtida, pois os mesmo são de difícil crescimento em meios de cultura (Rolph et al., 2001).

Os resultados estatísticos demonstram ausência de diferença significativa em relação a atividade antimicrobiana do hipoclorito 1%, da clorexidina gel 2% e do extrato glicólico de própolis. No entanto pode-se observar que o grupo do hipoclorito de sódio eliminou, durante o preparo biomecânico, quase que totalmente os microrganismos presentes em todas as suas amostras, fato que não ocorreu nos grupos da clorexidina e da própolis.

Esta maior diminuição no número de microrganismos pode ter origem numa menor tensão superficial apresentada pelo hipoclorito de sódio, uma vez que sua solução é menos viscosa que as demais. Este fato pode permitir que o hipoclorito penetre mais profundamente nos túbulos dentinários, eliminando microrganismos não alcançados pelas outras substâncias.

Algumas amostras analisadas demonstraram um aumento na quantidade de determinados microrganismos da 2ª coleta em relação a primeira, fato que pode ter origem numa menor efetividade da solução irrigante sobre este tipo de microrganismo.

A grande maioria dos casos apresentou alta redução da quantidade de microrganismos da 1ª coleta para a 3ª coleta, o que se deve à junção da ação do preparo biomecânico, da solução irrigante e da medicação intracanal utilizada. Em poucos casos pode-se notar um aumento na quantidade de microrganismos presentes na 3ª coleta, o que pode ter origem na permanência de microrganismos em túbulos dentinários, que poderiam re-contaminar a luz do canal durante o período da medicação intracanal.

Em relação às endotoxinas, pode-se verificar uma presença de quantidade elevada na 1ª coleta e grande diminuição deste valor na 2ª coleta, o que indica uma boa inativação das endotoxinas por parte das soluções avaliadas.

Embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa quanto à atividade anti-endotóxica das soluções avaliadas,

pode-se verificar que o extrato glicólico de própolis foi a solução que mais reduziu a quantidade de endotoxina na 2ª coleta, uma vez que não houve aumento nesta quantidade em qualquer um de seus casos. Fato que ocorreu tanto no grupo do hipoclorito de sódio 1% (3 casos) quanto no grupo da clorexidina gel 2% (4 casos).

Este aumento na quantidade de endotoxinas pode ter origem no fato de a morte bacteriana liberar esta substância, que está presente em sua parede celular (Caroff, 2002). Associando-se uma alta atividade antimicrobiana por parte das soluções irrigadoras, com sua atividade anti-endotóxica baixa, as endotoxinas presentes não puderam ser inativadas e, portanto, tiveram sua quantidade aumentada.

Quando da avaliação da quantidade de endotoxina presente na 3ª coleta pode-se observar que em todos os casos houve diminuição de endotoxina, quando comparado a 1ª coleta. O que indica que a medicação intracanal com hidróxido de cálcio conseguiu promover inativação de parte das endotoxinas, mesmo nos casos onde as soluções irrigadoras (hipoclorito de sódio 1% e clorexidina gel 2%) falharam.

Através da medição das lesões apresentadas nos dentes utilizados nesta pesquisa, pode-se observar uma quantidade elevada de endotoxinas em lesões periapicais maiores de 4 mm, sendo que a maior quantidade de endotoxina foi encontrada nas lesões de 8mm.

Estudo realizado por Endo (2011) indicou que lesões com mais de 5 mm apresentam maiores quantidades de endotoxinas, no entanto, no presente estudo observou-se baixa quantidade de endotoxina em alguns dentes com lesões periapicais extensas (10 e 12mm). Este fato nos leva a crer que possivelmente as lesões apresentadas eram cistos (com grande quantidade celular) e não abscessos, como os demais casos estudados.

Quando foi realizada a divisão dos dentes em grupos de acordo com o tamanho da lesão, foi verificada uma correlação fraca, porém positiva entre quantidade de endotoxina e tamanho da lesão,

sendo observada uma diferença estatisticamente significativa entre as quantidades de endotoxina apresentadas de acordo com os grupos. Esta correlação também foi detectada por outros autores em estudos anteriores (Mattison et al., 1987).

A análise de PCR mostrou uma infecção polimicrobiana, sustentando trabalhos realizados anteriormente (Bergenholtz, 1974; Sundqvist, 1976; Vianna et al, 2007). O microrganismo que apresentou maior número de detecções foi *Parvimonas micra*, seguido por *Prevotella nigrescens* e *Tanarella forsythia*. Este resultado difere de alguns estudos que não detectaram estes microrganismos (Bogen, Slots, 1999), porém concorda com outros onde os mesmos foram detectados (Gomes et al., 2005; Martinho, 2007).

Foi verificada uma diminuição na detecção de microrganismos tanto na 2ª coleta quanto na 3ª coleta, o que indica que alguns microrganismos foram totalmente removidos do canal radicular com a realização do tratamento endodôntico. Além disso, mesmo os microrganismos detectados nestas podem ter sido mortos com o tratamento, uma vez que o teste de PCR identifica tanto microrganismos viáveis como não viáveis. Portanto estas detecções não devem ser utilizadas, de forma determinante, para a avaliação da atividade das soluções irrigadoras.

Uma vez que foi comprovada a predominância de uma microbiota anaeróbia no canal radicular, pode-se observar que esta é reduzida quando da realização de um tratamento endodôntico adequado. Para este tratamento pode-se indicar o uso de clorexidina gel ou extrato glicólico de própolis, com a mesma eficiência anti-endotóxica e anti-microbiana do hipoclorito de sódio, quando da utilização destas substâncias como agentes irrigantes. Apesar da boa atividade dessas substâncias, a medicação intracanal com hidróxido de cálcio continua sendo de grande importância devido a sua atividade anti-endotóxica

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados pode-se concluir que:

- a) Todas as soluções avaliadas (solução de hipoclorito de sódio 1,0%, clorexidina gel 2,0% e extrato glicólico de própolis 12%) apresentaram atividade antimicrobiana e anti-endotóxica semelhantes;
- b) Os canais radiculares avaliados apresentaram microbiota diversa, sendo que os microrganismos mais presentes foram: *Parvimonas micr*, *Tanerella forsythia* e *Prevotella nigrescens*;
- c) Há uma correlação positiva, porém fraca, entre quantidade de endotoxina e tamanho da lesão, sendo que quanto maior o diâmetro da lesão, maior a quantidade de endotoxina presente no canal radicular.

8 REFERÊNCIAS

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

Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. Int Endod J. 1999;32(2):99-102.

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

Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie. 2000;31:3-15.

Barbosa MH, Zuffi FB, Maruxo HB, Jorge LLR. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. Acta Paul Enferm. 2009;22(3):318-22.

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;20(3):155-9.

Baumgartner, JC, Falkler Jr, WA. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. J Endod. 1991;17(8):380-3.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bealtz RE, Torabinejad M, Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and RDTA on bovine pulp and dentin. *J Endod*. 2003;29:334-7.

Bergenholtz G. Microorganisms from necrotic pulp of traumatized teeth. *Odontologisk Revy*. 1974;25:347-358.

Bogen G, Slots J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesion. *Int Endod J*. 1999;32(3):204-210.

Bosio K. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett Appl Microbiol*. 2000;31(3):174-177.

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

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

Cardoso FGR, Xavier ACC, Chung A, Figueiredo MD, Valera MC, Palo RM, Camargo CHR. In vitro evaluation of endodontic irrigants activity. *Abstract IADR*. 2011,1397.

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

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

D'Arcangelo C, Di Nardo Di Maio F, Stracci N, Spoto G, Malagnino VA, Caputi S. Pulp-dissolving ability of several endodontic irrigants: a spectrophotometric evaluation. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007;20(2):381-6.

Endo M. Identificação de microrganismos e quantificação de endotoxinas em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical [Dissertação]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2011. 220p.

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

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

Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. Braz Dent J. 2007;18(4):294-298.

Ferreira CM, Da Silva Rosa OP, Torres SA, Ferreira FB, Bernardinelli N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. Braz Dent J. 2002;13(2):118-22.

Ferreira FBA, Avaliação antimicrobiana do tratamento endodôntico em dentes de cães submetidos à contaminação oral e à aplicação de endotoxina bacteriana [Tese]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru: Universidade de São Paulo, 2003. 209p.

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

Gomes BPFA. An investigation into the root canal microflora. PhD thesis. University of Manchester, UK 1995.

Gomes BPFA, Drucker DB, Liley JD. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J*. 1996;29(2):69-75.

Gomes BPFA, Pedroso J, Jacinto RC, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. *Br Dent J*. 2004a;15(1):30-35.

Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004b, Apr;19(2):71-6.

Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA., Ferraz CC, Souza-Filho FJ. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20(4):211-15.

Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod*. 2006;32(10):937-940.

Gomes BPFA, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. *J Endod*. 2007;33(9):1049-52.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto, RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Microbial Analysis of Canals of Root-filled Teeth with Periapical Lesions Using Polymerase Chain Reaction. *J Endod*. 2008;34(5):537-40.

Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod*. 2009 Oct;35(10):1350-3.

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

Grange JM, Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *R Soc Med*. 1990;83(3):159-160.

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.

Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol*. 2005 Aug;54(8):777-83.

Jung IY, Choi BK, Kum KY, Lee SJ, Lee CY, Park DS. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod*. 2000;26(10):599-604.

Jung ILY, Choi BK, Kum KY, Yoo YJ, Yoon TC, Lee SJ, Lee CY, Korea S. Identification of oral spirochetes at the species level and their association with other bacteria in endodontic infections. *J Endod*. 2001;92:329-34.

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;10(3):340-9.

Koo H et al. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. *Curr Microbiol*. 2000;41(3):192-6.

Kubo CH, Gomes APM, Jorge AOC. Isolamento de *Candida* em canais radiculares e verificação da sua sensibilidade a medicamentos utilizados na prática endodôntica. *Rev Odontol UNICID*. 1997;9(2):119-30.

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

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

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

Leonardo MR, Silva LAB, Leonardo RT. Tratamento de canal radicular em sessão única: crença vs Ciência. Em: Feller, C; Gorab, R. Atualização na clínica odontológica. São Paulo: Artes Médicas. 2000,29-57.

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 irrigation solution. J Endod. 1999 Mar;25(3):167-71.

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

Lin LL, Skrbner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. J Endod. 1992;18:625-627.

Lopes HP, Siqueira JR JF. Endodontia: biologia e técnica. Rio de Janeiro:MEDSI;1999.

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

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

Maekawa LE. Avaliação in vitro da ação de substâncias químicas auxiliares e medicações intracanaís sobre escherichia coli e sua endotoxina em canais radiculares [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP; 2007.106p.

Marchesan MA, Arruda MP, Silva-Sousa YTC, Saquy PC, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Análise morfológica da capacidade de limpeza promovida pela instrumentação rotatória, associada a soluções irrigantes, com limas de níquel-titânio em canais radiculares com achatamento mésio-distal. J Appl Oral Sci, 2003;11(1):55-9.

Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutical activity, Apidologie. 1995;26:83–99.

Martin MP, Pileggi R. A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion. Dental Traumatol. 2004;20(2):85-89.

Martinez MJ, Betancourt J, Gonzalez NA, Jauregui A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. J Ethnopharmacology. 1996;52(3):171-74.

Martinho FC. Análise microbiológica, quantificação de endotoxinas de dentes com infecções endodônticas primárias e suscetibilidade antimicrobiana [dissertação]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2007. 214p.

Martinho FC, Gomes BPFA. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2,5% sodium hypochlorite. J Endod. 2008 Mar;34(3):268-72.

Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. J Endod. 2010 Sep;36(9):1467-74.

Mattison GD, Haddux JE, Kehoe JC, Progulske-Fox A. The effect of *Eikenella corrodens* endotoxin on periapical bone. J Endod. 1987 Dec;13(12):559-65.

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

Menezes MM. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. Int J End, 2004;37(5):311-9.

Menezes MM, Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AOC, Valera MC. Concentração fungicida mínima das soluções de clorexidina e hipoclorito de sódio sobre *Candida albicans*. Cienc Odontol bras 2008 abr./jun;11(2):23-2.

Miller WD. An introduction to the study of the bacteria pathology of the dental pulp. Dent Cosmos. 1894;36:505-528.

Molina FP. Associação de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Escherichia coli* em canais radiculares e avaliação dos efeitos de extratos naturais sobre os microrganismos e endotoxinas [Dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP; 2008. 107p.

Nair PNR, Sjögreen U, Key G, Kahnberg K-E, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, a symptomatic human teeth with therapyresistant periapical lesions: a lonterm light and electron microscopic follow-up study. J Endod. 1990;16:580-8.

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

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

Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana Ac, Figueiredo JAP. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of clorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. Int E Endod J. 2004; 37(1):38-41.

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

Oliveira LD, Leão MVP, Carvalho CAT, Camargo CHR, Valera MC, Jorge AOC, et al. *In vitro* effects of calcium hydroxide and polymix B on endotoxins in root canals. J Dent. 2005 Feb;33(2):107-14.

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. Pesq Odontol Bras. 2005;19(supl):166.

Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Valera MC. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007 Jul;104(1):135-42.

Önçag 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.

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

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

Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, Bagg J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *Oral Clin Microbiol.* 2001;39(9):3282-9.

Roças IN, Siqueira Jr JF. Comparação da eficácia antimicrobiana in vivo em hipoclorito de sódio e clorexidina usados como irrigantes do canal radicular: um estudo de microbiologia molecular. *J Endod.* 2011;37(2), 143-50.

Santos MJ, Vianna LAC, Gamba MA. Avaliação da eficácia da pomada de própolis em portadores de feridas crônicas. *Acta Paul Enferm.* 2007;20(2):199-204

Scazzocchio F, D'Auria FD, Alessandrini D, Pantanella F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res.* 2005;151(4):327-33.

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

Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. [tribute to Dr.Herbert Schilder]. *J Endod.* 2006;32(4):293-5.

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

Senia ES, Marshall FJ, Rosen S. The solvent action of sodium hypochlorite on pulp tissue of extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1971;31(1):96-103.

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

Simões CC, Araújo DB, Araújo RPC. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2008;18(1):84-89.

Siqueira JR JF, Moraes SR, Lopes HP. Atividade antimicrobiana de águas sanitárias disponíveis no mercado nacional. *Rev Brás Odontol*. 1999;56(2):57-60.

Siqueira JF Jr., Rôças IN, Andrade AF, de Uzeda M. *Peptostreptococcus micros* in primary endodontic infections as detected by 16S rDNA-based polymerase chain reaction. *J Endod*. 2003;29(2):111-3.

Siqueira Jr JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97(1):85–94.

Subramanian K, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. *J Endod*. 2009;35(7):950-7.

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

Sundqvist G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps [Dissertation]. Sweden: University of Umea;1976.

Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. *J Endod*. 1989;15(1):13-9.

Swerts MSO, Costa AMDD, Firini JE. Associação de clorexidina e própolis atuando na inibição da aderência de *Streptococcus spp*. *Revista Internacional de Periodontia Clínica*. 2005;2:10-6.

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

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

Tanomaru JMO, 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.

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.

Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, et al. Bioactive constituents of Brazilian red própolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2006;3(2):249-54.

Uzel A, Sorkun K, Önçag Ö, Çogulo D, Gençay Ö, Salih B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res*. 2005;160(2):189-95.

Vafaie NM, Dobeck JM, Warbington ML, Dibart S, Harris M, Skobe Z. DNA analyses of bacteria in symptomatic endodontically treated teeth. *J Endod*. 1999;25(4):290.

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.

Valera MC, Maekawa LE, Silva KCG, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Camargo CHR, et al. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. *J Appl Oral Sci*. 2009;17(6):555-9.

Valera MC, Maekawa LE, Oliveira LD, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Avaliação da solução de clorexidina 2% e medicamentos sobre *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares. *Brazilian Dental Science*. 2009;12(3):38-43.

Valera MC, Rosa JA, Maekawa LE, Oliveira LD, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 2010;110(4):70-4.

Vianna M.E. Atividade antimicrobiana de alguns medicamentos utilizados como irrigantes e medicações intracanaís [dissertação] Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP; 2002. 293p.

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

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

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

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

Walker A. A definitive and dependable therapy for pulpless teeth. *J Am Assoc*. 1936;23:1418-24

Wang CY, Stachenko 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.

Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5,25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. J Endod. 2003 Sep;29(9):562-4.

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

Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Sagawa H. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canal of teeth with periapical pathosis. J Endod.1987;13(1):24-8.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro(a) Senhor(a)

Eu, Ana Claudia Carvalho Xavier, aluna de mestrado em Endodontia, no programa de pós-graduação da Odontologia Restauradora, na Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, portadora do CPF: 316.042.898-21, orientada pelo Prof. Dr. Claudio Antonio Talge Carvalho, Professor Doutor da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, portador do CPF 407.872.573-20, sou responsável pela pesquisa cujo título é **“Identificação de microrganismos, quantificação de endotoxinas e avaliação *in vivo* do extrato glicólico de própolis em dentes com necrose pulpar e lesão periapical”**.

O objetivo deste estudo é avaliar a eficácia de substâncias químicas auxiliares (solução de hipoclorito de sódio 1%, clorexidina gel 2% e extrato glicólico de própolis) e a medicação intracanal de hidróxido de cálcio, utilizadas durante o tratamento endodôntico (tratamento de canal) para eliminação de microrganismos e neutralização de endotoxinas, responsáveis pelos problemas endodônticos. Para esta avaliação, os microrganismos e suas endotoxinas presentes nos canais radiculares serão identificados e quantificados antes do tratamento endodôntico e após o uso das substâncias anteriormente citadas para, posteriormente, correlacioná-los com os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes.

O projeto não acarretará risco algum para o paciente uma vez que será realizado dentro das normas de biossegurança. Além disso, o protocolo de conduta adotado para o tratamento endodôntico desses pacientes é o mesmo já utilizado na prática clínica odontológica. O uso do extrato glicólico de própolis, como substância química auxiliar durante o preparo biomecânico, justifica-se por estudos prévios que comprovam sua ação antiinflamatória, anestésica,

antimicrobiana, e sua menor citotoxicidade quando comparado ao hidróxido de cálcio.

Se houver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, situada na Av. Engº Francisco José Longo, 777 – CEP 12245000, em São José dos Campos-SP, fone 012-3947-9076, e-mail *janete@fosjc.unesp.br* e comunique-se com a Coordenadora Profa. Dra. JANETE DIAS ALMEIDA. Informo que será garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela Colaboração.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Acredito ter sido esclarecido(a) a respeito das informações que leram para mim, descrevendo o estudo a ser realizado, e concordo em receber atendimento em consultório odontológico. Declaro conhecer os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e que minha participação não implicará em nenhuma despesa.

Nome/Responsável: _____

RG: _____ CPF: _____

Endereço completo: _____

Assinatura Responsável

Assinatura Pesquisador

APÊNDICE B – Ficha clínica do paciente**Nome:** _____**Data:** ____/____/____ **Telefone:** _____ **Dente:** _____**Endereço:** _____**HISTÓRIA MÉDICA**

Estado de saúde geral:			
Medicamento em uso:			
()Diabete	()Hepatite	()Coração	Pressão:
()Rim	()Alergia	()Úlceras	()Alcoolismo
()Doença mental	()Doenças sangue	()Sinusite	()Fígado
Problemas com anestesia:			
Outros:			

HISTÓRIA CLÍNICA

Queixa principal:			
TIPO DE	()Provocada	()Espontânea	()Intermitente
DOR:	()Localizada	()Difusa	()Contínua
Tomou analgésico ou outro medicamento?			
A dor cessa com analgésico?			
Dói a quanto tempo?			

EXAME CLÍNICO LOCAL

()Dente cariado	()Dente restaurado	()Edema	()Mobilidade
()Alteração de cor	() Probl. periodontal	()Oclusão	()Fístula
()Extrusão			

TESTES

()Frio	()Calor	()Choque térmico	()Percussão
Outros:			

EXAME RADIOGRÁFICO

Câmara pulpar:	Canal radicular:
Estruturas adjacentes:	Diagnóstico provável:
Tratamento indicado:	

TRATAMENTO RADICAL

Medida aparente do dente no RX inicial:					
Canal	Ponto de Referencia	Comp. real do instrumento	Diferença até o ápice	Comp. real do canal	Comprimento de trabalho C.T.:

Diâmetro do I.A.F. (nº do instrumento):	
Diâmetro do I.A.I. (nº do instrumento):	
Diâmetro cirúrgico do canal:	
Escalonamento até:	
Irrigação:	
Curativo de demora:	
Obturação (técnica e material):	Selamento:

DATA	TRATAMENTO
OBS. Pós-operatória:	
Terapêutica sistêmica:	

CONTROLES RADIOGRÁFICOS

Data	Observações
1º	
2º	
3º	
4º	

APÊNDICE C – VMGA III (Viability Medium Göteborg Ágar)

Meio de transporte preparado para permitir a sobrevivência de organismos anaeróbios estritos e aeróbios, sem que haja o crescimento dos mesmos. Utilizado para amostras pequenas, como as coletas realizadas nesta pesquisa. Se armazenado em recipiente hermético e protegido da luz, pode ser guardado por longos períodos. O azul de metileno presente em sua composição consome o oxigênio presente, mantendo o meio reduzido.

Componentes utilizados:

- a) Acetato de fenilmercúrio (Sigma, St. Louis, EUA);
- b) Glicerofosfato de sódio (Merck, Alemanha);
- c) CaCl anidro ou $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Ecibra, Santo Amaro - SP, Brasil);
- d) KCl (Synth, Diadema, São Paulo - SP, Brasil);
- e) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, St. Louis, EUA);
- f) NaOH (Dinâmica, Brasil);
- g) Ágar bacteriológico (Acumedia, EUA);
- h) Gelatina (DIFCO, Detroit, EUA);
- i) Triptose (DIFCO, Detroit, EUA), (Sigma, St. Louis, EUA);
- j) Thiotona ou Peptona (BBL, Cockeyville, EUA), (Biobrás, MG, Brasil);
- k) L-cisteína-dihidroclorito (Sigma, St. Louis, EUA);
- l) Ácido tioglicólico (Sigma, St. Louis, EUA).

Preparo:

Autoclavar previamente:

- a) *Eppendorfs* com 3 bolinhas de vidro (*Glass beads*). A quantidade de *Eppendorfs* equivale o volume do meio a ser preparado. Para o preparo de 250 mL de VMGA III deve-se autoclavar cerca de 130 frascos.
- b) 1 proveta de 50 ml e 2 provetas de 200 ml
- c) 3 frascos de 500 ml e 2 frascos de 1000 ml
- d) 4 funis
- e) 4 tubos de ensaio
- f) 4 espátulas
- g) 1 frasco de Becker pequeno
- h) pedaços de papel alumínio

Para o preparo de 250 ml do meio deve-se:

- a) Autoclavar frasco com água bi-destilada nos seguintes volumes:
137,5 ml; 75 ml; 300 ml; 2,5 ml; 250 ml; 25 ml.
- b) Preparar Solução de Sais de Estoque IV:
 - Solução 1 - Água bidestilada estéril 60 ml + Acetato de fenilmercúrio 0,1 g (não pesar com espátula de metal). Dissolver em banho-maria e deixar *overnight* a 56°C.
 - Solução 2 – Água bidestilada estéril 40 ml + Glicerofosfato de sódio 20 g. Dissolver aquecendo levemente na manta e deixar *overnight*.

- Solução 3 – Água bidestilada estéril 60 ml + CaCl anidro 0,24 g ou CaCl₂.6H₂O 0,32 g + KCl 0,84 g + MgSO₄.7H₂O 0,2 g.

Misturar as 3 soluções e resfriar em proveta graduada. Adicionar 40 ml de água bidestilada estéril até completar 200 ml. Adicionar 0,006 g de azul de metileno. Acondicionar em geladeira.

c) Preparar as soluções do VMGA III

- Solução A - 137,5 ml de água bidestilada estéril + 0,125 g de Triptose + 0,125 g de Triptona e Peptona. Dissolver com agitação e aquecimento na manta ou no microondas por 10 s.
- Solução B – 75 ml de água bidestilada estéril + 12,5 g de gelatina. A água bidestilada deve estar pré-aquecida. Aquecer em microondas por 10 s + 10 s + 10 s (total de 30 s). Deixar em banho-maria caso não derreta tudo.
- Solução C – 12,5 ml de água bidestilada estéril + 0,5 g de Ágar. Autoclavar a 121°C por 20 min, manter em banho-maria.
- Solução D - 2,5 ml de água bidestilada estéril + 0,125 g de L-cisteína. Autoclavar a 121°C por 20 min, manter em banho-maria.
- Solução E – 25 ml de solução salina estéril + 0,125 ml de ácido tioglicólico.

- d) Misturar as SOLUÇÕES A + B + C em frasco de 500 ml na manta. Resfriar a 45-50°C. Adicionar 25 ml da solução de sais de estoque azul IV. Adicionar a Solução E. Ferver a solução por 5 min até que a cor azul desapareça (fica amarelo). Resfriar em água morna sob fluxo de N₂. Levar para a câmara de anaerobiose. Adicionar a Solução D. Ajustar o pH 7,2 a 7,4 com a solução de NaOH + KOH, adicionando de 10 em 10 µl. Adicionar aos poucos. A solução de NaOH + KOH vai diminuir o pH.

- e) Colocar 1 ml da solução em cada eppendorf e deixar levemente aberto na cabine de anaerobiose. Passar parafilme para evitar qualquer tipo de contato com oxigênio e contaminação. Proteger da luz com papel alumínio.

APÊNDICE D - Brain Heart Infusion Ágar (BHI)

Meio inicialmente desenvolvido para o isolamento de patógenos. Quando adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro, permite o crescimento da maioria dos microrganismos fastidiosos.

Preparo:

- a) Adicionar 25 g do pó em 500 ml de água deionizada;
- b) Manter a suspensão em repouso por 10 min, agitar;
- c) Autoclavagem a 121°C por 15 min;
- d) Resfriar a 47°C e acrescentar 5% de sangue desfibrinado de carneiro;
- e) Misturar e distribuir nas placas de Petri.

Armazenagem:

Armazenar as placas de Petri por até 7 dias em temperatura de 4°C, preferencialmente no escuro.

APÊNDICE E - Fastidious Anaerobe Ágar (FAA),

Meio de cultura que favorece o crescimento de microrganismos anaeróbios.

Preparo:

- a) Adicionar 23 g do pó em 500 ml de água deionizada;
- b) Manter a suspensão em repouso por 10 min, agitar;
- c) Autoclavagem a 121°C por 15 min;
- d) Resfriar a 47°C e acrescentar 5% de sangue desfibrinado de carneiro;
- e) Enriquecimento do meio com:
 - Solução de Hemina - Dissolver 0,5 g de Hemina em 10 ml de hidróxido de sódio. Completar com água destilada até atingir 100 ml. Autoclavar a 121°C por 15 min. Deve-se adicionar 1 µl da solução a cada ml de meio produzido.
 - Solução de Vitamina K1 (1mg/ml) Menadione – Adicionar 0,1 g de Vitamina K1 em 100 ml de etanol absoluto. Adicionar 1 µl da solução a cada ml de meio produzido.

Armazenagem:

Armazenar as placas de Petri por até 7 dias em temperatura de 4°C, preferencialmente no escuro

APÊNDICE F – Tabelas

Tabela 13 - Valores de microrganismos obtidos em cada coleta (UFC/ml), nos meios FAA e BHI

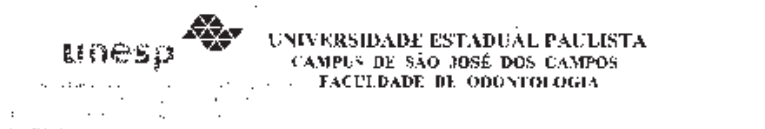
	FAA			BHI		
	1ªC	2ªC	3ªC	1ªC	2ªC	3ªC
NaOCl	5400000	200000	220	220	0	0
	2000	0	460	20	0	0
	14000	40	0	2960	0	0
	320	20	2880	200	0	500
	57600000	400000	340	0	0	0
	28000000	2000	720	80000	40	0
	8000	20	0	500	0	180
	0	0	0	0	0	0
	16200000	0	0	608000	0	0
	0	20	0	4960	180	0
CLX	0	20	0	2000	0	40
	3600000	4200000	500	0	0	400
	6200000	80	100	114000	0	60
	660	40	34000	0	0	60
	42000	40	380	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	1600000	0	0	32000	0	0
	8000	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
PRO	30000000	240	11000000	572000	0	306000
	5000	8000	1200	2000	0	0
	800000	200	4000	390000	2000	0
	1400000	0	0	0	0	0
	1080	4000	180	0	0	0
	169600000	120	0	180000000	0	0
	8560	198000	0	160000	18000	0
	1680000	12000000	0	1008000	280000	0
	84800000	44000	0	20	220	0
	604000	146000	0	114000	4000	0

Tabela 14 - Valores de microrganismos obtidos em cada coleta (UFC/ml), nos meios Mitis Salivarius, Sabaraud Dextrose, Enterococcosel e MacConkey

	Mitis			Sab			Ent			Mac		
	1 ^a C	2 ^a C	3 ^a C	1 ^a C	2 ^a C	3 ^a C	1 ^a C	2 ^a C	3 ^a C	1 ^a C	2 ^a C	3 ^a C
NaOCI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	80	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	16800	0	0	16800	0	0	8000	0	0	0	0	0
	8000	0	0	5640	0	0	1700	0	0	0	0	0
CLX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	460	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PRO	2540	0	10160	20	0	0	100	0	0	0	0	1800
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3020	20	0	2080	620	0	2400	0	0	0	80	0

Tabela 15 - Quantidade de endotoxina detectada em cada coleta e controle correspondente

GRUPO	1ª COLETA		2ª COLETA		3ª COLETA	
	U.E	PPC	U.E	PPC	U.E	PPC
NaOCl	394	4.88	5.61	3.8	36.5	3.47
	127	2.39	23.4	3.3	14.7	3.89
	3.62	4	1.79	3.3	2.08	3.17
	2.49	3.69	8.02	3.76	1.28	3.67
	102	3.88	6.32	2.77	0.834	4.73
	6.66	6.67	19.1	5.91	6.26	4.5
	154	4.84	16.8	2.55	4.76	6
	6.51	4.07	14.5	3.35	5.01	4.34
	710	2.6	12.3	3.5	0	4.94
	249	3.73	19	4.4	0.979	4.77
CLX	14.5	6.31	14.8	3.62	11.1	2.66
	4.43	4.69	11.9	1.86	1.92	3.08
	83.1	2.29	22	3.65	5.2	2.73
	29.1	5.81	90.3	4.95	5.52	5.7
	85.4	4.35	19.2	5.01	15.1	5.12
	146	4.21	20.1	5.25	0	4.58
	14.3	3.88	9.61	5.1	2	4.23
	198	5.32	34.4	4.37	0	5.16
	14.7	4.04	19.4	4.46	11.8	5.98
	66.7	4.25	54.4	5.48	5.8	5.15
PRO	84.4	2.87	3.33	2.45	0	5.27
	26.7	4.37	1.75	4	0.17	2.65
	13.9	4.34	3.02	5.15	0.24	2.23
	32.4	4.55	2.3	2.68	13.9	4.73
	11.7	5.19	7.94	2.95	2.31	4.48
	141	5.58	39.1	5.09	21	5.14
	889	5.11	24.5	7	16.9	4.3
	202	4.1	12	4.67	23.6	3.57
	84.4	5	41.5	4.17	13.8	4.49
	21.3	4.16	13.2	3.84	13.9	3.94

ANEXO – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa**CERTIFICADO**
Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **075/2009-PH/CEP**, sobre **"Identificação de microrganismos, quantificação de endotoxinas e avaliação in vivo do extrato glicólico de própolis em dentes com necrose pulpar e lesão periapical"**, sob a responsabilidade de **ANA CLAUDIA CARVALHO XAVIER**, tendo como orientador o Prof. Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, com seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 09 de novembro de 2009.

Profa. Adjunto JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora