

DANILO LAZZARI CIOTTI

**ANÁLISE DESCRITIVA DA APLICAÇÃO DE DOXICICLINA
NA SUPERFÍCIE RADICULAR DE DENTES HUMANOS,
POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA E ESPECTROSCOPIA DE DISPERSÃO DE
ENERGIA**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em
Periodontia.
Área de Clínica Odontológica.

Piracicaba
2004

DANILO LAZZARI CIOTTI

**ANÁLISE DESCRITIVA DA APLICAÇÃO DE DOXICICLINA
NA SUPERFÍCIE RADICULAR DE DENTES HUMANOS,
POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA E ESPECTROSCOPIA DE DISPERSÃO DE
ENERGIA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Área de Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Getúlio da Rocha Nogueira Filho

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Getúlio da Rocha Nogueira Filho

Prof. Dr. Márcio Zafalon Casati

Prof. Dr. Wilson Trevisan Jr

Suplente:

Prof. Dr. José Eduardo César Sampaio

Piracicaba
2004

Ficha Catalográfica

C494
a Ciotti, Danilo Lazzari.
Análise descritiva da aplicação de doxiciclina na superfície radicular de dentes humanos, por meio de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de dispersão de energia. / Danilo Lazzari Ciotti. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.
8, 56f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Getúlio da Rocha Nogueira Filho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Microscopia eletrônica de varredura. 2. Espectroscopia de emissão. 3. Raio X. I. Nogueira Filho, Getúlio da Rocha. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8–6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a meus pais
DARLY WANDERLEY CIOTTI e
MARIA LUIZA LAZZARI CIOTTI
Pelo apoio à minha formação
profissional e humana, pela paciência e
por abdicar de muitos sonhos para que
esse e muitos outros fossem realizados.
Minha eterna gratidão.

À minha eterna companheira
FERNANDA BUENO PIMENTA, pela
ajuda no desenvolvimento de meu
Mestrado, apoio ao meu sonho e
compreensão em todos os momentos
da minha vida.
Meu eterno amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por dar força nos momentos mais difíceis e por proporcionar os bons momentos da vida.

À Direção da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do Digníssimo Diretor Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho, e Vice-diretor Prof. Dr. Mário Fernando de Góes.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, Coordenador Geral dos Cursos de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP e ao Prof. Dr. Roger William Fernandes Moreira, Coordenador do Curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia: Antonio Fernando Martorelli de Lima (in memoriam), Getúlio da Rocha Nogueira Filho, Antonio Wilson Sallum, Enílson Antônio Sallum, Márcio Zafalon Casatti, Francisco Humberto Nocitti Jr..

Aos Colegas de Pós-Graduação: Cléverson Oliveira, Mariana Vogt, Daiane Peruzzo, Gabriela Cruz, Fabíola Miyauchi, Guilherme Zanata, Marcelo Carvalho, Bruno Benatti, Érica Del Peloso, Sandro Bittencourt, Saulo Cabral, Ivana Rodrigues, Robert Silva, Renato Vasconcelos, Luciana Machion, Patrícia Furtado, João Batista, Fernando Pinto, Poliana Duarte, Bruno Gurgel, Antonieta Cortês, Ângela Martins, Juliana Saldanha e Suzana Pimentel.

Ao Colega e Professor Dr. Julio Cesar Joly.

Ao Adriano e a Eliene, responsáveis pelo MEV, pois suas orientações no preparo das amostras e uso do microscópio de varredura foram fundamentais para o desenvolvimento dessa dissertação.

À Eliete e Shirley, secretárias do Departamento de Periodontia.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Martorelli de Lima, pela sua paciência no ensino, pelo exemplo da arte de ser Professor e pela sua dedicação à minha formação profissional. O grande responsável pela minha formação em Periodontia.

Meus sinceros agradecimentos.

Saudades.

Aos Profs. Drs. Getúlio da Rocha Nogueira Filho e Antonio Wilson Sallum, pela condução de minha orientação até o final do curso de Mestrado.

Obrigado.

Sumário

Resumo	1
Abstract	2
1 Introdução	3
2 Revisão de literatura	5
3 Proposição	19
4 Material e Métodos	20
5 Resultados	26
6 Discussão	36
7 Conclusão	42
Referências	43
Anexos	48

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar descritivamente, *in vitro*, o efeito da aplicação da solução de doxiciclina, com relação à remoção da “smear layer”, abertura de túbulos dentinários e exposição da matriz orgânica, com auxílio do microscópio eletrônico de varredura (MEV), e avaliar a adsorção dessa substância na superfície radicular por meio da espectroscopia de dispersão de energia (EDS). Foram utilizados 20 dentes humanos, caninos e incisivos superiores e caninos inferiores, extraídos por indicação periodontal, que receberam tratamento mecânico com curetas manuais e tratamento químico com solução de doxiciclina. As amostras foram fixadas, desidratadas e metalizadas para avaliação no MEV e EDS. Foram utilizadas 3 diferentes concentrações da solução de doxiciclina (25, 50 e 100 mg/ml) e uma solução controle (soro fisiológico), que foram aplicadas na superfície radicular em 3 diferentes tempos experimentais (1, 3 e 5 minutos). Os resultados mostraram que a solução de doxiciclina teve a capacidade de remoção de “smear layer”, abertura dos túbulos dentinários e exposição da matriz colágena. Foi observado ainda que a concentração da solução de doxiciclina de 100 mg/ml com 5 minutos de aplicação foi a mais efetiva nesses parâmetros, havendo tendência do aumento do efeito desmineralizante da solução com o aumento do tempo de aplicação e com o aumento da concentração. Com relação à adsorção da solução de doxiciclina na superfície radicular foi observado que apenas a concentração de 100 mg/ml aplicada durante 5 minutos mostrou adsorção na superfície radicular. Conclui-se que a solução de doxiciclina foi capaz de remover a “smear layer”, abrir os túbulos dentinários e expor a matriz colágena, e que existe relação entre direta entre o efeito desmineralizante e o tempo de aplicação e a concentração da solução. Com relação à adsorção da solução de doxiciclina na superfície radicular, ela ocorreu apenas no grupo 100 mg/ml, com 5 minutos de aplicação.

Abstract

In this “in vitro” study, doxycycline solution was used to promote smear layer removal. Twenty human upper incisors and canines and lower canines were removed due to severe periodontal breakdown. Teeth were processed according to established mechanical and chemical protocol. After scaling root planing, three different concentrations of doxycycline solution (25, 50 and 100 mg/ml) and control saline solution were used. Each concentration was applied for 1, 3 or 5 minutes on root surface samples. Scanning electron microscopy was used to analyze smear removal, opened dentinal tubules and exposition of dentin organic matrix. Energy dispersive spectroscopy (EDS) was used to evaluate doxycycline solution adsorption on root surfaces. Results showed that doxycycline solution was effective to promote smear removal, dentinal tubules opening and exposure of collagen matrix in all groups, however it was observed that results were time and concentration dependent. The magnitude of effects following 100 mg/ml doxycycline solution application was found to be more pronounced than the other concentrations. After 5 minutes of application, in all concentration groups, effects were more pronounced. The control solution did not produce smear layer removal. Doxycycline solution adsorption on root surfaces was found only at 100 mg/ml concentration and 5 minutes of application by the peak of chloride by EDS. It can be concluded that, *in vitro*, doxycycline solution reached the best results at 100 mg/ml during a period of 5 minutes, however concern showed rise to extrapolate this data clinically.

1 Introdução

A Periodontia preocupa-se com o tratamento das doenças periodontais e das seqüelas deixadas por ela há muito tempo, e após os experimentos de Register, em 1973, e Register & Burdick, em 1975 e 1976, que causaram um impacto muito grande no meio acadêmico, muitos trabalhos foram desenvolvidos na busca de uma solução que promovesse superfície radicular compatível com nova inserção periodontal. Os achados de Register mostraram a formação de novo cemento e osso ao redor dos defeitos periodontais criados pelos autores em animais de laboratório, após a desmineralização da superfície dental com ácido hidrocloreídrico. Esses resultados não conseguiram ser reproduzidos em humanos com a mesma eficácia, mas muitas pesquisas foram desenvolvidas para que se pudesse encontrar uma solução ideal a ser aplicada na superfície radicular, descontaminando-a e deixando-a apta a receber novo tecido de inserção. Serão abordados artigos de pesquisa envolvendo as soluções de tetraciclina e doxiciclina que buscaram uma solução ideal que pudesse atuar como tratamento eletivo.

O tratamento periodontal básico envolve procedimentos que visam a eliminação do agente etiológico da doença e remoção dos fatores que possam retê-lo. A instrumentação periodontal é o procedimento mecânico adequado para esse fim, e tem como objetivo a obtenção de superfície radicular lisa, vítrea, plana, livre de depósitos bacterianos e biocompatível (Leknes & Lie, 1991). No entanto, a instrumentação traz o inconveniente de deixar uma camada residual composta por cemento necrótico, biofilme dental, cálculo e produtos citotóxicos, chamada de "smear layer" (Polson *et al.*, 1983; Pashley, 1984; Foster *et al.*, 1993). Essa camada pode interferir com o processo de adesão e estabilidade do coágulo sangüíneo e das células envolvidas no processo de cura da ferida cirúrgica (Terranova *et al.*, 1986). Muitos estudos e diversos tipos de substâncias foram desenvolvidos para a remoção dessa camada, tais como o ácido hidrocloreídrico (Register, 1973), ácido cítrico (Register & Burdick, 1975), ácido fosfórico (Passanezi *et al.*, 1979), EDTA (Boyko *et al.*, 1980), tetraciclina (Wikesjö *et al.*, 1986) e a doxiciclina (Demirel *et al.*, 1991). A doxiciclina, sendo derivada da

tetraciclina, tem como vantagem remover a “smear layer”, abrir os túbulos dentinários, expor a matriz orgânica, remover endotoxinas, liberar possíveis fatores de crescimento existentes na matriz orgânica do cimento ou dentina, favorecendo o processo de regeneração periodontal, além de adsorver na superfície radicular e ser liberada posteriormente. Também possui o grande atrativo de ter efeito inibidor da colagenase, que é responsável por grande parte da destruição periodontal (Demirel *et al.*, 1991; Madison & Hokett, 1997; Barkhordar *et al.*, 1997).

Um dos primeiros estudos sobre a utilização de tetraciclina foi realizado por Wikesjö *et al.* em 1986. Os autores encontraram resultados muito promissores referentes aos efeitos de remoção da “smear layer”, bem como da adsorção da tetraciclina na superfície radicular, seus efeitos antimicrobiano e de inibição da colagenase, sendo este último benéfico principalmente quando comparado a agentes como EDTA e o ácido cítrico e fosfórico, que não têm essa capacidade.

O efeito antibacteriano da aplicação tópica de doxiciclina sobre a raiz de dentes extraídos por doença periodontal foi estudado por Demirel *et al.* em 1991. Nesse estudo, foram utilizadas diferentes concentrações e tempos de aplicação da solução de doxiciclina sobre espécimes dentais que foram colocados posteriormente em placas de Petri contendo 3 espécies bacterianas: *Actinomyces viscosus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*. Os autores avaliaram a inibição do crescimento bacteriano pela solução de doxiciclina, e concluíram que a concentração de 100 mg/ml mostra efeito inibidor residual sobre as três espécies bacterianas, com alta substantividade na superfície radicular.

2 Revisão da Literatura

Neste capítulo serão abordados artigos envolvendo o uso das soluções de tetraciclina e doxiciclina, como coadjuvantes ao tratamento periodontal.

Adsorção na superfície radicular

Em 1983, Baker *et al.* avaliaram a adsorção da tetraciclina e seus derivados na superfície radicular, e a posterior liberação e inibição do crescimento de alguns microorganismos. Os antibióticos avaliados foram a minociclina, oxitetraciclina, clorotetraciclina, tirotricina, vancomicina, espiramicina, estreptomicina e actinobolina. Os microorganismos utilizados pelos autores foram: *A viscosus*, *A naeslundii* e *E mutans*. Os resultados mostraram que as tetraciclinas (oxitetraciclina e clorotetraciclina) têm maior capacidade de adsorção ao esmalte do que a espiramicina, e que as tetraciclinas e a minociclina parecem ser promissoras na inibição da formação da placa bacteriana.

Wikesjö *et al.*, em 1986, avaliaram a adsorção, substantividade e liberação da tetraciclina em espécimes de dentina obtidos de dentes bovinos. As amostras foram imersas em solução contendo tetraciclina em diferentes concentrações: 10, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 mg/ml, durante 5 minutos. A adsorção e a liberação de tetraciclina foram avaliadas por contagem de elementos radioativos, pela técnica da cintilografia, com o uso de tetraciclina marcada radioativamente. Os autores avaliaram também a inibição de crescimento bacteriano nos espécimes, colocando-os em um recipiente contendo *Actinomyces naeslundii*, além de avaliarem as alterações morfológicas que a tetraciclina poderia promover na superfície radicular. Os resultados mostraram que a tetraciclina começou a ser adsorvida em quantidade satisfatória a partir da concentração de 50 mg/ml e que sua liberação se manteve em níveis também satisfatórios a partir dessa concentração por um período de 48 horas. Os autores concluíram que a tetraciclina remove “smear layer” e expõe túbulos dentinários quando os espécimes foram analisados em microscopia eletrônica de varredura. As superfícies tratadas serviram como depósitos para liberação de antibióticos

ajudando na descontaminação da superfície radicular, e como substrato para a nova inserção periodontal.

Em 1992, Morrison *et al.* estudaram *in vivo*, em MEV e EDS, as características da superfície radicular e a substantividade de fibras de tetraciclina (Actisite) colocadas em bolsas periodontais com profundidade de sondagem maior que 4 mm. Os autores utilizaram 32 dentes humanos indicados para extração que foram divididos em 4 grupos que receberam os seguintes tratamentos: grupo 1- controle, sem nenhum tratamento; grupo 2- apenas raspagem; grupo 3- apenas colocação de fibra de tetraciclina; grupo 4- raspagem e colocação de fibra de tetraciclina. Os dentes foram mantidos em seu local durante 10 dias e após foram extraídos e preparados para análise em microscopia. Os grupos 3 e 4 mostraram redução na microflora e microorganismos não viáveis, além de adsorção de tetraciclina na superfície radicular, devido ao pico de cloro, que foi utilizado como marcador, que aparece quando o feixe de raios-x foi direcionado em cristais presentes na superfície radicular. Ocorreu também desmineralização da superfície radicular, com exposição de túbulos dentinários e penetração da tetraciclina em profundidade (cerca de 10 μ m).

Em 1993, Christersson *et al.* avaliaram a adsorção e posterior liberação do cloridrato de tetraciclina quando irrigado em bolsas periodontais de dentes humanos. O estudo foi dividido em 2 experimentos, sendo o 1º conduzido da seguinte maneira: 4 pacientes foram tratados com instrumentação periodontal e aplicação de tetraciclina em um hemiarco, e no outro hemiarco apenas aplicação de tetraciclina. Os parâmetros utilizados nesse experimento foram: presença da tetraciclina no fluido crevicular e inibição de bactérias em meio de cultura. Os resultados mostraram que não houve diferença entre os grupos e que pode ser observada a liberação de tetraciclina acima do nível terapêutico por mais de 1 semana. Já no outro experimento, com 11 pacientes, foi instituído tratamento periodontal antes do início do tratamento com as soluções de tetraciclina ou solução fisiológica. Após o tratamento periodontal, 54 dentes contralaterais com bolsas residuais com profundidade de sondagem maior que 5 mm pós tratamento,

receberam aleatoriamente irrigação subgengival com tetraciclina 100 mg/ml ou irrigação com solução fisiológica como controle. Os parâmetros clínicos avaliados foram: profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, índice de placa e índice gengival, após 3 e 6 meses. Os resultados mostraram que no hemiarco onde houve aplicação de tetraciclina ocorreu ganho estatisticamente maior quando comparado ao outro lado após 3 e 6 meses de reavaliação. Os autores concluíram que a tetraciclina tem boa substantividade na superfície radicular podendo ser mantida por mais de uma semana e quando associada à terapia mecânica poderá trazer resultados ainda mais promissores.

Reparo periodontal

Em 1986, Terranova *et al.* avaliaram a modulação do reparo periodontal pela laminina e fibronectina em superfícies previamente tratadas com solução de tetraciclina, ácido cítrico ou controle. Os autores utilizaram amostras de dentina de dentes bovinos que foram inseridas em recipientes que continham culturas de fibroblastos e células epiteliais, após desmineralização em solução de tetraciclina com as concentrações variando entre 0 e 200 mg/ml, ácido cítrico ou controle (sem aplicação de nenhuma substância). Foram avaliados o crescimento e inserção das células sobre a superfície radicular e a contagem do número de células. Os resultados mostraram que as superfícies tratadas com tetraciclina aumentaram a adesão de fibronectina que, por sua vez, estimula a inserção e crescimento de células precursoras do reparo, inibindo a inserção e crescimento de células epiteliais. Com base nesses achados os autores concluíram que o uso de tetraciclina e fibronectina acelerou e melhorou o processo normal de reparo de tecidos moles e duros do periodonto, sendo que essa modulação bioquímica da resposta é importante para aplicação nos tratamentos que envolvam a utilização de enxertos e implantes.

Em 1988, Frantz e Polson propuseram a avaliação da interação tecidual de espécimes dentais desmineralizados por diferentes concentrações de tetraciclina. Os autores utilizaram dentes humanos sadios que foram extraídos por

diversas razões e receberam tratamento químico com tetraciclina durante 5 minutos nas concentrações de 100 e 200 mg/ml, e um grupo controle que não recebeu nenhum tratamento. As amostras foram implantadas na região subcutânea de ratos que foram sacrificados após 1 e 10 dias. Análises histológica e histométrica foram feitas observando-se o número de células, comprimento de tecido conjuntivo formado e avaliação das fibras conjuntivas. Os resultados mostraram que os espécimes tratados com tetraciclina, independente da concentração poderiam prover um substrato para o aumento no número de células de inserção maior que os espécimes da solução controle. Entretanto, este crescimento tecidual não resultou em novo tecido conjuntivo de inserção.

Em 1990, Bal *et al.* avaliaram a formação do coágulo em raízes de dentes com doença periodontal após aplicação de diversos tipos de substâncias para biomodificação radicular. Foram utilizados 6 dentes humanos extraídos por indicação periodontal e divididos em 2 grupos. No primeiro grupo, a superfície radicular foi dividida em 3 áreas de tratamento: a) ligamento periodontal intacto, b) raspagem, e c) raspagem e aplicação de ácido cítrico 1%. O outro grupo recebeu o mesmo tratamento mas o agente biomodificador foi a tetraciclina 50 mg/ml. Após o tratamento de acordo com cada área de interesse, os dentes foram reimplantados no alvéolo, divididos em 3 grupos de acordo com o tempo de manutenção no alvéolo: menos de 5 segundos, 1 minuto ou 3 minutos, para avaliar-se a formação do coágulo inicial. Os espécimes foram preparados para análise em microscopia eletrônica de varredura, segundo protocolo proposto pelos autores. As conclusões foram que as áreas que receberam instrumentação periodontal, associado com a aplicação de tetraciclina, tiveram a formação de coágulo mais rápida, devido provavelmente à propriedade de desmineralização e ação antibacteriana do cloridrato de tetraciclina.

Para avaliar histologicamente a formação de nova inserção após aplicação de agentes desmineralizantes, Alger *et al.*, em 1990, aplicaram *in vivo* cloridrato de tetraciclina e fibronectina em raízes de 18 dentes humanos com doença periodontal. Os dentes foram divididos em 3 grupos, sendo que o grupo

controle recebeu apenas instrumentação periodontal com acesso cirúrgico; o grupo 2 recebeu cloridrato de tetraciclina 100 mg/ml (pH=2) durante 3 minutos com acesso cirúrgico, e o grupo 3 recebeu cloridrato de tetraciclina 100 mg/ml por 3 minutos seguido de fibronectina 10 mg/ml durante 5 minutos com acesso cirúrgico. Após 90 dias, os dentes foram extraídos em bloco com manutenção de um colar gengival e preparados para análise em microscopia ótica. O grupo controle apresentou apenas epitélio juncional longo, enquanto que o grupo 2 apresentou pequena formação de nova inserção e novo cemento, e o grupo 3 apenas reinserção, piorando os resultados da biomodificação radicular. Os autores concluíram que a aplicação da solução de tetraciclina trouxe poucos benefícios, ao passo que a fibronectina piorou os resultados.

Em 1993, Dyer *et al.* avaliaram e compararam o uso de 2 biomodificadores radicular, ácido cítrico e cloridrato de tetraciclina, associados à regeneração tecidual guiada. Foram utilizados 8 cachorros com doença periodontal natural que receberam tratamento periodontal convencional e após 4 semanas receberam tratamento cirúrgico reconstrutivo com o uso de membrana de politetrafluoroetileno expandido, associado ou não à biomodificação radicular. O ácido cítrico (pH= 1) foi aplicado durante 3 minutos na superfície radicular, enquanto que o cloridrato de tetraciclina 100 mg/ml (pH= 1,7) foi aplicado durante 5 minutos. A membrana foi removida após 4 semanas e rigoroso regime de profilaxia foi instituído. Os animais foram sacrificados após 4 meses e as análises histológica e histométrica foram feitas. Os resultados mostraram formação de cemento na superfície radicular com inserção de fibras colágenas em ambos tratamentos. Quando não se associou a biomodificação radicular à regeneração tecidual guiada, ocorreu uma maior formação de fibras colágenas inseridas. Os autores concluíram que a regeneração tecidual guiada promoveu formação de tecido conjuntivo de inserção e tecido ósseo, e que a biomodificação radicular não trouxe melhora significativa à regeneração.

Em análise em microscopia eletrônica de varredura, Delazari *et al.* em 1999, estudaram o efeito da aplicação de solução de cloridrato de tetraciclina na

concentração de 50mg/ml (pH= 1,6) em 22 dentes humanos com doença periodontal. Os dentes em questão foram tratados com instrumentação periodontal seguido da aplicação do antimicrobiano durante 4 minutos com movimentos de brunimento. As amostras foram divididas nos seguintes grupos: controle 1 (4 dentes) - instrumentação periodontal: teste 1 (6 dentes) - instrumentação periodontal associada à aplicação de tetraciclina durante 4 minutos: controle 2 (6 dentes) - instrumentação periodontal associada à tripsina por 20 minutos após extração: teste 2 (6 dentes) - instrumentação periodontal associada à aplicação de tetraciclina durante 4 minutos e tripsina por 20 minutos após extração. Após extração e tratamento de acordo com os grupos, os dentes foram lavados com solução fisiológica e reinsertados no alvéolo com reposição do retalho durante 20 minutos para a formação do coágulo. Os resultados mostraram remoção da “smear layer” com a aplicação da solução de tetraciclina na superfície radicular, mas com relação ao processo de reparo imediato - formação da rede de fibrina - não houve diferença entre a aplicação da solução de tetraciclina ou não.

Remoção da smear layer

Hanes *et al.*, em 1991, avaliaram a morfologia da dentina bovina após fratura do espécime para remoção do cimento e conseqüente exposição da dentina. Os espécimes foram divididos em quatro grupos, de acordo com o tratamento: 1) fratura apenas; 2) fratura e raspagem; 3) fratura, raspagem e imersão em ácido cítrico (pH= 1) durante 5 minutos; 4) fratura, raspagem e imersão em tetraciclina (pH= 3,2) durante 5 minutos. Após o tratamento químico, os espécimes foram preparados para análise em MEV, de acordo com protocolo estabelecido pelos autores. Os resultados mostraram que o ácido cítrico foi mais efetivo na remoção da “smear layer” e exposição dos túbulos dentinários do que a tetraciclina. Sendo assim, os autores sugerem que a concentração de tetraciclina deva ser maior para que haja maior efetividade da ação desmineralizante.

Em 1993, Lafferty *et al.* compararam as características da superfície de raízes de dentes com doença periodontal extraídos após aplicação de cloridrato

de tetraciclina ou ácido cítrico. Foram utilizados 30 dentes de 22 pacientes que receberam instrumentação manual e com instrumentos rotatórios, e posterior aplicação de tetraciclina e ácido cítrico durante 5 minutos. Como controle os dentes receberam apenas instrumentação periodontal sem aplicação de nenhum agente desmineralizante. Após esse procedimento as amostras foram preparadas para análise em microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que no grupo controle não ocorreu exposição de túbulos dentinários, matriz colágena ou remoção de “smear layer”, e que as duas substâncias avaliadas no experimento apresentaram o mesmo comportamento. Os autores concluíram que a aplicação de uma ou outra substância pode ser baseada em decisão clínica e que novos estudos são necessários para a avaliação desses agentes.

Em 1993, Chaves *et al.* avaliaram o efeito da aplicação de ácido cítrico (pH= 1) em 40 dentes humanos periodontalmente comprometidos, que foram extraídos e divididos em 4 grupos com 10 dentes cada que receberam os seguintes tratamentos: 1) sem nenhum tratamento; 2) aplicação de ácido cítrico apenas; 3) raspagem apenas; 4) raspagem e ácido cítrico. Como segundo controle os autores utilizaram 10 dentes humanos sem doença periodontal, que não receberam tratamento. Os dentes foram preparados para análise em MEV. O grupo controle sem doença periodontal apresentou cemento na superfície e feixes de fibras colágenas, ao passo que o grupo de dentes controle com doença periodontal sem nenhum tratamento mostrou superfície com presença de cálculo e alguns microorganismos cocóides. Já o grupo que recebeu tratamento com ácido cítrico apenas não mostrou presença de microorganismos, mas presença de cálculo e cemento. O grupo que recebeu tratamento com raspagem mostrou superfície lisa, plana, regular, com marcas de passada de cureta e presença de smear layer cobrindo toda a superfície. O grupo que recebeu tratamento com raspagem e ácido cítrico mostrou superfície plana e lisa, sem smear layer, com túbulos expostos e desmineralização peri e intertubular. Os autores concluíram que o ácido cítrico remove smear layer, expõe túbulos dentinários e fornece um sítio para proliferação do tecido conjuntivo.

Trombelli *et al.* avaliaram, em 1994, em microscopia eletrônica de varredura, as características morfológicas do cimento e dentina de dentes humanos extraídos sem doença periodontal, que foram instrumentados manualmente e com instrumento rotatório, e receberam tratamento com tetraciclina em diferentes tempos de aplicação e concentrações da solução. Os grupos foram divididos em grupo com cimento e grupo com dentina, do seguinte modo: G1- aplicação de solução salina durante 1 minuto; G2- aplicação da solução de tetraciclina à 62,5 mg/ml durante 1 minuto; G3- aplicação da solução de tetraciclina à 62,5 mg/ml durante 4 minutos; G4- aplicação da solução de tetraciclina à 125 mg/ml durante 1 minuto; G5- aplicação da solução de tetraciclina à 125 mg/ml durante 4 minutos. Após o tratamento químico os dentes foram preparados para análise em microscopia eletrônica de varredura. Os resultados obtidos foram: cimento: G1- superfície irregular e amorfa sem fibras ou túbulos; G2, G3, G4 e G5- superfície livre de debris com poucos túbulos expostos, aparecendo riscos de curetas, e a maioria da superfície com aparência fibrilar não homogênea. O tempo e a concentração parecem não influenciar no grau de desmineralização. Na superfície dentinária tivemos os seguintes resultados: G1- superfície amorfa, irregular e com túbulos dentinários cobertos; G2 e G4- pequena quantidade debris, ocluindo a entrada de túbulos; G3 e G5- superfície regular e lisa, com túbulos abertos em formato de funil, e exposição da matriz colágena. Os autores concluíram que a concentração de tetraciclina parece não influenciar nos resultados, mas o tempo de aplicação leva à alterações morfológicas.

Trombelli *et al.*, em 1995, avaliaram, em microscopia eletrônica de varredura, as características do cimento e dentina de dentes humanos recém extraídos devido à doença periodontal. Os espécimes receberam instrumentação periodontal e, dependendo do grupo experimental, aplicação da solução de cloridrato de tetraciclina nas concentrações de 10 mg/ml (pH= 3) e 100 mg/ml (pH= 2) e solução salina (controle), durante 1 ou 4 minutos, esfregando suavemente a solução na superfície radicular com auxílio de uma bolinha de algodão. Após preparo para análise em microscopia eletrônica de varredura, e

avaliação dos resultados, os autores observaram presença de “smear layer” irregular e amorfa no grupo controle (solução salina), enquanto que nos grupos tratados com cloridrato de tetraciclina durante 1 minuto a superfície estava livre de debris, mas com túbulos dentinários parcialmente ocluídos. Os grupos tratados com cloridrato de tetraciclina durante 4 minutos apresentaram uma superfície com textura fibrilar devido à exposição da rede de fibras colágenas peri e intertubular. Os autores concluíram que o cloridrato de tetraciclina removeu a “smear layer” e expôs a matriz colágena, independente da concentração da solução, mas dependente do tempo de aplicação, tanto na dentina quanto no cimento.

Em 1997, Sterrett *et al.* avaliaram o efeito do tempo de aplicação e da concentração da solução de cloridrato de tetraciclina na desmineralização da dentina. Os autores utilizaram 12 espécimes provenientes de dentes bovinos que tiveram depressões preparadas na superfície radicular até exposição da superfície dentinária. A solução foi gotejada no local preparado, sendo utilizadas as seguintes concentrações: 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150 mg/ml, durante 1, 3 ou 5 minutos. O controle foi a solução de ácido cítrico 30%. Os resultados mostraram que nas concentrações 0, 25 e 50 mg/ml não houve diferença entre os tempos de aplicação, ao passo que nas concentrações maiores houve diferença nos tempos de aplicação. Os autores concluíram que em maiores concentrações e tempos de aplicação ocorreu maior desmineralização da superfície dentinária, mostrando dependência tanto da concentração quanto do tempo de aplicação no efeito desmineralizante.

Em 1997, Madison e Hokett compararam a capacidade de remoção da “smear layer” e de exposição da matriz colágena por diversos tipos de tetraciclinas em diferentes tempos de aplicação. Foram utilizadas as seguintes tetraciclinas: cloridrato de tetraciclina (250 mg/ml - pH= 1,6), cloridrato de doxiciclina (100 mg/ml - pH= 2,2), minociclina (100 mg/ml - pH= 3,8), sumicina (25 mg/ml - pH= 4,4) e solução salina (pH= 5,1), durante 0.5, 1, 3, 5 e 10 minutos. Foram utilizadas 82 amostras de dentes humanos extraídos por doença periodontal que foram instrumentadas e receberam aplicação das substâncias nos tempos de aplicação

definidos. Os resultados mostraram que a superfície que recebeu tratamento com solução salina apresentou-se não nítida, amorfa e com debris de “smear layer”, além de marcas de cureta. A tetraciclina foi a solução que apresentou melhores resultados com maior remoção da “smear layer” e exposição dos túbulos dentinários, a partir de 30 segundos de aplicação. A doxiciclina e a minociclina apresentam um efeito menor em relação à tetraciclina, mas melhores que a sumicina e do que a solução salina.

Barkhordar *et al.*, em 1997, avaliaram, *in vitro*, a remoção da smear layer pela doxiciclina em canais radiculares de raízes palatinas de dentes humanos. Foram utilizadas 48 raízes palatinas que receberam instrumentação endodôntica convencional e após irrigação com soluções irrigadoras, conforme os grupos: G1- solução salina e EDTA 15%; G2- solução salina e doxiciclina 25 mg/ml; G3- solução salina e doxiciclina 50 mg/ml; G4- solução salina e doxiciclina 100 mg/ml; G5- hipoclorito e EDTA 15%; G6- hipoclorito e doxiciclina 25 mg/ml; G7- hipoclorito e doxiciclina 50 mg/ml; G8- hipoclorito e doxiciclina 100 mg/ml. A seguir, as raízes foram seccionadas longitudinalmente e as duas metades foram avaliadas em microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que a doxiciclina 100 mg/ml associada ao hipoclorito foi mais eficiente que os outros grupos. Os autores concluíram que a solução de doxiciclina pode ser utilizada como irrigante endodôntico muito efetivo.

Em 1998, Bergenholtz e Babay compararam, *in vitro*, a textura da superfície radicular de dentes humanos extraídos devido à doença periodontal após instrumentação periodontal ultra-sônica e aplicação de diversos tipos de agentes biomodificadores. Os autores aplicaram ácido cítrico (pH= 1,0), cloridrato de tetraciclina (pH= 1,8), EDTA (pH= 7,8) e solução salina, observando o tempo (10, 30, 40 e 180 segundos) e o modo de aplicação (contato ou brunimento). Os resultados mostraram que o tempo e o modo de aplicação interferem na superfície radicular. O ácido cítrico, o EDTA e o cloridrato de tetraciclina quando aplicados pela técnica do brunimento por 30 ou 40 segundos removeram mais “smear layer”

e expuseram mais túbulos dentinários do que a solução controle, mas o ácido cítrico necessita de um tempo menor para levar ao mesmo efeito.

Isik *et al.*, em 2000, avaliaram em microscopia eletrônica de varredura a morfologia da superfície radicular após aplicação da solução de cloridrato de tetraciclina. Foram utilizados 12 molares humanos inclusos, os quais foram extraídos e armazenados em água destilada após remoção dos tecidos moles aderidos à superfície radicular. Foi utilizada a região média de cada raiz, num total de 48 amostras que foram divididas em 8 grupos de acordo com as concentrações: 0, 10, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 mg/ml. O tempo de aplicação em cada grupo foi de 1, 3 e 5 minutos, com auxílio de uma bolinha de algodão, com movimentos de brunidura, que foi trocada a cada 30 segundos. Os resultados mostraram que nas concentrações de 0, 10 e 25 mg/ml não há exposição de matriz colágena e não há diferença entre os 3 períodos de tempo de aplicação. Nas concentrações entre 50 e 125 mg/ml ocorreu remoção da “smear layer” e abertura dos túbulos dentinários, independente do tempos de aplicação. Os autores concluíram que a desmineralização depende da concentração utilizada, mas não é dependente do tempo de aplicação.

Em 2001, Sampaio avaliou a eficiência da solução de cloridrato de tetraciclina na remoção da “smear layer” após instrumentação periodontal. O autor utilizou 150 amostras de dentes humanos extraídos por diversas razões. Os espécimes foram preparados com broca para remoção do cimento e 50 movimentos de raspagem com cureta manual e tratamento com diferentes concentrações da solução (0, 10, 20, 30, 40 e 50%), tempos (1, 2 ou 3 minutos) e modos (aplicação tópica ou fricção) de aplicação da solução. O autor obteve como resultados pela análise das fotomicrografias e com o uso do Índice de Sampaio de remoção de “smear layer” que o grupo controle produziu o pior resultado da desmineralização e que o grupo teste com concentração de 10% foi estatisticamente superior às outras concentrações. Quanto ao modo de aplicação a fricção trouxe melhores resultados.

Recentemente em 2002, da Mata também avaliou a eficiência da solução de cloridrato de tetraciclina com relação aos mesmos parâmetros de Sampaio em 2001. A metodologia para o preparo das amostras foi semelhante, mas a concentração da solução de tetraciclina foi de 50, 125, 250, 500 mg/ml, em três tempos diferentes (1, 2 ou 3 minutos), e os modos de aplicação foram contato ou fricção. Após a aplicação da solução nos diferentes grupos de interesse, foi feito o preparo das amostras para análise em microscopia eletrônica de varredura, e foram feitas fotomicrografias que foram analisadas de acordo com o Índice de Sampaio modificado. Os autores concluíram, com base nos resultados obtidos, que as concentrações de tetraciclina em 125 e 250 mg/ml mostraram maior efetividade na remoção da smear layer, independente do modo e do tempo de aplicação. Concluíram também que a remoção da smear layer não foi tempo dependente, e que o modo de aplicação por fricção trouxe melhores resultados.

Inibição da ação da colagenase e da reabsorção óssea

Grevstad, em 1993, avaliou o uso sistêmico de doxiciclina em ratos durante 10 dias, após diversos procedimentos periodontais cirúrgicos. Os ratos foram divididos em 3 grupos de acordo com o tipo de tratamento: gengivectomia; retalho periodontal para acesso; e retalho periodontal para acesso associado ao uso sistêmico de doxiciclina durante 10 dias. Foram feitos cortes histológicos para avaliar-se a perda óssea. Os resultados mostraram que no grupo em que houve associação entre a doxiciclina e o acesso cirúrgico não houve perda óssea após a cirurgia, ao passo que o grupo que recebeu tratamento de acesso cirúrgico sem doxiciclina, a reabsorção da crista óssea aconteceu em todas as amostras. O grupo que recebeu o tratamento com gengivectomia, por não haver exposição do tecido ósseo não apresentou perda óssea pós-cirúrgica. Os autores concluíram que a doxiciclina sistêmica tem ação positiva, prevenindo a reabsorção óssea após o acesso cirúrgico.

Hanemaaijer *et al.*, em 1998, avaliou a inibição das metaloproteinases da matriz (MMP) pela doxiciclina e tetraciclina modificadas em cultura de células

endoteliais humanas. Os autores relataram que a doxiciclina apresenta efeito inibidor da colagenase superior ao das tetraciclinas modificadas, podendo regular o efeito dessa proteína na destruição periodontal, e conseqüentemente diminuir a perda de tecidos de suporte periodontal.

Modo de aplicação do agente desmineralizante

Em 1992, Labahn *et al.* avaliaram o efeito do modo de aplicação do ácido cítrico e da tetraciclina na superfície radicular. Foram utilizados dentes humanos sem doença periodontal e que receberam tratamento químico com tetraciclina, ácido cítrico e como controle água destilada. Cada grupo foi dividido em aplicação passiva (gotejamento) e ativa (brunimento), com o tempo de aplicação variando entre 30, 60, 120 e 240 segundos, após raspagem da superfície radicular. Os resultados mostraram que tanto o ácido cítrico quanto a tetraciclina removem “smear layer”, ao passo que o ácido cítrico mostrou variação nos resultados na abertura de túbulos com o aumento do tempo de aplicação. As duas substâncias não mostraram diferenças quanto ao modo de aplicação ativo ou passivo. Os autores concluíram que o ácido cítrico traz maiores alterações na superfície radicular e que não houve diferenças entre as maneiras de aplicação das soluções.

Isik *et al.*, em 1997, avaliaram o efeito *in vitro* de diferentes técnicas de aplicação de tetraciclina na superfície radicular após remoção do cimento com instrumentos rotatórios. Os autores compararam o efeito das diferentes técnicas na remoção da smear layer e exposição de túbulos dentinários, sendo as técnicas: gotejamento, imersão, brunimento vigoroso, ou aplicação com pincel da solução de tetraciclina 0,5% mg/ml durante 5 minutos. Como controle os autores utilizaram apenas os fragmentos radiculares sem tratamento químico. Os resultados mostraram que no grupo controle havia muita “smear layer”, sem exposição dos túbulos dentinários, e que o grupo tratado com brunimento mostrou superfície praticamente livre de “smear layer” e com presença de fibrilas colágenas e túbulos expostos.

Efeito antimicrobiano

Yamalik *et al.*, em 1991, em estudo *in vivo*, avaliaram o efeito antimicrobiano do uso sistêmico da doxiciclina, em pacientes com doença periodontal avançada. Os pacientes selecionados não receberam qualquer tipo de tratamento periodontal, apenas o uso de doxiciclina. Antes do início do experimento, os autores coletaram amostra de placa dos pacientes, e sete dias após o uso do antibiótico coletaram novamente amostras de placa. Os resultados mostraram queda acentuada na porcentagem de espiroquetas, bastonetes móveis e não móveis, que freqüentemente estão relacionados com a doença periodontal. Contrariamente, houve aumento no número de cocos, que normalmente estão associados com saúde periodontal. Os autores sugeriram que a doxiciclina poderá ser um importante coadjuvante ao tratamento periodontal tradicional.

O efeito antibacteriano e a substantividade da aplicação tópica de doxiciclina sobre a raiz de dentes extraídos por doença periodontal foi estudado por Demirel *et al.* em 1991. Nesse estudo, foram utilizadas diferentes concentrações de doxiciclina (0, 1, 10, 50 e 100 mg/ml) e o tempo de aplicação foi 3 minutos. Os espécimes dentais de cimento ou dentina foram preparados com instrumentação periodontal e aplicação da solução de doxiciclina, e colocados posteriormente em placas de Petri contendo 3 espécies bacterianas: *Actinomyces viscosus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*. Os autores avaliaram a inibição do crescimento bacteriano pela doxiciclina, e concluíram que a concentração de 100 mg/mL mostrou maior efeito inibidor sobre as três espécies bacterianas com alta substantividade na superfície radicular, e liberação posterior por pelo menos 14 dias, indicando que a doxiciclina continua biologicamente ativa durante todo este período.

3 Proposição

O objetivo deste trabalho foi avaliar descritivamente, após microscopia eletrônica de varredura, o efeito de diferentes concentrações e tempos de aplicação da solução de doxiciclina na superfície radicular de dentes humanos, e em espectroscopia de dispersão de energia a adsorção da solução de doxiciclina na superfície radicular.

4 Material e Métodos

Foram utilizados 20 dentes humanos, caninos e incisivos superiores e caninos inferiores, extraídos com comprometimento periodontal de pacientes adultos jovens com até 35 anos. Os pacientes assinaram o Termo de Doação de Dentes de acordo com as normas do Comitê de Ética, sob o protocolo nº 040/2003. Como critério de inclusão foram definidos os parâmetros: 1) mobilidade dental grau 3; 2) profundidade de sondagem ≥ 6 mm; 3) perda óssea alveolar de 50% ou mais detectado em exame radiográfico; 4) ausência de cáries ou restaurações radiculares; 5) sem história de tratamento periodontal nos últimos 6 meses.

Após a extração foram removidos todos os restos de tecido mole aderidos à superfície radicular com auxílio de instrumentos manuais e solução salina estéril. Em seguida, os dentes foram armazenados em solução salina estéril e conservados à temperatura de 4° C até o tratamento.

Imediatamente antes do tratamento, os espécimes foram removidos da solução de armazenamento e transferidos para um recipiente com solução salina estéril à temperatura ambiente. Para o tratamento mecânico realizado com curetas periodontais tipo Gracey 5-6^{*}, os espécimes foram fixados em uma morsa de pequeno tamanho e mantidos imersos nessa solução durante todo tempo de instrumentação. A instrumentação foi realizada nos terços médio e cervical de todas as faces dentais, num total de 30 movimentos da cureta por face, sendo esta afiada a cada 15 movimentos.

Após o tratamento mecânico, os espécimes foram seccionados com disco diamantado[†] primeiramente na junção cimento-esmalte e em seguida 5 milímetros em direção apical (Figura 1). O cilindro de dentina obtido foi seccionado no sentido longitudinal separando as quatro faces da raiz (Figura 1): mesial, distal, vestibular e lingual. Deste procedimento foram obtidas 4 amostras por dente que mediam aproximadamente 2 mm de largura por 5 mm de comprimento, totalizando

^{*} Hu-Friedy Manufacturing Company Inc., Chicago, IL, USA

[†] K.G. Sorensen, Barueri, São Paulo, Brasil

80 amostras. As amostras obtidas foram armazenadas em caixa térmica com solução salina estéril[‡] em temperatura ambiente para evitar desidratação até que o tratamento químico fosse realizado. Para a avaliação dos túbulos longitudinalmente, foi feita uma pequena marcação com o disco diamantado na região do espécime voltado para o canal radicular, tomando cuidado para não atingir a superfície tratada com a solução, e depois foi feita a fratura do espécime com auxílio de cinzel e martelo.

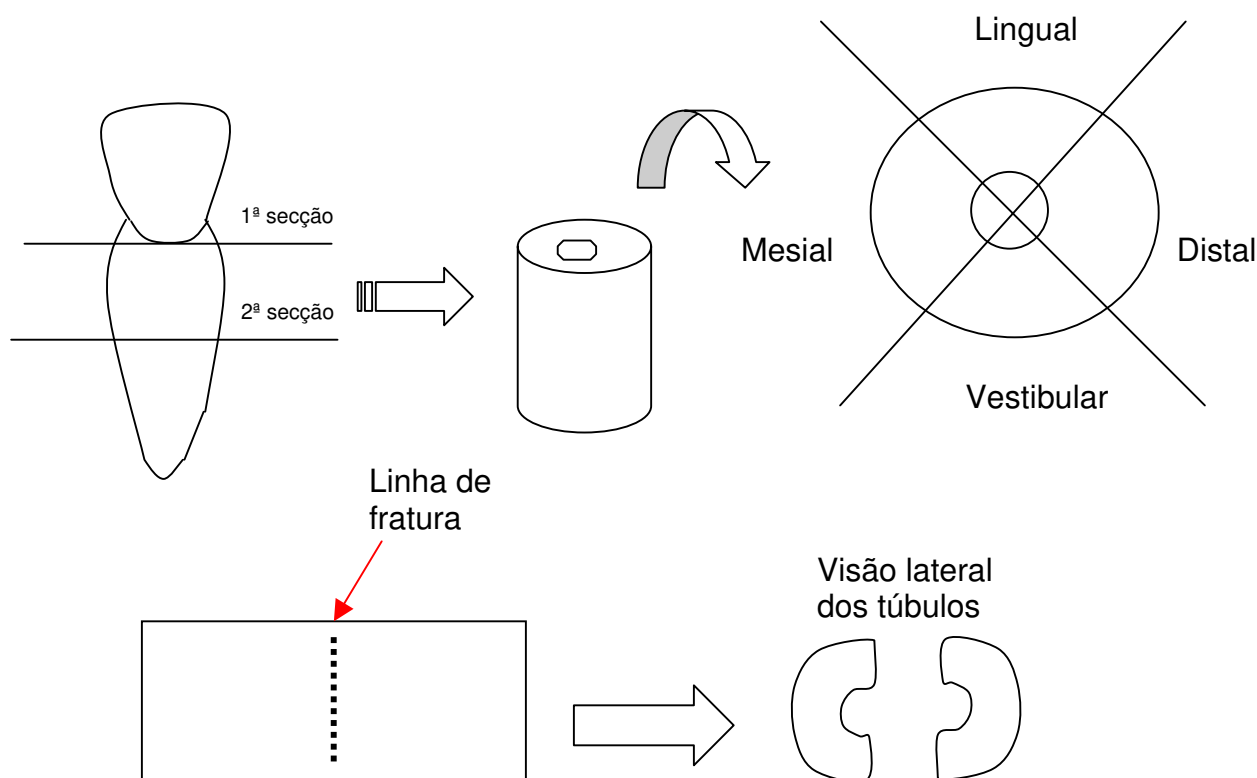


Figura 1.

Esquema representativo da obtenção das amostras após seccionamento dental, e fratura dos espécimes para avaliação longitudinal.

Preparo da solução de doxiciclina[§]

[‡] JP Ind. Farmacêutica S.A., Ribeirão Preto, SP, Brasil

[§] Proderma Farmácia de Manipulação, Piracicaba, Brasil

Para o tratamento químico foram utilizadas três soluções de doxiciclina, com a seguinte composição química: $C_{22}H_{24}N_2 + HCL + C_2 + H_6O + \frac{1}{2}H_2O + SiO_2$, nas concentrações de 25 mg/mL, 50 mg/mL e 100 mg/mL. As soluções foram preparadas com a diluição do pó do antimicrobiano em solução salina estéril. O controle foi realizado com solução salina estéril.

O pH das soluções de doxiciclina foi monitorado com auxílio de um pH metro^{II} e está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Controle do pH das soluções de doxiciclina.

TEMPO \ []	25 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml
0'	2,82	2,66	2,38
15'	2,74	2,54	2,41
30'	2,68	2,45	2,45

Metodologia de aplicação

Após o tratamento mecânico das raízes e obtenção das amostras, estas foram divididas em 4 grupos que foram divididos em: grupo controle com solução fisiológica (grupo 1), e grupos teste com solução de doxiciclina nas concentrações 25 mg/ml (grupo 2), 50 mg/ml (grupo 3) e 100 mg/ml (grupo 4). Para o tratamento químico as amostras foram secas com bolinha de algodão estéril, por 10 segundos, para não haver desidratação excessiva e a seguir foram aplicadas as diferentes soluções de acordo com o grupo. Cada grupo foi subdividido em 3 subgrupos, de acordo com o tempo de aplicação da solução: 1, 3 e 5 minutos. As soluções foram aplicadas com auxílio de uma bolinha de algodão estéril que foi friccionada na superfície radicular e trocada a cada 30 segundos, sempre embebida em nova solução, não levando em consideração a pressão da fricção. O

^{II} Procyon Instrum. Científica Ltda, São Paulo, SP, Brasil

tempo de aplicação das soluções foi cronometrado por outro pesquisador. Cada subgrupo foi formado por 5 espécimes, totalizando 60 espécimes para a análise em microscopia eletrônica de varredura[¶], sendo eleita, por outro pesquisador, a área mais representativa de cada espécime.

Grupo I: Aplicação de solução salina estéril (Controle)

Subgrupo 1: fricção durante 1 minuto

Subgrupo 2: fricção durante 3 minutos

Subgrupo 3: fricção durante 5 minutos

Grupo II: Aplicação de doxiciclina 25 mg/ml

Subgrupo 1: fricção durante 1 minuto

Subgrupo 2: fricção durante 3 minutos

Subgrupo 3: fricção durante 5 minutos

Grupo III: Aplicação de doxiciclina 50 mg/ml

Subgrupo 1: fricção durante 1 minuto

Subgrupo 2: fricção durante 3 minutos

Subgrupo 3: fricção durante 5 minutos

Grupo IV: Aplicação de doxiciclina 100 mg/ml

Subgrupo 1: fricção durante 1 minuto

Subgrupo 2: fricção durante 3 minutos

Subgrupo 3: fricção durante 5 minutos

Após a aplicação das soluções, as amostras foram lavadas com 10 mL de água destilada estéril com auxílio de seringa e agulha, e fixadas em glutaraldeído 2,5%[#] durante 24 horas em frascos identificados de acordo com cada tratamento. As amostras foram desidratadas por série crescente de acetona^{**} (50%, 75%, 85%, 90%, 95% e 100%), e ao final desidratadas ao ponto crítico^{††},

[¶] Jeol JSM 5600LV, Japan

[#] Proderma Farmácia de Manipulação, Piracicaba, Brasil

^{**} Qeel, São Paulo, SP, Brasil

^{††} Denton Vacuum DCP-1 – Critical Point

seguido de metalização em ouro^{‡‡} e análise em microscópio eletrônico de varredura.

Para a microanálise em EDS^{§§}, foram utilizadas 11 amostras sendo: controle negativo: espécime tratado somente com a instrumentação mecânica e aplicação de solução salina estéril durante 10 segundos; controle positivo: o pó do antimicrobiano disperso diretamente sobre o suporte metálico das amostras; e 9 espécimes tratados com as soluções de doxiciclina nas concentrações de 25 mg/ml, 50 mg/ml e 100 mg/ml, nos tempos de 1, 3 ou 5 minutos. A microanálise foi realizada na área central do espécime.

Os espécimes que foram analisados em espectroscopia de dispersão de energia foram preparados seguindo a rotina para avaliação em MEV, com a diferença da metalização ser com carbono^{||}.

‡‡ Denton Vacuum Desk II

§§ Vantage – Digital Acquisition Engine – Noram Instruments - Japan

|| Denton Vacuum Desk II – Carbon Accessory

Forma de análise dos resultados no MEV e no EDS

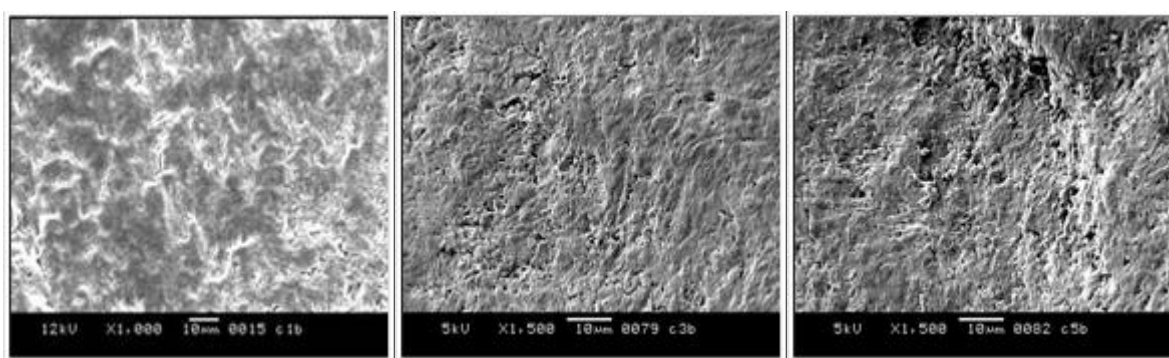
As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura com aumento variando entre 500 e 18000 vezes e aceleração entre 5 e 20 Kv. A análise das superfícies foi descritiva considerando a presença ou ausência de “smear layer”, e exposição e abertura dos túbulos dentinários. Os cortes longitudinais foram descritos considerando a exposição da matriz colágena.

A espectroscopia de dispersão de energia foi efetuada no centro do espécime para detectar a adsorção da solução de doxiciclina na superfície radicular. Nesta análise foi considerado o peso atômico dos elementos químicos da amostra, comparando com o peso atômico conhecido de cada elemento químico presente na tabela periódica. Em nosso estudo, a doxiciclina foi identificada pelo peso atômico do elemento químico cloro que faz parte da composição química do pó do antimicrobiano.

5 Resultados

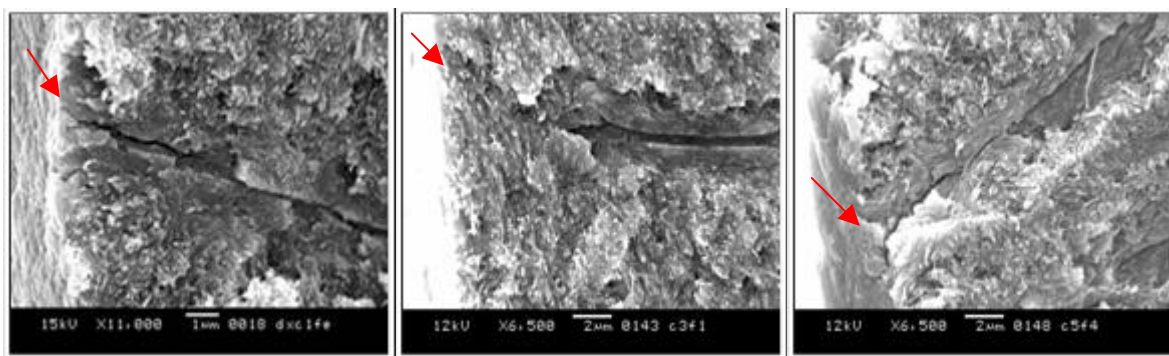
MEV

Os espécimes tratados com a solução controle, independente do tempo de aplicação 1, 3 ou 5 minutos, foram caracterizados na sua superfície por aparência irregular e amorfa sem evidência de desmineralização e com os túbulos dentinários completamente obliterados por “smear layer”. A análise dos túbulos dentinários em corte longitudinal mostrou que não há indícios de desmineralização na entrada dos mesmos nem exposição de matriz colágena (Figuras 2 e 3).



a
Figura 2.

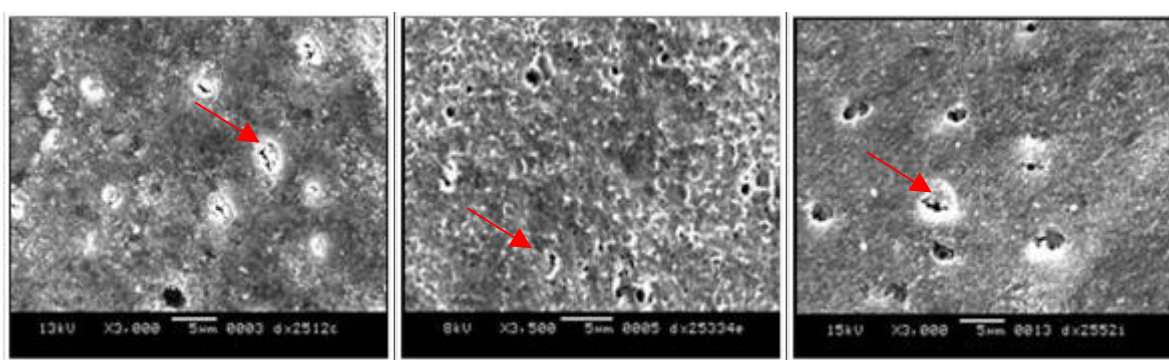
Grupo controle tratado com solução fisiológica (0 mg/ml de doxiciclina). 1 minuto (a); 3 minutos (b); 5 minutos (c) de aplicação. As superfícies são caracterizadas por aparência irregular e amorfa, completamente cobertas pela “smear layer”, sem exposição e abertura de túbulos.



a
Figura 3.

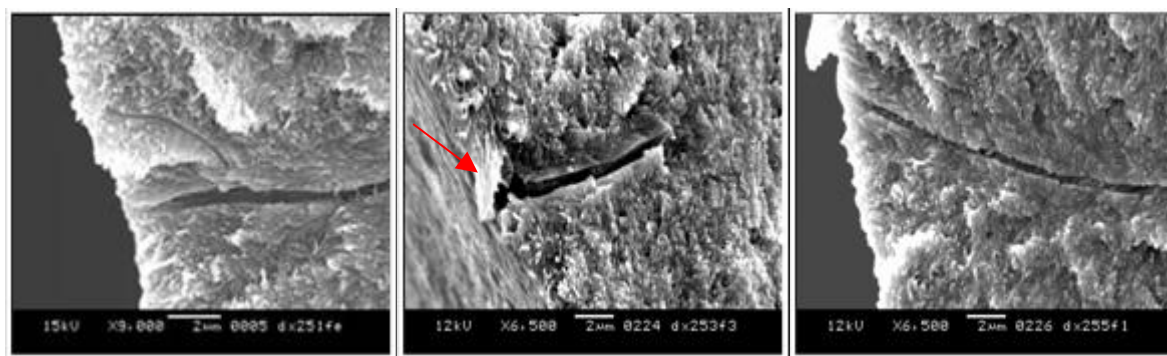
Grupo controle. Vista longitudinal dos túbulos dentinários. A entrada dos túbulos encontra-se coberta por “smear layer” (seta vermelha) sem exposição da matriz colágena, independente do tempo de aplicação da solução fisiológica. 1 minuto (a); 3 minutos (b); 5 minutos (c) de aplicação.

Os espécimes tratados com solução de doxiciclina na concentração de 25 mg/ml com tempo de aplicação de 1 minuto mostraram superfície com túbulos dentinários parcialmente obliterados pela “smear layer” (seta vermelha). Quando a solução de doxiciclina foi aplicada durante 3 minutos, houve maior remoção da smear layer e maior número de túbulos dentinários abertos. Quando o tempo de aplicação foi 5 minutos ocorreu remoção da “smear layer”, mas os túbulos continuavam ainda parcialmente obliterados (Figura 4). Nota-se nos cortes longitudinais ausência de exposição da matriz colágena.



a
Figura 4.

Es espécimes tratados com solução de doxiciclina na concentração de 25 mg/ml aplicada durante 1 minuto (a), 3 minutos (b) e 5 minutos (c). Notar a remoção de “smear layer” dependente do tempo de aplicação da solução, mas com pouca efetividade da solução. Nota-se a presença de “smear layer “ na entrada dos túbulos dentinários (seta vermelha).



a
Figura 5.

Es espécimes tratados com solução de doxiciclina na concentração de 25 mg/ml aplicada durante 1 minuto (a), 3 minutos (b) e 5 minutos (c). Vista lateral dos túbulos dentinários parcialmente obliterados pela “smear layer” (seta vermelha), sem indícios de exposição de matriz colágena.

Quando a concentração de doxiciclina foi 50 mg/ml houve maior remoção de “smear layer” e abertura dos túbulos dentinários do que no grupo anterior, com aumento do grau de desmineralização com aumento do tempo de aplicação. (Figuras 6). Os túbulos vistos em corte longitudinal exibem um início de exposição de matriz colágena (Figura 7).

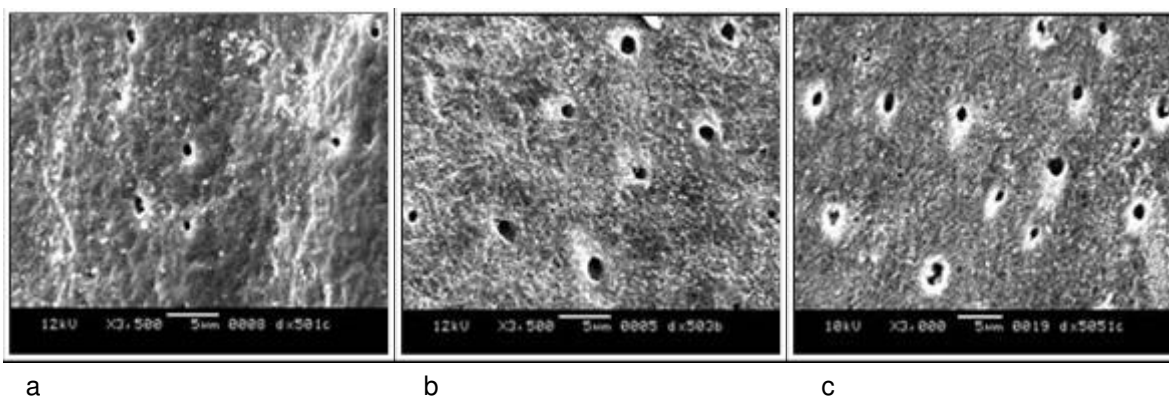


Figura 6.

Espécimes tratados com solução de doxiciclina na concentração de 50 mg/ml aplicada durante 1 minuto (a), 3 minutos (b) e 5 minutos (c). Notar a remoção de smear layer dependente do tempo de aplicação e da concentração da solução.

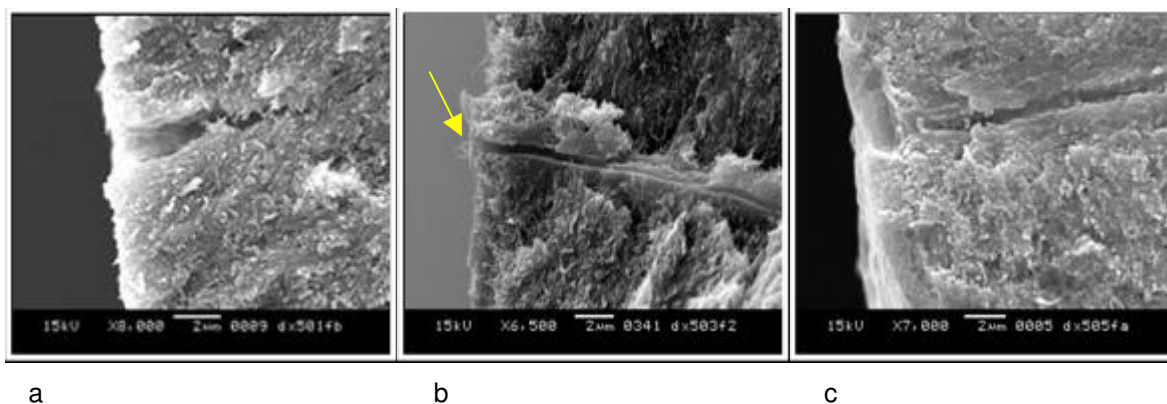
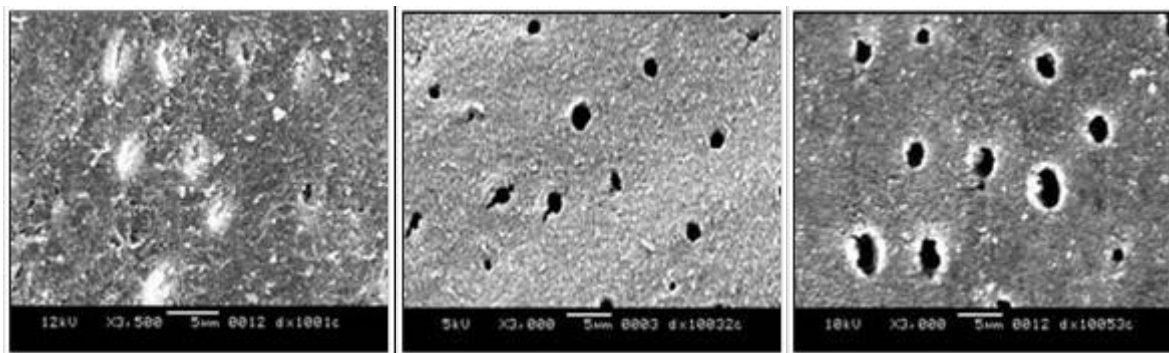


Figura 7.

Espécimes tratados com solução de doxiciclina na concentração de 50 mg/ml aplicada durante 1 minuto (a), 3 minutos (b) e 5 minutos (c). Vista lateral dos túbulos dentinários, com início de exposição da matriz colágena (seta amarela).

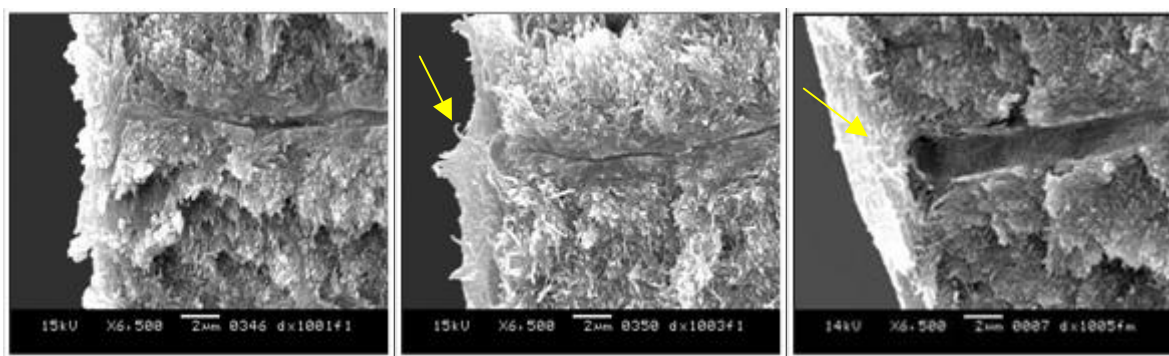
A aplicação da solução de doxiciclina na concentração de 100 mg/ml durante 1 minuto provocou pouca remoção da “smear layer” e abertura de túbulos

dentinários. A mesma solução aplicada durante 3 ou 5 minutos provocou aumento na remoção da “smear layer”, com abertura de túbulos dentinários, e em maior grau no tempo de 5 minutos (Figura 8). Em vista longitudinal observamos exposição da matriz colágena, com maior exposição no tempo de 5 minutos (Figura 9). A figura 10 mostra um maior aumento da figura 9c, onde podemos observar a exposição da matriz colágena.



a
Figura 8.

Espécimes tratados com solução de doxiciclina na concentração de 100 mg/ml aplicada durante 1 minuto (a), 3 minutos (b) e 5 minutos (c). Notar a remoção de smear layer e a abertura dos túbulos dentinários dependente do tempo de aplicação e da concentração da solução.



a
Figura 9.

Espécimes tratados com solução de doxiciclina na concentração de 100 mg/ml aplicada durante 1 minuto (a), 3 minutos (b) e 5 minutos (c). Vista lateral dos túbulos dentinários. Notar a exposição da matriz colágena na entrada dos túbulos dentinários (seta amarela).

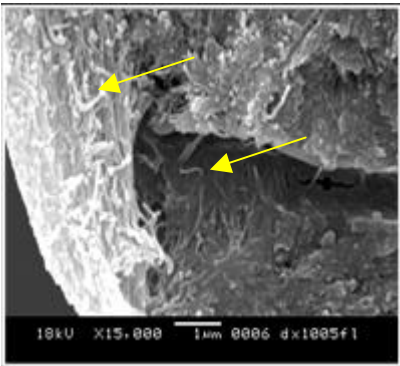


Figura 10.

Maior aumento do espécime da Figura 9c, mostrando exposição da matriz colágena na entrada e ao redor do túbulo dentinário (seta amarela).

EDS

Os espécimes controle negativo, que receberam apenas o tratamento mecânico seguido da aplicação de solução fisiológica, mostraram picos de cálcio, carbono, oxigênio e fósforo que fazem parte da composição da dentina (Figura 11).

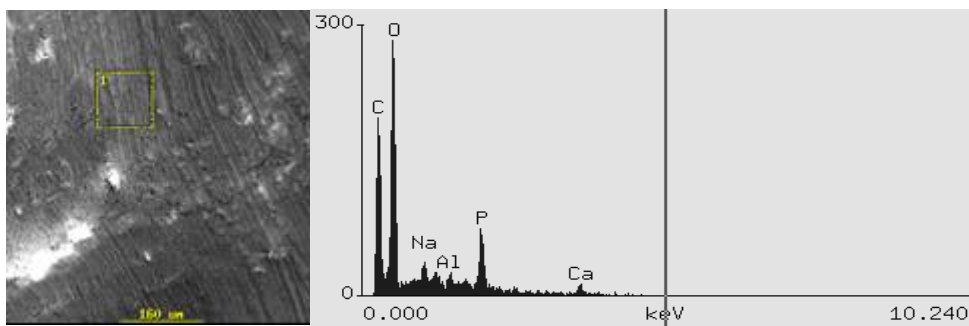


Figura 11.

Espécime controle negativo, sem tratamento com doxiciclina, com picos de cálcio e fósforo, sem presença de cloro.

Por outro lado, os espécimes controle positivo – pó antimicrobiano aplicado diretamente sobre o suporte de amostras – mostraram picos de carbono, oxigênio e fósforo, além de pico de cloro e silício (Figura 12).

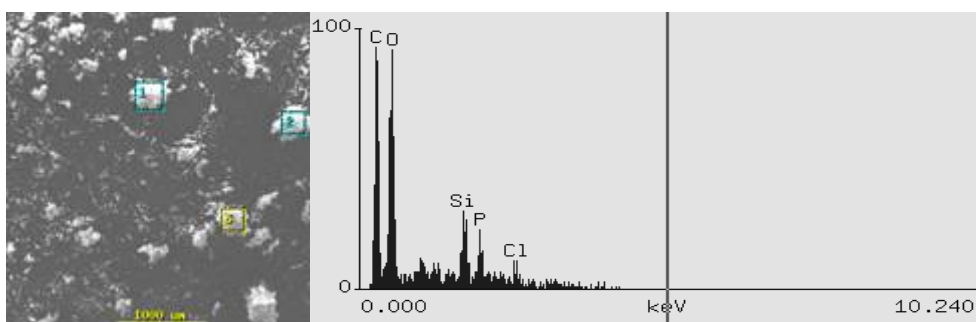


Figura 12.

Espécime controle positivo com pó de doxiciclina sobre o suporte de amostra metálico, onde se visualiza o pico de cloro, indicativo da presença de doxiciclina.

Embora o cloro identifique a presença do antimicrobiano, os espécimes dos grupos tratados com solução de doxiciclina nas concentrações de 25 e 50 mg/ml, independente do tempo de aplicação de 1, 3 ou 5 minutos não

apresentaram cloro na sua composição, indicando que nessas concentrações a adsorção do sal sobre a superfície radicular é baixa ou ausente (Figuras 13, 14, 15, 16, 17 e 18).

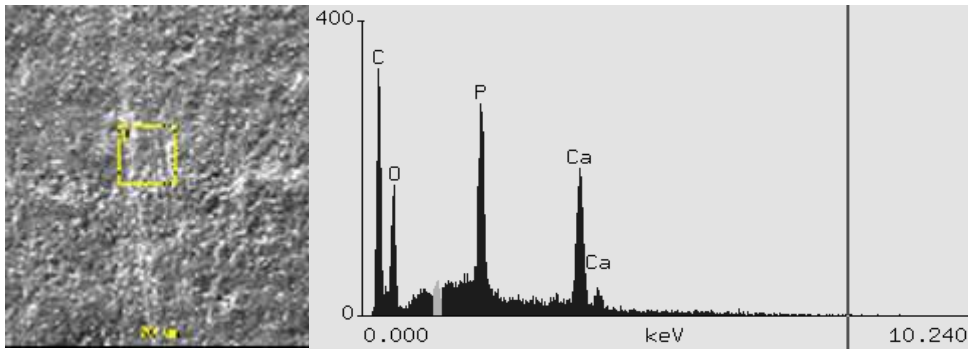


Figura 13.

Espécime tratado com doxiciclina 25 mg/ml durante 1 minuto analisado em EDS, onde não se visualiza pico de cloro.

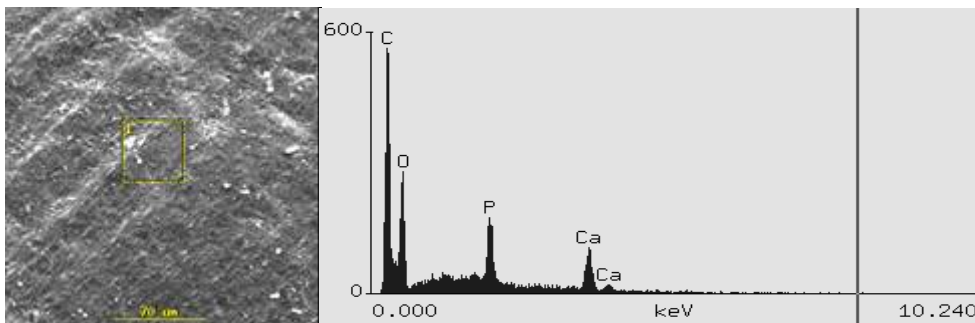


Figura 14.

Espécime tratado com doxiciclina 25 mg/ml durante 3 minutos analisado em EDS, onde não se visualiza pico de cloro, do mesmo modo que a figura anterior.

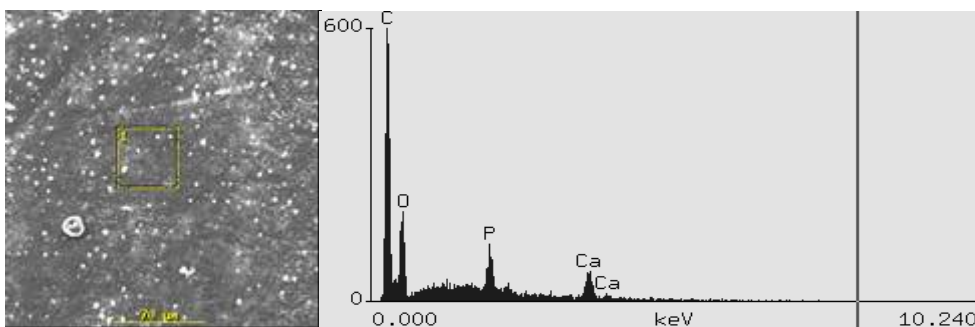


Figura 15.

Espécime tratado com doxiciclina 25 mg/ml durante 5 minutos analisado em EDS, onde não se visualiza pico de cloro, semelhante às figuras 13 e 14.

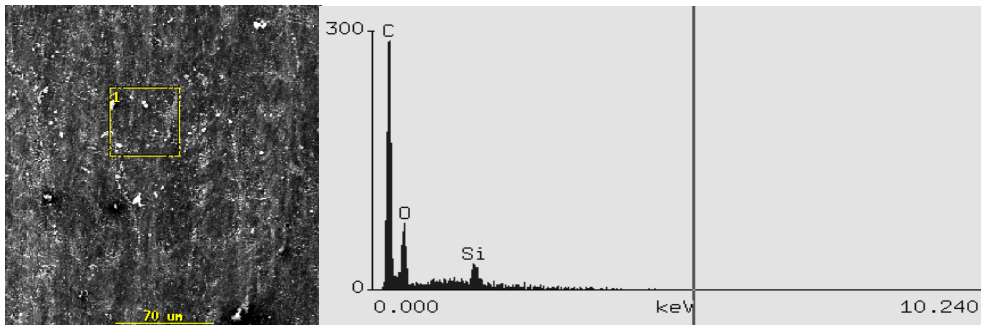


Figura 16.

Espécime tratado com doxiciclina 50 mg/ml durante 1 minuto analisado em EDS, onde não se visualiza o pico de cloro, do mesmo modo do que as figuras 13, 14 e 15.

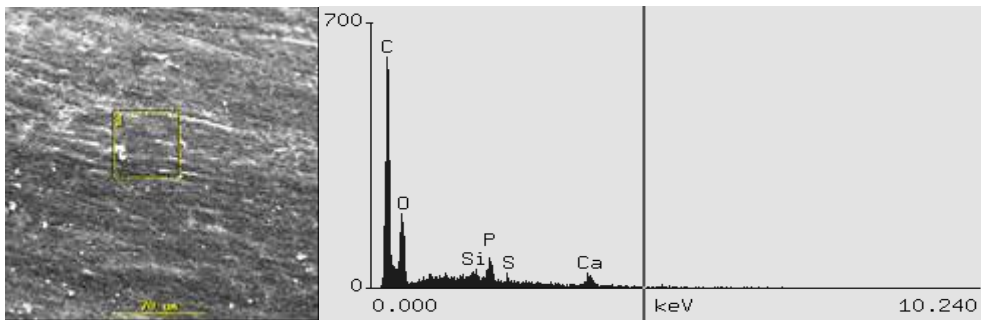


Figura 17.

Espécime tratado com doxiciclina 50 mg/ml durante 3 minutos analisado em EDS, onde não se visualiza pico de cloro, indicando que não houve adsorção de doxiciclina na superfície radicular.

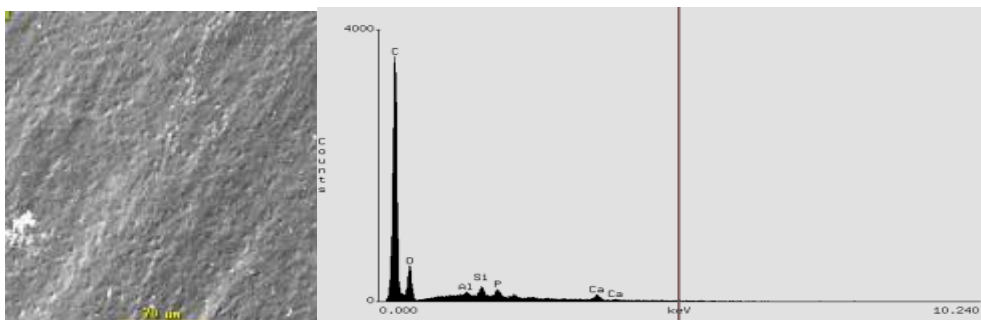


Figura 18.

Espécime tratado com doxiciclina 50 mg/ml durante 5 minutos analisado em EDS, onde não se visualiza o pico de cloro, do mesmo modo que na figura anterior.

Os espécimes tratados com as soluções de doxiciclina na concentração de 100 mg/ml durante 1 e 3 minutos também não apresentaram cloro na composição, mas quando o tempo de aplicação foi de 5 minutos, o pico de cloro ficou evidente, sugerindo a presença de doxiciclina residual na superfície radicular (Figuras 19, 20 e 21).

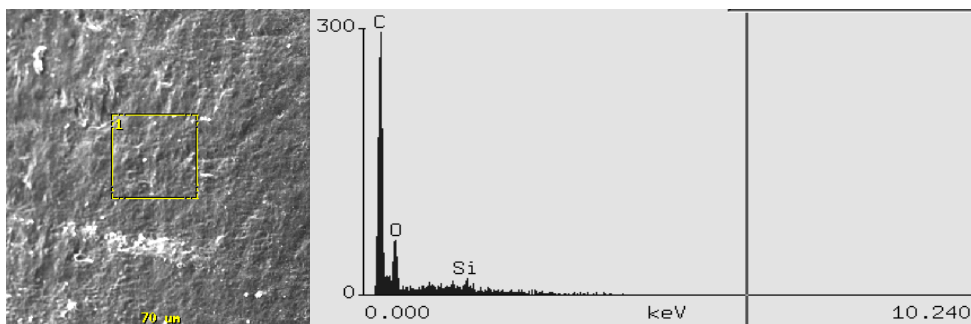


Figura 19.

Espécime tratado com doxiciclina 100 mg/ml durante 1 minuto analisado em EDS, onde não se visualiza o pico de cloro.

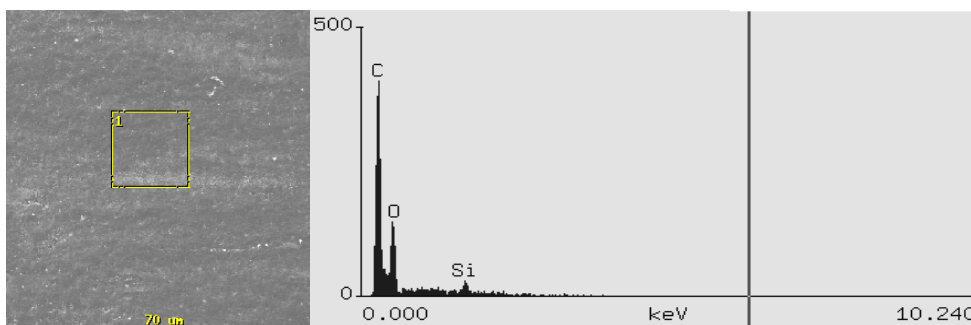


Figura 20.

Espécime tratado com doxiciclina 100 mg/ml durante 3 minutos analisado em EDS, semelhante à figura anterior.

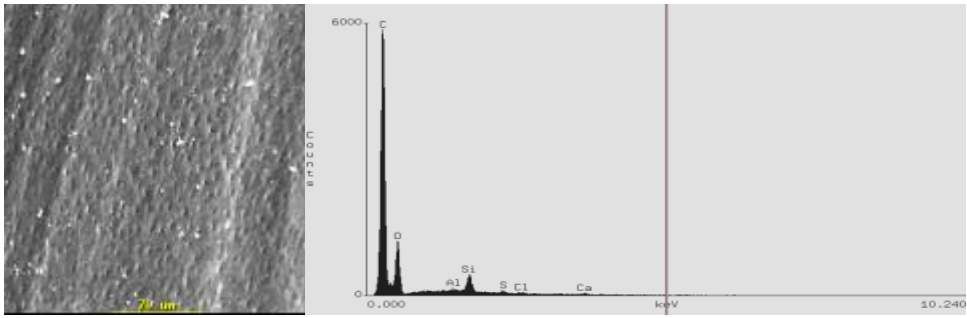


Figura 21.

Espécime tratado com doxiciclina a 100 mg/ml durante 5 minutos analisado em EDS, aonde se visualiza o pico de cloro sugerindo adsorção da doxiciclina na superfície radicular.

6 Discussão

A smear layer formada após a instrumentação periodontal pode servir como barreira física para o desenvolvimento de novo tecido de inserção sobre a superfície radicular tratada (Polson *et al.*, 1984). Por causa disso, vários estudos procuraram demonstrar o efeito do tratamento químico, especialmente com solução de tetraciclina, para a remoção da smear layer (Terranova *et al.*, 1986; Wikesjö, 1986; Terranova *et al.*, 1987; Frantz & Polson, 1988; Trombelli *et al.*, 1994; Trombelli *et al.*, 1995; Madison & Hokett, 1997; Delazari *et al.*, 1999) e estímulo da adesão de fibroblastos gengivais sobre a superfície radicular (Terranova *et al.*, 1986; Bal *et al.*, 1990; Bergenholtz e Babay, 2001). Do ponto de vista clínico, parece interessante o efeito não antimicrobiano das soluções de tetraciclina e de tetraciclina modificadas como a doxiciclina, entre eles a atividade anticolagenolítica (Golub *et al.*, 1984), a alta substantividade (Wikesjö *et al.*, 1986) e a inibição da reabsorção óssea *in vitro* (Grevstad, 1993).

Por outro lado, os espécimes dos grupos teste tratados com as diferentes soluções de doxiciclina (Figuras 4, 6 e 8), mostraram superfícies radiculares em que a smear layer foi removida e os túbulos dentinários expostos e abertos. Esses resultados são similares aos de Wikesjö *et al.* (1986), Lafferty *et al.* (1993) e Madison & Hokett (1997).

Neste estudo, as soluções de doxiciclina foram preparadas imediatamente antes do uso e descartadas após cada etapa do ensaio. O pH e a estabilidade das soluções foram avaliados antes do início da fase experimental (Tabela 1). Apesar de estável, a Tabela 1 mostra que houve diferença no pH das soluções teste, entretanto, acreditamos que essa pequena variação não tenha sido suficiente para produzir efeitos tão discrepantes como os observados em nosso trabalho (Figuras 4, 6 e 8).

O presente estudo sugere relação entre a concentração da solução de doxiciclina e a efetividade na remoção da smear layer, exposição e abertura dos túbulos dentinários (Figuras 4, 6 e 8). Hanes *et al.*, em 1991, sugeriram a utilização de soluções mais concentradas de tetraciclina ou de ácido cítrico para a

obtenção de melhores resultados na desmineralização da superfície radicular, mostrando dependência entre a concentração da solução e sua efetividade. Da mesma forma, Sterret *et al.*, em 1997, encontraram melhores resultados com concentrações maiores de tetraciclina, chegando ao máximo da desmineralização com a aplicação de solução de tetraciclina na concentração de 75 mg/ml. Mais recentemente, Isik *et al.*, em 2000, sugeriram que os melhores resultados da desmineralização foram obtidos com soluções de cloridrato de tetraciclina com concentrações entre 50 e 150 mg/ml, sendo que os resultados do nosso trabalho também mostraram os melhores efeitos com a solução de doxiciclina na concentração de 50 mg/ml (Figuras 6 e 7).

Apesar da relação concentração da solução e efeito de desmineralização radicular demonstrados acima, outros estudos relataram o contrário. Trombelli *et al.*, em 1994, utilizaram duas soluções de tetraciclina nas concentrações de 62,5 e 125 mg/ml e encontraram o mesmo efeito desmineralizante. Em nossa opinião, essas concentrações podem ser consideradas altas e capazes de produzir o mesmo efeito desmineralizante. Outra variável considerada significativa nesse estudo foi o uso de instrumento rotatório para a produção da smear layer em raízes de dentes humanos sem doença periodontal. O uso de instrumentos rotatórios não é prática clínica rotineira – as brocas podem produzir aquecimento da superfície radicular e remover estrutura dental em excesso alterando a relação diâmetro e número de túbulos dentinários e a quantidade de dentina peri e inter tubular, o que modifica consideravelmente o substrato para ação dos agentes químicos. A metodologia adotada neste estudo procurou reproduzir a condição clínica corriqueira. As concentrações das soluções de doxiciclina do nosso estudo variaram entre 25 mg/ml e 100 mg/ml, similares à proposta por Trombelli *et al.*, em 1995, que usaram concentrações entre 10 mg/ml e 100 mg/ml, mas mesmo assim não obtiveram diferenças com relação a concentração, provavelmente devido ao mesmo modo de obtenção da smear layer relatado no artigo do mesmo autor em 1994.

O pH das soluções utilizadas neste estudo variou entre 2,38 e 2,82 (Tabela 1) e pode ser considerado similar ao relatado por Trombelli *et al.* (1994) cujas soluções variaram entre 2,0 e 2,1. Os resultados deste nosso trabalho sugerem que a remoção da smear layer depende da concentração da solução de doxiciclina (Figuras 2, 4, 6 e 8), e não do pH.

Embora possa produzir efeitos considerados positivos para as etapas iniciais de reparo das feridas (Terranova *et al.*, 1986; Frantz e Polson, 1988; Bal *et al.*, 1990), a ação dos agentes químicos como coadjuvantes à instrumentação periodontal deve ser visto com cautela, pois o aumento do tempo de aplicação pode provocar hiperdesmineralização da superfície (Figuras 8 e 9), enquanto que o menor tempo de aplicação pode produzir hipodesmineralização (Figuras 4 e 5), além do cuidado para não haver contato do agente com o tecido conjuntivo adjacente.

Os cortes longitudinais dos espécimes tratados com as concentrações de 25mg/ml, 50mg/ml ou 100mg/ml mostraram a abertura dos túbulos em formato cônico (Figuras 5, 7 e 9), que está em acordo com o descrito por Chaves *et al.* em 1993.

Apesar de existirem evidências de que não há relação entre o tempo de aplicação da solução e o efeito desmineralizante sobre a superfície (Isik *et al.*, 2000; da Mata, 2002), os resultados obtidos sugerem fortemente que as alterações que ocorrem na matriz colágena da dentina peri e inter-tubular dependem do tempo de aplicação da solução de doxiciclina (Figuras 4, 6 e 8). As fotomicrografias dos espécimes tratados com a mesma concentração mostraram que o aumento do tempo de aplicação da solução de doxiciclina produziu aumento no efeito desmineralizante. Portanto, o aumento do tempo de aplicação da solução proporciona maior remoção da smear layer da superfície radicular, expõe a entrada dos túbulos dentinários e aumenta o diâmetro superficial desses túbulos.

Nossos resultados também são similares aos de Labahn *et al.*, em 1992, que encontraram relação entre o tipo de desmineralização e os diferentes tempos de aplicação da solução de tetraciclina sobre a superfície radicular.

Trombelli *et al.* (1994) não encontraram diferenças com relação ao tempo de aplicação da solução e remoção de smear layer quando os espécimes tinham cimento na superfície radicular. Esse fato provavelmente é devido à composição inorgânica diferente entre a dentina e o cimento radicular. Como o cimento é menos mineralizado do que a dentina, ele é menos passível de dissolução pelos ácidos.

As Figuras 6 e 7 mostraram que com a concentração de 50 mg/ml e tempo de aplicação de 3 minutos houve remoção da porção inorgânica da dentina inter e peri tubular mantendo a organização colágena das mesmas. Pode-se sugerir que não houve desmineralização excessiva da superfície dental.

Madison & Hokett, em 1997, avaliaram o efeito de diferentes tipos de tetraciclina na remoção da smear layer, exposição e abertura dos túbulos dentinários. As soluções testadas foram tetraciclina, doxiciclina, sumicina, minociclina e solução salina em diferentes tempos de aplicação. Os autores encontraram melhores resultados com a aplicação da solução de tetraciclina na concentração de 250 mg/ml, seguido pela doxiciclina 100 mg/ml. Em nossa opinião, esse resultado se deve principalmente pela utilização de uma concentração muito mais alta de tetraciclina, quando comparada com a solução de doxiciclina. Os autores relataram ainda que o aumento do tempo de aplicação da solução é proporcional a efetividade na remoção da smear layer, exposição e abertura dos túbulos dentinários, sendo similar aos nossos achados (Figuras 4, 6 e 8).

Os resultados obtidos neste nosso estudo mostraram relação direta entre tempo de aplicação da solução e a efetividade na remoção de smear layer, e concentração da solução e efetividade na remoção da smear layer (Figuras 4, 6 e 8).

O uso do agente biomodificador, no caso a solução de doxiciclina, deve ficar restrito nas cirurgias de acesso para instrumentação radicular e com controle da aplicação, para evitar que a solução atinja tecidos moles e osso alveolar adjacente.

Na microanálise em EDS, a presença da doxiciclina foi confirmada pelo cloro. O efeito marcador do cloro foi confirmado quando o controle positivo foi analisado (Figura 12). No espécime controle negativo (Figura 11), que recebeu tratamento mecânico seguido da aplicação de 10 ml de solução fisiológica, não foi encontrado traço de cloro, mas sim de componentes da estrutura dental, tais como fósforo, cálcio, carbono, oxigênio e sódio. Estes achados estão de acordo com Morrison *et al.*, em 1992, que fizeram microanálise de raio-X de fibras de tetraciclina que foram utilizadas *in vivo* durante 10 dias em dentes com extração indicada. Como controle positivo, os autores analisaram uma fibra de tetraciclina não utilizada, obtendo um pico muito alto de cloro, seguido por picos de silício, magnésio, alumínio e cloro. Quando a microanálise foi feita sobre os dentes extraídos, os autores encontraram cristais residuais de tetraciclina que analisados em EDS revelaram picos menores de cloro e silício.

Quando a microanálise foi feita em nossos grupos teste 25 mg/ml e 50 mg/ml (Figuras 13, 14, 15, 16, 17 e 18) não observamos pico de cloro, independente do tempo de aplicação da solução, sugerindo que nessa solução a concentração de doxiciclina é baixa para que haja adsorção na superfície radicular. Esse resultado está de acordo com Wikesjö *et al.*, em 1986, que utilizaram soluções de tetraciclina em diversas concentrações e obtiveram como resultado que apenas a partir de 50 mg/ml é que ocorreu adsorção da solução na superfície radicular. Dessa forma, a superfície radicular tratada serviria como depósito do antimicrobiano que poderia ser liberado posteriormente de forma ativa.

Nos espécimes tratados com soluções nas concentrações de doxiciclina 100 mg/ml nos tempos de 1 e 3 minutos (Figuras 19 e 20) não identificamos o cloro, provavelmente devido ao tempo curto de exposição da solução na superfície radicular. Quando a concentração de 100 mg/ml durante 5 minutos foi analisada, o cloro foi observado, demonstrando adsorção da doxiciclina na superfície radicular (Figura 21). Uma das limitações da análise por esse equipamento é apenas

mostrar a ausência ou presença de determinada substância, não havendo quantificação.

Esses achados sobre a adsorção da doxiciclina na superfície radicular estão de acordo com os achados *in vitro* de Baker *et al.*, em 1983, que relataram que a tetraciclina e seus derivados têm substantividade na superfície dental e, no seu artigo, exibem boa atividade antimicrobiana.

Essa adsorção da doxiciclina na superfície radicular pode ser benéfica para o tratamento da doença periodontal em humanos, pois se ela estiver em sua forma ativa pode haver ação antimicrobiana prolongada por até 14 dias nas concentrações de 50 e 100 mg/ml, segundo Demirel *et al.*, em 1991. Há efetividade *in vitro* da doxiciclina durante esse período contra *Actinomyces viscosus*, *Actinobacillus actinomycetencomitans* e *Porphyromonas gingivalis*. Yamalik *et al.*, também em 1991, avaliaram a ação da doxiciclina contra periodontopatógenos após administração sistêmica durante 7 dias. Os autores relataram que a doxiciclina foi eficiente na diminuição da contagem desses patógenos, sendo importante coadjuvante ao tratamento periodontal convencional.

7 Conclusão

Os resultados sugerem que:

- A aplicação da solução de doxiciclina na superfície radicular foi efetiva para a remoção da smear layer, abertura de túbulos dentinários e exposição da matriz colágena.
- Houve relação direta entre o tempo de aplicação da solução de doxiciclina e a concentração da solução de doxiciclina, com seu efeito desmineralizante.
- A doxiciclina foi adsorvida na superfície radicular apenas na concentração de 100 mg/ml aplicada durante 5 minutos.

Referências*

1. Alger FA, Solt CW, Vuddhakanok S, Miles K. The histologic evaluation of new attachment in periodontally diseased human roots treated with tetracycline-hydrochloride and fibronectin. *J Periodontol.* 1990; 61: 447-455.
2. Baker PJ, Evans RT, Coburn RA, Genco RJ. Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form. *J Periodontol.* 1983; 54: 580-585.
3. Bal B, Eren K, Balos K. Effects of various root surface treatments on initial clot formation: a scanning electron microscope study. *J Nihon Univ Sch Dent.* 1990; 32: 281-293.
4. Barkhordar RA, Watanabe LG, Marshall GW, Hussain MZ. Removal of intracanal smear by doxycycline in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997; 84: 420-423.
5. Bergenholtz A, Babay N. Scanning electron microscopy of the root surface texture of extracted periodontally diseased teeth following various etching and chelating regimens. *Int J Periodont Rest Dent.* 1998; 18: 171-179.
6. Bjorvatn K. In vitro study by fluorescence microscopy and microradiography of tetracycline-tooth interaction. *Scand J Dent Res.* 1983; 91: 417-24.
7. Blomlöf J, Lindskog S. Periodontal tissue-vitality after different etching modalities. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 464-468.
8. Blomlöf JPS, Lindskog A. Root surface texture and early cell and tissue colonization after different etching modalities. *Eur J Oral Sci.* 1995; 103: 17-24.
9. Blomlöf JPS, Blomlöf LB, Lindskog SF. Smear layer formed by different root planing modalities and its removal by an EDTA gel preparation. *Int J*

* De acordo com a norma utilizada na FOP/Unicamp, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Periodont Rest Dent.* 1997; 17: 243-249.
10. Boyko GA, Brunette DM, Melcher AH. Cell attachment to demineralized root surfaces *in vitro*. *J Periodontal Res.* 1980; 15: 297-303.
 11. Chaves E, Cox CF, Morrison E, Cafesse R. The effect of citric acid application on periodontally involved root surfaces. An *in vivo* light microscopic study. *Int J Periodont Rest Dent.* 1993; 13: 189-196.
 12. Christersson LA, Norderyd OM, Puchalsky CS. Topical application of tetracycline-HCL in human periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1993; 20: 88-95.
 13. Coldiron NB, Yukna RA, Weir J, Caudill RF. A quantitative study of cementum removal with hand cures. *J Periodontol.* 1990; 61: 293-299.
 14. Da Mata, AC. Avaliação do cloridrato de tetraciclina na remoção da “smear layer” radicular, em diferentes concentrações, tempos e modos de aplicação. Análise através de microscopia eletrônica de varredura [dissertação]. Araraquara (SP): UNESP; 2002.
 15. Delazari FMC, Gerlach RF, Joly JC, Lima AFM. Scanning electron microscopy study of the effect of tetracycline HCL on smear layer removal and fibrin network formation. *Braz Dent J.* 1999; 10: 81-87.
 16. Demirel K, Baer PN, McNamara TF. Topical application of doxycycline on periodontally involved root surfaces *in vitro*: Comparative analysis of substantivity on cementum and dentin. *J Periodontol.* 1991; 62: 312-316.
 17. Dyer BL, Caffesse RG, Nasjleti CE, Morrison EC. Guided tissue regeneration with dentin biomodification. *J Periodontol.* 1993; 64: 1052-1060.
 18. Foster KH, Kulild JC, Weller RN. Effect of smear layer removal on the diffusion of calcium hydroxide through radicular dentin. *J Endod.* 1993; 19: 136-140.
 19. Frantz B, Polson A. Tissue interactions with dentin specimens after demineralization using tetracycline. *J Periodontol.* 1988, 59: 714-721.
 20. Grevstad HJ. Doxycycline prevents root resorption and alveolar bone loss

- in rats after periodontal surgery. *Scand J Dent Res*. 1993; 101: 287-291.
21. Hanemaaijer R, Visser H, Koolwijk P, Sorsa T, Salo T, Golub LM et al. Inhibition of MMP synthesis by doxycycline and chemical modified tetracyclines (CMTs) in human endothelial cells. *Adv Dent Res*. 1998; 12: 114-118.
 22. Hanes PJ, O'Brien NJ, Garnick JJ. A morphological comparison of radicular dentin following root planning and treatment with citric acid tetracycline HCL. *J Clin Periodontol*. 1991; 18: 660-668.
 23. Isik AG, Tarim B, Hafez AA, Yalçın FS, Onan U, Cox CF. A comparative scanning microscopic study on the characteristics of desmineralized dentin root surface using different tetracycline HCL concentrations and application times. *J Periodontol*. 2000; 71: 219-225.
 24. Isik G, Ince S, Saglam F, Onan U. Comparative SEM study on the effect of different demineralization methods with tetracycline HCL on healthy root surfaces. *J Clin Periodontol*. 1997; 24: 589-594.
 25. Labahn R, Fahrenbach WH, Clark SM, Lie T, Adams DF. Root dentin morphology after different modes of citric acid and tetracycline hydrochloride conditioning. *J Periodontol*. 1992; 63: 303-309.
 26. Laffert TA, Gher ME, Gray JL. Comparative SEM study on the effect of acid etching with tetracycline HCL or citric acid on instrumented periodontally-involved human root surfaces. *J Periodontol*. 1993; 64: 689-693.
 27. Leknes KN, Lie Y. Influence of polishing procedures on sonic scaling root surface roughness. *J Periodontol*. 1991; 62: 659-662.
 28. Madison JG, Hokett SD. The effects of different tetracyclines on the dentin root surface of instrumented, periodontally involved human teeth: a comparative scanning electron microscope study. *J Periodontol*. 1997; 68: 739-745.
 29. Morrison SL, Cobb CM, Kazakos GM, Killoy WJ. Root surface characteristics associated with subgingival placement of monolithic

- tetracycline-impregnated fibers. *J Periodontol.* 1992; 63: 137-143.
30. Pashley DH. Smear layer: physiological considerations. *Oper Dent.* 1984; 3: 13-29.
 31. Passanezi E, Alves ME, Janson WA, Ruben MP. Periosteal activation and root demineralization associated with the horizontal sliding flap. *J Periodontol.* 1979; 50: 384-386.
 32. Pitaru S, Melcher AH. Organization of an oriented fiber system in vitro by human gingival fibroblasts attached to dental tissue: Relationships between cells and mineralized and demineralized tissue. *J Periodontal Res.* 1987; 22: 6-13.
 33. Pitaru S, Melcher AH. Organization of and oriented fiber system in vitro by human gingival fibroblast attached to dental tissue: relationship between cells and mineralized and desmineralized tissue. *J Periodontol Res.* 1987; 22: 6-13.
 34. Polson AM, Frederick GT, Ladenheim S, Hanes PJ. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. *J Periodontol.* 1984; 55: 443-446.
 35. Polson AM, Hanes PJ. Cell and fiber attachment to demineralized dentin. A comparison between normal and periodontitis-affected root surfaces. *J Clin Periodontol.* 1987; 14: 357-65.
 36. Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. Defect repair. *J Periodontol.* 1976; 47: 497-505.
 37. Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. Optimum range. *J Periodontol.* 1975; 46: 646-655.
 38. Register AA. Bone and cementum induction by dentin, demineralized in situ. *J Periodontol.* 1973; 44: 49-54.
 39. Sampaio, LM. Eficiência do cloridrato de tetraciclina na remoção da “smear layer”, após instrumentação radicular; em diferentes

- concentrações, tempos e modos de aplicação. Análise através de microscopia eletrônica de varredura [tese]. Araraquara (SP): UNESP; 2001.
40. Sterret JD, Simons J, Whitford G, Russell CM. Tetracycline demineralization of dentin: the effects of concentration and application time. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 457-463.
 41. Sterrett JD, Dhillon M, Murphy HJ. Citric acid demineralization of cementum and dentin: the effect of application pressure. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 434-441.
 42. Terranova VP, Franzetti LC, Hic S, DiFlorio RM, Lyall RM, Wikesjö UME et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J Periodontol Res.* 1986; 21: 330-337.
 43. Trombelli L, Scabbia A, Calura G. Nondiseased cementum and dentin root surface following tetracycline hydrochloride conditioning: SEM study of the effects of solution concentration and application time. *Int J Periodont Rest Dent.* 1994; 14: 461-470.
 44. Trombelli L, Scabbia A, Zangari F, Griselli A, Wikesjö UME, Calura G. Effect of tetracycline HCL on periodontally-affected human root surfaces. *J Periodontol.* 1995; 66: 685-691.
 45. Wikesjö UME, Baker PJ, Christersson LA, Genco RJ, Lyall RM, Hic S, et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: Tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *J Periodontal Res.* 1986; 21: 322-329.
 46. Yamalik N, Tunçkanat F, Ataoglu T, Sengun D. Effect of systemic doxycycline administration on the subgingival microbial flora: a dark-field microscopy study. *J Nihon Univ Sch Dent.* 1991; 33: 108-114.

Anexos

- a. Certificado do Comitê de Ética da FOP/UNICAMP nº 040/2003.