

VANESSA BELLOCCHIO BERBER

VERIFICAÇÃO DA REDUÇÃO DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*
NO CANAL RADICULAR E NOS TÚBULOS DENTINÁRIOS
UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS
AUXILIARES E TÉCNICAS DE INSTRUMENTAÇÃO: ESTUDO *IN*
VITRO.

Dissertação apresentada ao Curso de
Clínica Odontológica, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção
do Título de Mestre em Clínica
Odontológica, Área de Endodontia.

PIRACICABA

2005

VANESSA BELLOCCHIO BERBER

VERIFICAÇÃO DA REDUÇÃO DO *ENTEROCOCCUS FAECALIS* NO
CANAL RADICULAR E NOS TÚBULOS DENTINÁRIOS UTILIZANDO
DIFERENTES SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS AUXILIARES E TÉCNICAS DE
INSTRUMENTAÇÃO: ESTUDO *IN VITRO*.

Dissertação apresentada ao Curso de Clínica Odontológica, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Clínica Odontológica, Área de Endodontia.

Orientadora: Prof. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz

Prof. Dr. José Luis Lage-Marques

PIRACICABA

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

B45v Berber, Vanessa Bellocchio.
Verificação da redução do *Enterococcus faecalis* no canal radicular e nos túbulos dentinários utilizando diferentes substâncias químicas e técnicas de instrumentação: estudo *in vitro*. / Vanessa Bellocchio Berber. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.

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

1. Endodontia. 2. Compostos químicos. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em inglês: Reduction of *Enterococcus faecalis* within root canal and dentinal tubules using different auxiliary chemical substances and instrumentation techniques: *in vitro* study

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): Endodontics; Chemical compounds

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca examinadora: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes; José Luiz da Silva Lage-Marques; Caio Cezar Randi Ferraz

Data da defesa: 22/02/2005



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 22 de Fevereiro de 2005, considerou a candidata VANESSA BELLOCCHIO BERBER aprovada.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "BPA", written above a horizontal line.

PROF^a. DR^a. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

A handwritten signature in black ink, appearing to be "JL", written above a horizontal line.

PROF. DR. JOSÉ LUIZ DA SILVA LAGE MARQUES

A handwritten signature in black ink, appearing to be "CF", written above a horizontal line.

PROF. DR. CAIO CEZAR RANDI FERRAZ

Dedico este trabalho,

*aos meus pais Léa e José Carlos pelo exemplo de
companheirismo, amor, carinho e dedicação às filhas;*

*pela educação, segurança e força que determinaram e
iluminaram meus caminhos;*

*por investir nos meus sonhos, muitas vezes deixando de
lado, os seus sonhos.....*

*à minha irmã **Andressa** pelo amor, carinho, amizade, pelos momentos de descontração e risadas que, de uma maneira especial, consegue nos proporcionar.*

*à minha família, em especial , meus avós **Léo** (in memorian) e **Wanda, Martins** (in memorian) e **Rute** (in memorian) pelo sentimento de união e carinho que nos ensinaram e que aprendemos tão bem.*

*ao Georges (Ge) pelo amor, carinho, amizade,
cumplicidade, companheirismo, paciência;
pela confiança nos momentos de dúvida;
pelo empenho na realização dos meus sonhos e pela
longa espera na realização dos nossos ;*

Agradecimentos.....

A Deus,

Pela força nos momentos em que não a tive,

Pela atenção nos momentos de carência,

Pela sabedoria nos momentos decisivos,

*Pela minha vida, família, namorado e amigos e por transmitir, através
deles, sua luz e seu amor.....Sou eternamente grata.*

À minha Orientadora,

Prof. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

por ter despertado em mim, logo na graduação, o interesse pela pesquisa através de sua dedicação, dinamismo e desprendimento;
por tê-la como exemplo de competência na sua capacidade em conduzir a vida pessoal e profissional com devida atenção e zelo.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP), pelo apoio financeiro durante o curso de mestrado (Projeto: 02/12464-7).

Ao **Antonio** e a **GS Brasil** representando as empresas **MicroMega** e **DYNA**, pelo fornecimento dos instrumentos utilizados neste trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do **Magnífico Reitor Prof. Dr. Carlos Henrique de Brito Cruz** e vice-reitor **Prof. Dr. José Tadeu Jorge**.

À Direção da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do Diretor **Thales R. de Matos Filho** e Vice-Diretor **Mario de Góes**.

Ao **Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen**, coordenador geral dos cursos de Pós-Graduação e **Prof. Dr. Roger William Fernandes Moreira**, coordenador do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

Ao ***Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**, responsável pela área de Endodontia da FOP UNICAMP, pelo exemplo de competência, dinamismo e por ter dado oportunidade à realização deste trabalho.*

Aos ***Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, Profa Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, , Prof. Dr. Francisco José de Souza-Filho**, professores da disciplina de Endodontia da FOP -UNICAMP, pelos ensinamentos transmitidos, pela atenção dispensada sempre que solicitados e pela inestimável amizade.*

Ao ***Prof. Dr. Luiz Valdrighi**, pelo carinho, atenção, ensinamentos e toda experiência transmitida durante meus cursos de Especialização e Mestrado.*

Ao Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia e Joelis Pupo, componentes da banca examinadora do Exame de Qualificação, pelo tempo dispensado na avaliação deste trabalho com seriedade e critério.

Ao Adailton dos Santos Lima, Rubens Marques Payão, Maria Aparecida Dalcheco Buscariol e Denize Lumena de Pinho pela amizade, pelo carinho com que receberam-me e se dispuseram a ajudar-me todas as vezes que os solicitei.

Às estagiárias da Disciplina e futuras pós-graduandas, Danna Mota Moreira, Ana Carolina Machado Rocha Lima e Maraísa Greggio Delboni pelos momentos de descontração e amizade.

Aos colegas da pós-graduação, Cícero Romão Gadê Neto, Éricka Tavares Pinheiro, Ezilmara Rolim de Sousa, Ronaldo, Fabio Dametto, Daniel Pinto de Oliveira, Tétis Sauáia, Douglas Cortes, Helena Rabang, Iadasa de Quadros, Rogério Castilho Jacinto e Morgana Eli Vianna, pela amizade, convívio e colaboração durante todo este período.

A aluna de iniciação científica, Cíntia Tcheou pela convivência e amizade.

Aos colegas de Mestrado Neylla Teixeira Senna, Juliana Nascimento Santos, Marcelo Menini, José Flávio Afonso de Almeida e Adriana de Jesus Santos, pelo carinho, amizade, companheirismo nestes 2 anos e que tornaram nosso laboratório um cantinho especial.

À Poliana, Juliana e Luciana, “minhas roommates” prediletas que, cada uma da sua maneira, conseguiram trazer alegrias no momento de desespero, e tranquilidade para enfrentar as dificuldades do dia-a-dia.

À **Neylla e Morgana** que estarão para sempre no meu coração, na correria do laboratório e nos atropelos da vida.

.....Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1 Microbiota dos canais radiculares infectados	9
2.2 Viabilidade dos microrganismos nos túbulos dentinários	16
2.3 Substâncias químicas auxiliares	19
2.4 Técnicas de instrumentação	24
2.5 Método de estudo	26
3. PROPOSIÇÃO	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Materiais	29
4.1.1 Dentes	29
4.1.2 Microrganismo	29
4.1.3 Meio de cultura	29
4.1.4 Substâncias químicas auxiliares	29
4.1.5 Solução irrigadora	29
4.1.6 Soluções neutralizadoras	30
4.1.7 Testes bioquímicos de identificação bacteriana	30
4.1.8 Instrumentos	30
4.2 Métodos	30
4.2.1 Seleção e preparo dos dentes	30
4.2.2 Grupos experimentais	31
4.2.3 Contaminação dos espécimes com <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	33
4.2.4 Coleta bacteriana inicial	36
4.2.5 Descrição das técnicas de instrumentação	36
4.2.6 Irrigação dos canais radiculares	39
4.2.7 Coleta final	39

4.2.8	Preparo das coletas (diluição, contagem das unidades formadoras de colônias)	40
4.2.9	Desinfecção dos túbulos dentinários pelas substâncias químicas auxiliares	42
5.	RESULTADOS	45
6.	DISCUSSÃO	67
7.	CONCLUSÕES	77
8.	REFERÊNCIAS	79
9.	ANEXOS	97

Resumo

Uma infecção pulpar pode resultar na colonização microbiana de todo sistema de canais radiculares incluindo os túbulos dentinários. Estes microrganismos e seus produtos metabólicos tóxicos são responsáveis pelo desenvolvimento e persistência de periodontite apical de origem endodôntica. Este estudo teve como objetivo testar *in vitro* o uso de substâncias químicas auxiliares do preparo mecânico (clorexidina (CLX) gel e líquida 2%, hipoclorito de sódio (NaOCl) 5,25%, 2,5% e 0,5% e soro fisiológico) e técnicas de instrumentação (Híbrida; Cérvico-Apical (FOP-UNICAMP); instrumentação rotatória com HERO 642) na redução de *Enterococcus faecalis* no canal radicular e nos túbulos dentinários. Para tanto, 270 raízes de pré-molares inferiores foram autoclavadas e contaminadas por 21 dias com *Enterococcus faecalis*. Em seguida, foram divididas em 18 grupos nos quais as técnicas de instrumentação foram testadas variando o uso das substâncias químicas auxiliares. Amostras bacteriológicas do canal radicular foram coletadas antes e imediatamente após o preparo químico-mecânico, as quais foram cultivadas a fim de se determinar as unidades formadoras de colônia (UFC). Após a instrumentação, as raízes foram seccionadas em 3 blocos: apical, médio e cervical. Amostras de dentina foram removidas seqüencialmente com brocas tronco-cônicas. As raspas obtidas foram coletadas em tubos com BHI e plaqueadas em BHI ágar-sangue. As placas foram incubadas por 48 horas para posterior contagem das UFC. Na luz do canal radicular, todas as substâncias, inclusive o soro fisiológico quando associados à instrumentação mecânica, promoveram uma redução de quase 100% nas coletas microbiológicas imediatamente após o preparo químico-mecânico. Nas coletas resultantes das raspas de dentina, em todos os terços, técnicas e profundidades o NaOCl 5,25% e a CLX gel 2% obtiveram os melhores resultados na redução bacteriana dos túbulos dentinários seguidos do NaOCl 2,5%, CLX líquida 2% e NaOCl 0,5%. Concluiu-se que, o NaOCl 5,25% seguido pela CLX gel 2% juntamente com as técnicas Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP e HERO, foram

mais efetivos na eliminação do *E.faecalis* dos túbulos dentinários e do canal radicular.

Palavras-chaves: terapia endodôntica, substâncias químicas auxiliares, técnicas de instrumentação, *E.faecalis*, túbulos dentinários.

Abstract

An infection of the pulp can result in microbial colonization of the entire root canal system, together with the dentinal tubules adjacent to the canal. These microorganisms and their toxic metabolic products are responsible for the development and persistence of apical periodontitis of endodontal origin. The aim of this study was to evaluate *in vitro* the efficacy of 6 chemical agents used during chemo-mechanical preparation (0.5%, 2.5%, 5.25% sodium hypochlorite; 2% chlorhexidine liquid and gel; sterile saline –negative control) and 3 instrumentation techniques (Hybrid, Crown-Down by FOP-UNICAMP; HERO 642 system) against *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. Two hundred and seventy freshly extracted human mandibular premolars were infected *in vitro* for 21 days with *E. faecalis*. The specimens were divided into 18 groups, according to the auxiliary chemical substances and instrumentation techniques used. Canals were sampled before and immediately after preparation. After serial dilution, samples were plated onto BHI agar, and the colony forming units (CFU) that were grown were counted. Then, the teeth were sectioned in thirds, and dentine chips were removed from the canals with sequential sterile conic burs at low speed. The samples obtained with each bur were immediately collected in separate test tubes containing BHI broth. The tubes were incubated at 37°C and plated onto BHI agar. The CFU were counted and analyzed. In the canal samples, all substances including sterile saline, promoted almost 100% of CFU reduction immediately after biomechanical procedures. In samples of dentinal chips, in all instrumentation techniques, in all thirds, in all dentinal depths tested, 5.25% NaOCl and 2% chlorhexidine gel obtained the best results, followed by 2.5% NaOCl, 2% chlorhexidine liquid and 0.5% NaOCl. It can be concluded that 5.25% NaOCl followed by 2% chlorhexidine gel together with Crown-Down by FOP-UNICAMP or HERO 642 system seem to be more effective in eliminating *E. faecalis* in the canal and dentinal tubules than the other ones tested in this study.

Keywords: root canal therapy, intracanal chemical agents, dentinal tubules, instrumentation techniques, *E.faecalis*.

1. INTRODUÇÃO

A endodontia durante muito tempo teve como objetivo imediato eliminar a dor do paciente, restringindo-se a trocas sucessivas de medicação intracanal, sem preocupação com o saneamento do mesmo (Kutler 1961).

Miller (1894), através de análise bacteriológica de esfregaços obtidos de canais com polpas necróticas, evidenciou a presença de bactérias. Somente através do estudo clássico de Kakehashi *et al.*, em 1965, a importância das bactérias no desenvolvimento das doenças pulpares e perirradiculares foi confirmada, pois ao expôr a polpa dental de ratos convencionais e “germ-free” à cavidade oral, observaram a formação de necrose pulpar e lesão perirradicular somente nos ratos convencionais.

Enterococcus faecalis tem sido um dos poucos microrganismos anaeróbios facultativos associados à *flare-ups* (Matusow 1995), às infecções secundárias e aos casos de insucesso do tratamento endodôntico (Engström *et al.* 1964, Haapasalo *et al.* 1983, Sundqvist *et al.* 1998). A propósito, Sundqvist em 1992 (a), enfatizou que os *Enterococcus faecalis* são capazes de causar e manter infecções de difícil tratamento, pois são microrganismos resistentes a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos. Por isso, a eliminação ou a máxima redução dos microrganismos e seus subprodutos e a prevenção de reinfecção do sistema de canais radiculares têm sido os principais objetivos da prática endodôntica moderna.

Molander *et al.* (1998) examinaram microbiologicamente 100 dentes com tratamento endodôntico apresentando lesões perirradiculares. Os microrganismos anaeróbios facultativos corresponderam a 68% das cepas bacterianas isoladas, das quais 32% foram *Enterococcus faecalis*, sugerindo que

este microrganismo exerce um papel importante no insucesso do tratamento endodôntico.

A terapia endodôntica visa a eliminação da infecção o mais completamente possível. Todavia, há evidências de que embora seja feita uma adequada instrumentação dos canais radiculares, bactérias podem não ser eliminadas de maneira efetiva em alguns casos (Chong & Pitt Ford 1992, Peters *et al.* 1995, Weiger *et al.* 2002). Estes microrganismos e/ou seus subprodutos irão interferir no processo de recuperação periapical, podendo ser um dos principais fatores do insucesso endodôntico.

Durante o preparo utilizando como agente irrigante a solução salina, a quantidade de bactérias presentes é reduzida significativamente, mas não de maneira tal que se possa concluir o tratamento endodôntico em uma única sessão (Byström & Sundqvist 1981). A ação mecânica dos instrumentos endodônticos é incapaz de promover completa desinfecção de algumas áreas devido às complexidades anatômicas dos canais. Para tanto, é importante ressaltar a necessidade da utilização de substâncias químicas auxiliares com o intuito de se promover uma significativa redução dos depósitos bacterianos nos canais radiculares, uma vez que auxiliarão na lubrificação do canal durante a ação de corte dos instrumentos, na remoção de *smear layer*, na desinfecção, eliminação do exsudato, dissolução do tecido pulpar necrosado (Spangberg 1982; Byström & Sundqvist 1983).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) tem sido usado amplamente como substância química auxiliar ao preparo químico-mecânico. NaOCl tem uma atividade antibacteriana de amplo espectro pois elimina bactérias vegetativas, esporos bacterianos, fungos, protozoários e vírus (Siqueira *et al.* 1998, McDonnell & Russell 1999); além de dissolver tecidos necróticos (Spangberg *et al.* 1973). Entretanto, é incapaz de remover a *smear layer* (Ciucchi 1989), é citotóxico e

lesivo aos tecidos periapicais (Tanomaru *et al.* 2002, Gernhardt *et al.* 2004) apresentando ainda, casos de alergia (Pashley 1985).

A clorexidina apresenta alta atividade antibacteriana (Greenstein *et al.* 1986), tendo ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e contra leveduras. Esta ação é devido à ligação de moléculas catiônicas às paredes celulares das bactérias. Em altas concentrações seu efeito é bactericida, pois age rompendo a parede celular. Em baixas concentrações sua ação é bacteriostática inibindo as funções da membrana, o que resulta em um efeito residual mantido por várias horas depois da aplicação (Greenstein *et al.* 1986, White *et al.* 1997). Na terapia endodôntica a clorexidina tem sido usada como substância química auxiliar ao preparo químico-mecânico (Ferraz *et al.* 2001, Gomes *et al.* 2001, Dametto *et al.* *in press*) e como medicação intracanal (Siqueira & Uzeda 1997, Schäfer & Bossmann 2001a, Gomes *et al.* 2003 a, b), apresentando bons resultados apesar de não dissolver tecidos pulpares remanescentes (Ferraz *et al.* 2001, Okino *et al.* 2004).

Muitos interesses existem sobre a influência das bactérias deixadas no interior dos túbulos dentinários após o preparo químico-mecânico (Abbott *et al.* 1989, Abbott 1990, Peters *et al.* 1995, 2000, Gomes *et al.* 2003b). É questionável se estes microrganismos seriam capazes de sobreviver e até se multiplicar em número suficiente para produzir toxinas que mantenham ou desenvolvam inflamação periapical após uma adequada instrumentação mecânica, uma irrigação eficiente, após uso de uma substância química auxiliar de comprovada ação antimicrobiana e uma obturação de boa qualidade (Peters *et al.* 1995, 2000).

Novos instrumentos e técnicas têm sido propostos na preparação do canal radicular. Instrumentos rotatórios de níquel titânio (NiTi) com conicidades crescentes e diferentes modelos têm sido recentemente desenvolvidos. A propriedade superelástica do NiTi, associada a um avançado *design*, permite uma livre e efetiva instrumentação usando-se contra-ângulo redutor de velocidade na

direção coroa – ápice (Shuping *et al.* 2000). Geralmente a rotação utilizada num contra-ângulo convencional é de 18.000 rpm, enquanto que usando um redutor de velocidade em endodontia a rotação varia de 300,400 ou 600 rpm (Karagoz-Küçükay *et al.* 2003).

Embora estes instrumentos e técnicas modernas tenham demonstrado uma melhora na forma do preparo (Pettiette *et al.* 1999), pouco se sabe sobre sua capacidade em eliminar os microrganismos presentes no sistema de canais.

Existem poucos trabalhos investigando a ação conjunta de substâncias químicas auxiliares e novas técnicas de instrumentação na redução do *Enterococcus faecalis* e nenhum deles, avaliou até o momento, o efeito do preparo químico-mecânico em toda extensão dos túbulos dentinários. Com a expectativa de preencher esta lacuna, este trabalho foi realizado e como objetivo principal pretendeu analisar, *in vitro*, a redução do número de *Enterococcus faecalis* com o uso de substâncias químicas auxiliares como a clorexidina líquida e gel a 2% e hipoclorito de sódio 5,25%, 2,5% e 0,5% e técnicas de instrumentação no canal e nos túbulos dentinários de dentes humanos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiota dos canais radiculares infectados

Embora fatores químicos e físicos possam induzir inflamações periapicais, é evidente que os agentes microbianos são essenciais para a propagação e perpetuação de doenças inflamatórias periapicais (Kakehashi *et al.* 1965, Möller 1966, Sundqvist 1976, Möller *et al.* 1981). Com o estudo de Kakehashi *et al.*, em 1965, a importância das bactérias no desenvolvimento das doenças pulpares e perirradiculares foi confirmada. Ao expor a polpa dental de ratos convencionais e ratos “germ-free” à cavidade oral, pôde-se observar apenas a presença de necrose pulpar e lesão perirradicular nos ratos convencionais.

Apesar de a diversidade microbiana ter um importante papel na patogenicidade, resultados recentes têm sugerido que diferentes formas de doenças perirradiculares podem apresentar etiologias bacterianas específicas. De um total de mais de 500 espécies microbianas que colonizam a cavidade oral, um grupo de aproximadamente 15-30 espécies têm sido frequentemente detectadas em canais radiculares infectados. Estas espécies podem ser responsáveis pela maioria das doenças periapicais em humanos (Gomes 2002).

No interior dos canais radiculares ocorre uma seleção dos microrganismos, e esta seleção deve-se a fatores como: nutrição, baixo potencial de oxidação-redução, pH, temperatura, interações positivas e negativas entre os microrganismos, além dos mecanismos de defesa do hospedeiro e presença de agentes antimicrobianos e inibidores. Estes fatores tendem a favorecer o crescimento de espécies anaeróbias (Marsh & Martin 1992, Gomes *et al.* 1996 a, Gomes 2002).

As bactérias do interior do sistema de canais radiculares necessitam de nutrientes tais como desintegração celular, fluidos teciduais e componentes do tecido conjuntivo. A disponibilidade nutricional é de extrema importância na composição da microbiota das infecções endodônticas (Sundqvist 1992 b). A presença de nutrientes como carboidratos, glicoproteínas, aminoácidos e proteínas respaldam as mudanças graduais da microbiota sacarolítica presente no início da infecção. Numa fase intermediária os carboidratos são removidos de glicoproteínas e seu conteúdo é esgotado. Ocorrendo a hidrólise das proteínas e fermentação de aminoácidos, ou seja, há a transição da microbiota sacarolítica para proteolítica. Os gêneros *Prevotella*, *Eubacterium*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium* são freqüentemente associados e encontrados neste período. Seguidamente a esta etapa, com o aumento da fermentação de aminoácidos e peptídeos para a obtenção de energia, ocorre um predomínio de *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Eubacterium* e *Fusobacterium nucleatum*. Após o término das fontes nutricionais existentes nos fluidos teciduais, bactérias que hidrolisam proteínas como *Prevotella spp.*, *Porphyromonas spp.* e *Actinomyces spp.* assumem um papel importante nas infecções mistas fornecendo peptídeos utilizados por espécies dos gêneros *Eubacterium* e *Fusobacterium*, que não possuem a capacidade de clivagem de proteínas (Jansen & Van der Hoeven 1997, Lopes & Siqueira 1999).

Tronstad *et al.*, em 1990, relataram a importância do pH tecidual na instalação da microbiota. Em tecidos necrosados o pH é de aproximadamente 6 ou seja, ligeiramente ácido o que proporciona o estabelecimento de diversas espécies bacterianas. Por outro lado, em tecidos saudáveis, o pH é de aproximadamente 7.2 a 7.4, ou seja, ligeiramente básico o que dificulta a ação de enzimas bacterianas.

A concentração de oxigênio também é outro fator determinante na composição da microbiota endodôntica. Na fase inicial, em que o oxigênio está presente em grande quantidade nos tecidos há uma prevalência de bactérias

facultativas. Com o início da necrose tecidual, a tensão de oxigênio é reduzida pela ausência da microcirculação. Com isso, há uma elevação da quantidade de microrganismos anaeróbios estritos devido ao baixo potencial de óxido-redução (Gomes 1995, Lopes & Siqueira 1999).

Interações entre as espécies bacterianas presentes nas diversas fases do estabelecimento da infecção endodôntica influenciam fortemente no estabelecimento da microbiota infectante, podendo até exacerbar um processo infeccioso. Associações resistentes de interdependência mútua proporcionam mudanças consideráveis na microbiota endodôntica. Estas associações são provavelmente baseadas em demandas de relações nutricionais (Sundqvist 1992b, Gomes *et al.* 1994a, 1996b). As interações entre as espécies bacterianas presentes no canal radicular podem ser consideradas positivas (mutualismo e comensalismo), quando ambas as espécies são beneficiadas ou apenas uma se beneficia sem que a outra seja afetada; ou negativas (antagonismo e competição) quando uma determinada bactéria se beneficia da outra disputando espaços e nutrientes no interior do canal radicular, ou liberando substâncias (bacteriocinas ou metabólitos) que inibem o crescimento de outra espécie (Gomes *et al.* 1994 a, 1996 a; Siqueira *et al.* 1997). Relação positiva é encontrada entre os bacilos produtores de pigmento negro (BPPN= “*Bacteroides* black-pigmented” = “*Bacteroides melaninogenicus*”) que necessitam de vitamina K (menadiona) que é fornecida por *Veillonella* spp.; hemina, fornecida por *Campylobacter* spp.; e succinato fornecido por *Fusobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Capnocytophaga* spp., *Eikenella corrodens*, *Streptococcus* spp. e *Actinomyces* spp., como subprodutos metabólicos (Mayrand & McBride 1980, Gomes *et al.* 1994 a,b, 1996 b). Relação negativa é encontrada nos facultativos *Streptococcus sanguis*, que produzem uma enzima denominada bacteriocina (ex. sanguina). Sanguina inibe o crescimento de bactérias anaeróbias estritas como *Prevotella* spp. e/ou CO₂ dependentes como *Capnocytophaga* spp. (Sundqvist 1992 b, Gomes *et al.* 1994b).

Geralmente, as bactérias anaeróbias facultativas são mais resistentes à atividade antimicrobiana do que os anaeróbios estritos, podendo persistir em canais radiculares após a terapia endodôntica. Os microrganismos anaeróbios facultativos podem permanecer em uma fase latente, com uma baixa taxa metabólica por um período de tempo, mas mudanças ambientais, como uma infiltração coronária, podem levar a ativação destes microrganismos e conseqüente proliferação dos mesmos (Molander *et al.* 1998). Spratt *et al.*, em 2001, relataram que os gêneros bacterianos implicados com o insucesso são: *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp.

Enterococos causam uma ampla variedade de infecções em humanos e comumente podem afetar o trato urinário (Felmingham *et al.* 1992); causar bacteremia (Graninger & Ragette 1992); infectar o endocárdio (Eliopolous 1992), o trato biliar (Khardori *et al.* 1991), queimaduras (Jones *et al.* 1986) e próteses (Richet *et al.* 1990). Esse gênero bacteriano também pode estar correlacionado a infecções endodônticas, embora, participe em menor proporção da microbiota inicial a qual é predominantemente composta por espécies Gram-negativas (Sundqvist 1992a, Le Goff *et al.* 1997). Em contrapartida, os enterococos são freqüentemente isolados de canais de dentes obturados que apresentam patologia periapical crônica. *Enterococcus faecalis* é o responsável por 80-90% das infecções enterococais humanas (Ruoff *et al.* 1990) além de ser a espécie enterococal dominante é comumente a única espécie encontrada em casos de retratamento dos canais radiculares (Dahlen *et al.* 2000). *Enterococcus faecalis* produzem elastase, proteases e hemolisinas que são fatores de virulência que possuem papéis relevantes na patogênese das periodontites. Além destes fatores, várias cepas podem produzir betalactamase, tornando-os capazes de causar infecções difíceis de serem tratadas (Rams *et al.* 1992; Sundqvist 1992 b).

Engström, em 1964, verificou que *Enterococcus* spp. estavam presentes em 20,9% das amostras de dentes com tratamento endodôntico prévio,

enquanto representavam 12,1% das amostras de polpas necrosadas. O autor relatou a dificuldade de eliminação destes microrganismos do interior dos canais radiculares.

As bactérias entéricas não estão comumente presentes na microbiota de canais radiculares de dentes primariamente infectados, ao passo que, fazem parte da composição da microbiota de dentes com infecção resistente ao tratamento endodôntico. Este fato pode estar relacionado a dois fatores: 1) a maior suscetibilidade de outras bactérias ao tratamento endodôntico e conseqüentemente maior resistência destas à terapia faria com que a pequena quantidade de bactérias entéricas na infecção original se multiplicasse; 2) as entero-bactérias entrariam no canal radicular durante o tratamento endodôntico através de um isolamento inadequado do campo operatório, infiltração bacteriana advinda de um material restaurador temporário, ou quando o dente é deixado aberto para uma suposta drenagem do canal (Siren *et al.* 1997).

Com o objetivo de estudar a relação entre os procedimentos clínicos e a presença de bactérias entéricas facultativas, Siren *et al.* (1997) realizaram coletas microbiológicas durante diferentes procedimentos endodônticos. Os resultados mostraram que o *Enterococcus faecalis*, outras bactérias entéricas facultativas (*Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp.) e *Pseudomonas* spp. foram mais freqüentemente encontradas em casos de não selamento dos canais radiculares em alguma etapa do tratamento endodôntico, ou em casos com grande número de sessões.

Ao identificar, pelo método de cultura microbiológica, a microbiota de dentes tratados endodonticamente que apresentavam lesão periapical persistente em dentes recém-extraídos, Adib *et al.* (2004) concluíram que o grupo bacteriano predominante nestes casos foi o dos anaeróbios facultativos Gram-positivos, principalmente os *Staphylococcus* spp., seguido dos *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp.

Pinheiro *et al.* (2003) através de coletas microbiológicas de canais radiculares que necessitavam de retratamento verificaram que a espécie bacteriana mais freqüentemente isolada foi o *Enterococcus faecalis* apresentando-se em 52,94% dos canais radiculares com crescimento microbiano. Neste mesmo estudo, dos 27 casos com a presença deste microrganismo, *E.faecalis* foi encontrado isoladamente em 18 casos. Peciuliene *et al.* (2000, 2001) encontraram cultura pura de *E.faecalis*, em 5 dos 14 casos, e em 11 dos 21 casos, respectivamente, em que este microrganismo estava presente. Estes achados vão ao encontro de trabalhos como o de Molander *et al.* (1998) e Sundqvist *et al.* (1998) que, respectivamente encontraram o *E.faecalis* em 47% e 38% dos casos de retratamentos endodônticos com cultura positiva.

Em estudos como o de Rôças *et al.* (2004) usando PCR, *E.faecalis* esteve significativamente mais associado a casos assintomáticos de infecções primárias do que nos casos sintomáticos, estando a sua presença correlacionada a infecções persistentes. A prevalência deste microrganismo em infecções primárias obteve índices altos quando comparado a estudos utilizando técnicas de identificação através dos métodos de cultura bacteriana ou hibridização de DNA - DNA checkerboard.

Estes fatos indicam que o *E.faecalis* possui um papel patogênico nos insucessos de tratamentos endodônticos. Alguns estudos sugerem que a virulência do *E.faecalis* pode estar relacionada à resistência a certos medicamentos e à capacidade de sobreviverem no interior dos canais radiculares como um organismo simples sem a necessidade de outras bactérias para sua subsistência (Fabricius *et al.* 1982).

Love (2001) verificou que a capacidade das células do *E.faecalis* em causar doença periapical em um dente tratado endodonticamente pode depender da competência das mesmas em invadir túbulos dentinários e permanecerem viáveis em seu interior. Os resultados deste estudo demonstraram que as células

desta bactéria permanecem viáveis, mantêm a capacidade de invadir túbulos dentinários e aderem ao colágeno na presença de soro humano.

Ao investigar *in vitro* a invasão bacteriana no interior dos túbulos dentinários da dentina radicular, Akpata e Blechman (1982) inocularam 40 dentes extraídos com *E. faecalis* e *Streptococcus sanguis*. Após 1, 2 e 3 semanas de incubação, cortes transversais das raízes foram realizados e avaliados histologicamente. Quanto maior o tempo de incubação, maior a invasão do *E. faecalis* nos túbulos dentinários, sendo essa mais efetiva no terço cervical, menos no terço médio e ainda menos no terço apical. Os resultados evidenciaram a relação existente entre tempo e invasão bacteriana, bem como, o modo de distribuição dos microrganismos nos diferentes segmentos da dentina radicular.

Ando e Hoshino (1990) recolheram amostras de dentina em 8 dentes contaminados que foram avaliadas após a extração dos mesmos. O conteúdo dos túbulos dentinários de 0,5 a 2,0 mm, a partir da luz do canal, foram cultivados. Todos os espécimes apresentaram infecção mista, predominantemente composta por anaeróbios estritos Gram-positivos. Em nenhuma amostra da dentina radicular foi isolado bacilo Gram-negativo. Portanto, o ambiente proporcionado às bactérias no interior da dentina radicular é, essencialmente, anaeróbio. Os autores enfatizaram a necessidade do emprego de drogas antibacterianas de uso intracanal com boa penetrabilidade, no sentido de descontaminar a dentina em profundidade.

O estudo de Oguntebi (1994) verificou que o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios poderia ser propiciado pelo microambiente fornecido pelos túbulos dentinários, permitindo, assim, a reinfecção do canal radicular através deste sistema. Os estudos demonstraram também, que o preparo químico-mecânico não seria suficiente para eliminação dos microrganismos presentes no sistema de canais radiculares e a medicação intracanal estaria indicada nos casos de infecção endodôntica.

2.2 Viabilidade de bactérias no interior dos túbulos dentinários

Shovelton, em 1964, pelo método de cultura microbiológica, ao coletar amostras do canal radicular com o auxílio de limas de grandes diâmetros, verificou que microrganismos estariam alojados no interior dos canalículos dentinários e sua não eliminação poderia resultar em fracasso no tratamento endodôntico. Relatou, também, que a penetração bacteriana geralmente é limitada pela pré-dentina mas algumas vezes pode se estender através da dentina.

O diâmetro dos túbulos dentinários é inteiramente compatível com o da maior parte das bactérias encontradas na cavidade oral, variando de 2,5 μm próximo à polpa, 1,2 μm na dentina mediana, e 0,4 μm próximo ao cimento (Garberoglio & Brannström 1976). Os microrganismos capazes de colonizar os canais radiculares possuem tamanho aproximado de 1/3 do diâmetro dos túbulos dentinários, o que facilita a invasão, proliferação e colonização destes no interior da dentina. Entretanto, bactérias irão multiplicar nos túbulos dentinários, no sistema de canais radiculares e nos tecidos periapicais somente se estes ambientes oferecerem condições favoráveis ao seu crescimento (Gomes *et al.* 1996 a).

Os túbulos dentinários além de servirem para a manutenção da doença periapical como depósitos bacterianos, podem ser considerados uma das principais vias de contaminação pulpar quando expostos às bactérias do meio oral, principalmente após a perda de esmalte ou de cimento. Esses túbulos se estendem da polpa até as junções dentina-esmalte e cimento-dentina. Embora não tenha sido realizada uma quantificação real dos túbulos dentinários, eles são em grande quantidade: aproximadamente 15.000 túbulos em 1 milímetro quadrado de dentina perto da junção cimento-dentina. Devido ao diâmetro e quantidade de túbulos na dentina, os microrganismos são capazes de penetrar, multiplicar-se e invadir numerosos túbulos expostos (Kettering & Torabinejad 2000). Entretanto, parece haver uma variação regional na extensão da dentina invadida. O terço

cervical é invadido mais extensamente que o terço médio e este, mais que o apical (Love 1996). Qualquer método utilizado para desinfecção do canal radicular deve ser capaz de acessar e eliminar o máximo de microrganismos possível de todas as partes do sistema endodôntico (Coldero *et al.* 2002).

Polpas vitais não são facilmente invadidas por microrganismos, pois a presença de fluido dentinário, lâmina limitante, fibras colágenas, prolongamentos odontoblásticos serviria como defesa contra essa invasão. Outros fatores como esclerose dentinária, dentina reparadora, *smear layer* e deposição de proteínas plasmáticas, como fibrinogênio, nas paredes tubulares, podem limitar ou impedir o avanço bacteriano via túbulos dentinários. Por sua vez, túbulos dentinários de dentes necrosados ou de dentes que foram submetidos ao tratamento endodôntico seriam invadidos por microrganismos com maior facilidade (Nagaoka *et al.* 1995, Sen *et al.* 1995) constituindo-se importantes reservatórios de microrganismos, por meio dos quais a reinfecção pode ocorrer. O terço apical, onde o cemento é de natureza celular, abriga esses microrganismos que poderão manter a lesão periapical (Ørstavik & Haapasalo 1990, Peters *et al.* 1995). Estes autores também afirmam que no interior dos túbulos dentinários, os microrganismos estão protegidos da solução irrigadora, medicação intracanal e dos instrumentos endodônticos, sendo responsáveis pelas infecções persistentes.

A penetrabilidade de microrganismos é dependente do período de infecção, tipo de microrganismo presente, localização dos túbulos dentinários, idade do paciente entre outros. Akpata & Blechman (1982) observaram uma maior penetrabilidade nos terços cervical e médio da dentina radicular, onde os túbulos são mais calibrosos e em maior número.

Estudos em microscopia eletrônica de varredura (Sen *et al.* 1995) utilizando dentes recém-extraídos, observaram a presença acentuada de bactérias em forma de cocos e bastonetes, constituindo-se em colônias, principalmente nas paredes dos canais radiculares, e também, em grau variado, penetrando nos

túbulos dentinários dos terços médio e apical das raízes. A profundidade atingida pelas bactérias foi em média 50 µm. Somente em alguns espécimes atingiram 150 µm de profundidade. Outros estudos como o de Siqueira *et al.* 1996, observaram que as bactérias anaeróbias também são capazes de penetrar nos túbulos dentinários em diferentes profundidades, onde não podem ser atingidas por instrumentos endodônticos.

Mesmo em casos de canais radiculares bem tratados, algumas bactérias podem permanecer vivas, devido às complexidades anatômicas do sistema de canais radiculares (Ida & Gutmann 1995). Bactérias presentes em regiões de istmos, ramificações, reentrâncias, túbulos dentinários, reabsorções radiculares externas, podem não ser afetadas pelas medidas usadas no controle da infecção endodôntica (Nair *et al.* 1987, 1990,1999).

Microrganismos sobreviventes às medidas de desinfecção podem morrer ou manterem-se viáveis, dependendo da quantidade de nutrientes disponíveis e da capacidade de sobreviver em condições de carência nutricional. Os microrganismos que permaneceram viáveis resultarão em fracasso somente se tiverem acesso aos tecidos periapicais, se forem patogênicos e se estiverem em número suficiente para induzir ou perpetuar uma lesão periapical (Gomes 1995, Gomes *et al.* 1996 b, Lopes & Siqueira 1999).

O advento de radiografias digitais, localizadores apicais, instrumentos rotatórios de níquel titânio e obturação termoplastificada tem tornado possível completar muitos tratamentos endodônticos em sessão única. Por isso, é importante utilizar uma substância química capaz de eliminar as bactérias presentes não só na luz como também em todo o sistema de canais radiculares (túbulos dentinários, istmos, canais acessórios, *etc*) em um curto espaço de tempo.

2.3 Substâncias químicas auxiliares

O tratamento endodôntico, ao utilizar métodos químico-mecânicos, busca romper o equilíbrio do ecossistema microbiano a fim de promover a desinfecção do sistema de canais radiculares. A limpeza e a modelagem na terapia endodôntica seguidas de uma obturação, a mais hermética possível do sistema de canais radiculares, são essenciais no sucesso do tratamento (Schielder 1974).

A ação mecânica dos instrumentos endodônticos é incapaz de promover completa desinfecção de algumas áreas devido às complexidades anatômicas dos canais. Para tanto, é importante ressaltar a necessidade da utilização de substâncias químicas auxiliares com o intuito de se promover uma significativa redução dos depósitos bacterianos nos canais radiculares, uma vez que, auxiliarão na lubrificação do canal radicular durante a ação de corte dos instrumentos, na remoção de *smear layer*, na desinfecção, dissolução do exsudato, dissolução do tecido pulpar necrosado e pré-dentina (Spangberg 1982, Byström & Sundqvist 1983).

Algumas substâncias químicas têm sido utilizadas com estes objetivos. Dentre elas o hipoclorito de sódio (NaOCl), gluconato de clorexidina, soro fisiológico, EDTA, ácido cítrico se destacam.

A partir da introdução do hipoclorito de sódio (NaOCl) como solução irrigadora em Endodontia (Walker 1936), esta substância química vem sendo amplamente utilizada. Sua ação antimicrobiana (Gomes *et al.* 2001, Ferraz *et al.* 2001, Vianna *et al.* 2004) e dissolução tecidual (Beltz *et al.* 2003, Naenni *et al.* 2004) têm sido demonstradas em vários artigos. O NaOCl é conhecido por sua excelente atividade antimicrobiana frente aos microrganismos encontrados no interior do sistema de canais radiculares (Byström & Sundqvist 1983; Foley *et al.* 1983; Hauman & Love 2003) e esta ação está relacionada com a formação de

compostos contendo cloro ativo, como o ácido hipocloroso e o íon hipoclorito (Lopes & Siqueira 1999; Vianna *et al.* 2004). A capacidade solvente tecidual do hipoclorito de sódio é atribuída ao hidróxido de sódio oriundo da reação do NaOCl com água (Abou-Rass & Piccinino 1982 ; Baumgatner & Cuenin 1992).

O hipoclorito de sódio por liberar o cloro apresenta uma função desodorizante sobre as bactérias produtoras de odor fétido através de sua ação oxidativa.

A toxicidade do NaOCl é diretamente proporcional à concentração (Spangberg *et al.* 1973, Becking 1991, Ferraz *et al.* 2001, Bondestam *et al.* 1996, Hülsmann & Hahn 2000, Tanomaru Filho *et al.* 2002). Gernhardt *et al.* 2004, demonstraram através de um caso clínico de reabsorção externa os efeitos lesivos aos tecidos moles proporcionados pela irrigação endodôntica com NaOCl e sugerem precauções. Por seu efeito cáustico, e descoloração do dente e tecido mole, uma solução com menos efeitos adversos tem sido testada. Como por exemplo, a clorexidina.

Ercan *et al.*, em 2004, avaliaram microbiologicamente, *in vivo*, a atividade antibacteriana proporcionada pela solução de gluconato de clorexidina 2% e pelo hipoclorito de sódio 5,25%, utilizados como substâncias químicas durante o preparo químico-mecânico. Amostras bacterianas foram coletadas antes e imediatamente após o preparo biomecânico com o uso destas substâncias e verificaram que ambos foram significativamente efetivos na redução dos microrganismos presentes em dentes com necrose pulpar e/ou patologia periapical, podendo ser utilizados, com sucesso, como substâncias químicas auxiliares. Estes dados conferem com os de Dametto *et al.* (*in press*), que testaram a ação antibacteriana do NaOCl 5,25% e da clorexidina 2% nas formas gel e líquida. Os autores verificaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos e concluíram que após 7 dias do preparo químico-mecânico, a clorexidina em ambas as formulações apresentou efeito residual mantendo

menores contagens de UFC de *Enterococcus faecalis*, quando comparada ao NaOCl 5,25%.

Clorexidina é um potente agente antimicrobiano largamente difundido na odontologia, principalmente, como auxiliar na terapia periodontal. A clorexidina, ou seja, o digluconato de clorexidina é uma bisguanida com importante papel na inibição e prevenção da placa dental e foi sugerida por Schroeder em 1969, como um agente antiplaca e antitártaro. Em endodontia, o seu uso como solução irrigadora (White *et al.* 1997, Ferraz *et al.* 2001, Gomes *et al.* 2001) e como curativo intracanal (Lynne *et al.* 2003, Gomes *et al.* 2003 ab, Zamany *et al.* 2003) tem sido intensamente pesquisado. É particularmente efetiva contra o *Enterococcus faecalis* (Gomes *et al.* 2001, Dametto *et al. in press*) além de outros microrganismos considerados resistentes (Epstein *et al.* 1991, Vianna *et al.* 2004).

Hennessey (1977) relata que a interação da clorexidina com as células bacterianas ocorre como segue: a) aderência à parede celular; b) alteração da permeabilidade da membrana celular; c) precipitação e coagulação do conteúdo citoplasmático.

Esta ação ocorre devido à aderência das moléculas catiônicas de clorexidina às paredes celulares dos microrganismos, que são carregadas negativamente, alterando a permeabilidade da membrana celular, o que resulta na perda dos componentes intracelulares e no desequilíbrio osmótico da célula. Em baixa concentração, a clorexidina promove a saída das substâncias de baixo peso molecular, como o potássio e o fósforo, exercendo assim o efeito bacteriostático. Em alta concentração, promove o efeito bactericida, pela precipitação ou coagulação do conteúdo citoplasmático, resultando na morte celular (Longworth 1971, Fardal & Turnbull 1986).

Devido ao seu grande espectro antimicrobiano, a clorexidina tem sido utilizada na Periodontia. Em Endodontia, seu uso tem sido proposto na forma de

sal digluconato, líquido ou gel, em diferentes concentrações tanto como “agente irrigante” dos canais radiculares (Parsons *et al.* 1980, Delany *et al.* 1982, Greenstein *et al.* 1986, Fardal & Turnbull 1986, Vahdaty *et al.* 1993, Jeansonne & White 1994, Leonardo *et al.* 1999, Ferraz *et al.* 2001, Öncag *et al.* 2003, Zamany *et al.* 2003, Ercan *et al.* 2004, Dametto *et al. in press*) quanto como medicação intracanal (Heling *et al.* 1992, Barbosa *et al.* 1997, Siqueira & Uzeda 1997, Lindskog *et al.* 1998, Gomes *et al.* 2003 a, b).

Seu efeito antibacteriano residual é devido a sua capacidade de se ligar a hidroxiapatita (Rölla *et al.* 1970). Portanto, uma liberação gradual da clorexidina ligada poderia manter um nível constante de moléculas que seriam suficientes para criar um ambiente bacteriostático no interior do canal radicular por um período prolongado de tempo, podendo esta sua atividade perdurar 48 horas ou 72 horas (White *et al.* 1997) como relatado na literatura. Esta propriedade a difere de outros desinfetantes que rapidamente se dissipam e não têm efeito antibacteriano residual (Messer & Chen, 1984).

Jung *et al.* (1999) sugeriram o uso da clorexidina como uma prevenção a reinfecção do canal radicular pós -tratamento endodôntico. Em dentes bovinos, uma gama de trabalhos foram confeccionados a fim de se provar esta atividade antimicrobiana residual (substatividade). Komorowski *et al.* (2000) utilizaram a solução de clorexidina a 0,2% por 7 dias. Heling *et al.*, em 1992 utilizaram um dispositivo biodegradável de liberação controlada também por 7 dias, a passo que Lenet *et al.* 2000 utilizaram um dispositivo não degradável e um gel como veículo por 7 dias. Basrani *et al.*, em 2002, verificaram que o uso da medicação de clorexidina 2% utilizada por 7 dias obteve uma ação residual contra o *E.faecalis*.

Um dos primeiros estudos sugerindo a utilização da clorexidina no tratamento endodôntico foi o trabalho de Parsons *et al* (1980). Neste estudo, os autores buscaram observar a adsorção e liberação da solução de clorexidina por polpas bovinas e amostras de dentina assim como suas propriedades

antibacterianas após uma contaminação proposital por *Streptococcus faecalis*. Como resultado, as amostras após serem tratadas com clorexidina, não evidenciaram contaminação depois de 48 e 72 horas de exposição à bactéria. Confirmaram, com isso, o efeito residual oferecido pela clorexidina, abrindo caminho para estudos futuros dessa substância como um irrigante endodôntico.

Vahdaty *et al.* (1993), utilizando as soluções de clorexidina e hipoclorito de sódio em concentrações iguais (0,2% e 2,0%), procurando não favorecer o efeito antibacteriano proporcionado pelo último, realizou um estudo comparando o efeito desinfetante sobre os túbulos dentinários destas duas substâncias químicas auxiliares nas mesmas concentrações. Os resultados revelaram que a clorexidina e o hipoclorito de sódio foram igualmente eficazes como agentes antimicrobianos contra *E.faecalis* em concentrações similares até uma profundidade de 100 μ m no interior dos túbulos dentinários.

A clorexidina também tem sido recomendada como uma solução irrigadora alternativa ao NaOCl, especialmente em casos de ápices abertos devido a sua biocompatibilidade (Jeansonne & White, 1994) ou em casos de alergia. A clorexidina possui uma desvantagem em relação ao NaOCl por não possuir promover dissolução tecidual. De acordo com Okino *et al.*, em 2004, em um período de 6 horas tanto a clorexidina gel quanto a líquida 2% não dissolveram tecido pulpar bovino. Neste mesmo período, todas as concentrações de NaOCl tiveram a capacidade de dissolução.

Duas formulações têm sido propostas para o uso da clorexidina, a líquida e a gel. Alguns estudos demonstram que a atividade antimicrobiana da clorexidina líquida é igual ou superior a da gel quando o contato direto é utilizado como metodologia (Ferraz *et al.* 2001, Gomes *et al.* 2001, Vianna *et al.* 2004). Em contrapartida, a clorexidina gel facilita a instrumentação, lubrificando a luz do canal radicular, o que diminui o atrito entre parede e instrumento podendo reduzir, assim, a ocorrência de fraturas de instrumentos no interior do sistema de canais

radiculares. Além de que, ao facilitar a instrumentação, a clorexidina gel termina por melhorar a capacidade dos instrumentos em eliminar tecidos orgânicos, o que compensa sua incapacidade de dissolvê-lo. Outra vantagem da clorexidina gel sobre a líquida seria a diminuição da formação de *smear layer* (Ferraz *et al.* 2001), o que não acontece com a líquida.

2.4 Técnicas de instrumentação

Descobertas na área de microbiologia, tratamento da parede dentinária previamente à obturação do canal radicular e o desenvolvimento de novos instrumentos e técnicas para o aprimoramento do tratamento endodôntico vêm sendo fortemente estudados na Endodontia marcando, assim, sua evolução na Odontologia.

Buscando o aprimoramento técnico da instrumentação endodôntica, novos materiais para a confecção de limas ou instrumentos endodônticos são propostos a cada dia. Civjan *et al.* , em 1975, avaliaram ligas de nitinol para o uso em odontologia e medicina ressaltando as propriedades elásticas desta liga.

Em endodontia, Walia *et al.* , em 1988, compararam limas endodônticas de aço e as fabricadas em níquel- titânio e concluíram que estas novas limas eram 2 a 3 vezes mais flexíveis e resistentes à fratura torsional, o que faz com que sejam especialmente desenvolvidos para canais curvos.

Instrumentos rotatórios de níquel titânio (NiTi) com conicidades crescentes e diferentes modelos têm sido recentemente desenvolvidos. A propriedade superelástica do NiTi, associada a um avançado *design*, permite uma livre e efetiva instrumentação usando-se contra-ângulo redutor de velocidade na direção coroa-ápice (Shuping 2000). Adicionalmente, o *design* destes instrumentos que incluem pontas (*tips*) não cortantes, áreas de escape (*radial land*) e diâmetros variáveis (*tapers*) tem sido desenvolvido para reduzir a incidência de erros de procedimento durante a instrumentação do canal radicular,

para diminuir o tempo de trabalho e criar um maior alargamento do preparo endodôntico.

O estudo de Hülsmann *et al.* (2001) quando compararam o tempo de trabalho, segurança, limpeza das paredes, e acompanhamento de canais curvos entre os instrumentos HERO 642 e Quantec SC, concluíram que o sistema HERO 642 obteve os melhores resultados e que a maior parte dos debris foi eliminada por ambos os sistemas, mas a *smear layer* esteve presente na grande maioria dos espécimes.

Com relação à capacidade de modelagem, os instrumentos em NiTi apresentam desempenho superior quando comparados aos de aço inox. Schäfer *et al.* (2003) relataram que os instrumentos Hero 642, FlexMaster e K3 foram melhores que os instrumentos manuais de aço inox, mantendo a trajetória original do canal em blocos curvos de resina.

Pouco se conhece a respeito da capacidade de modelagem do sistema Hero 642. Estes instrumentos são confeccionados de 55-nitinol e são modificações das *Helifiles* (Micro Mega). Sua secção transversal é caracterizada por três ângulos de corte igualmente espaçados quando avaliados em microscopia eletrônica. Todos os instrumentos Hero não apresentam corte na ponta. Onze tamanhos diferentes de Hero 642 estão disponíveis: Tamanhos 20, 25, 30 com 3 diferentes conicidades (2%,4%,6%) e tamanhos 35 e 40 apresentam-se apenas com a conicidade 2%. A técnica recomendada para a utilização destes instrumentos é a *crown-down* (cérvico-apical) (Schafer & Fritzenschaft 1999).

Alguns autores, como Siqueira *et al.* (1999) testaram a ação antimicrobiana *in vitro* exercida por técnicas e instrumentos criados para facilitar e agilizar o tratamento endodôntico. Neste trabalho, todas as técnicas utilizadas foram capazes de diminuir significativamente o número de células bacterianas do interior do canal radicular. Dalton *et al.* em 1998 avaliaram a redução

antimicrobiana *in vivo* proporcionada por uma técnica com instrumentação rotatória utilizando limas de NiTi com conicidade 0.04 e outra técnica manual “*step-back*” e irrigação com solução salina estéril. Não constataram diferença estatística significativa entre elas na capacidade em reduzir microrganismos e verificaram que nenhuma delas foi capaz de eliminar 100% das bactérias dos canais radiculares.

2.5 Método de estudo

Haapasalo & Ørstavik (1987) desenvolveram um método de estudo *in vitro* para infecção e desinfecção de túbulos dentinários que permitiria o teste da eficácia de medicações intracanaís, utilizando secções de dentes bovinos contaminados com *Enterococcus faecalis* por um período de 21 dias. A infecção dos túbulos foi avaliada através da coloração *Brown & Brenn* e microscopia eletrônica de varredura. Os medicamentos testados, Calasept (a base de hidróxido de cálcio) e PMCC foram inseridos no lúmen do canal radicular. Após intervalos de 5 a 10 dias, raspas de dentina eram coletadas em tubos contendo BHI caldo, que foram a seguir incubados. Através deste modelo de estudo pôde-se verificar a invasão bacteriana dos canalículos dentinários da parede pulpar em direção à periferia, e observar que esta invasão também ocorreu, embora em menor quantidade, no sentido contrário. A medicação à base de hidróxido de cálcio não eliminou o *E.faecalis* intratubular mesmo após 10 dias.

Vários artigos foram publicados com o intuito de verificar a desinfecção dos túbulos dentinários por diversas medicações intracanaís (Heling & Pecht 1991, Heling & Chandler 1998, Gomes *et al.* 2003, Cwikla *et al.* 2005, Schäfer & Bössmann 2005) por cimentos endodônticos (Saleh *et al.* 2004) e por soluções irrigadoras (Nagayoshi *et al.* 2004). Todos eles utilizaram, com alguma modificação, a metodologia criada por Haapasalo & Ørstavik em 1987.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi:

Analisar, *in vitro*, a redução de *Enterococcus faecalis* utilizando substâncias químicas auxiliares como a clorexidina líquida e gel a 2% e hipoclorito de sódio 5,25%, 2,5% e 0,5%, e três técnicas de instrumentação na luz do canal radicular e em toda extensão dos túbulos dentinários de dentes humanos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Dentes

- 270 pré-molares inferiores humanos recém extraídos e armazenados em solução fisiológica.

4.1.2 Microrganismo

- *Enterococcus faecalis* (ATCC29212)

4.1.3 Meios de cultura

- Brain Heart Infusion Broth (BHI)-Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, Inglaterra
- Brain Heart Infusion Agar (BHIA)-Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, Inglaterra

4.1.4 Substâncias químicas auxiliares testadas

- Clorexidina gel 2% (Proderma –Farmácia de Manipulação-Piracicaba-SP).
Composição: Clorexidina 2% com gel-base de Natrosol (hidroxietilcelulose) a 1%
- Clorexidina líquida 2% (Proderma –Farmácia de Manipulação-Piracicaba-SP)
- Hipoclorito de sódio 5,25% (Proderma –Farmácia de Manipulação-Piracicaba-SP)
- Hipoclorito de sódio 2,5% (Proderma –Farmácia de Manipulação-Piracicaba-SP)
- Hipoclorito de sódio 0,5% (Proderma –Farmácia de Manipulação-Piracicaba-SP)
- Soro fisiológico estéril (controle)

4.1.5 Solução irrigadora

- Soro fisiológico estéril

4.1.6 Substâncias neutralizadoras

- Tiosulfato de sódio 0,6% para o hipoclorito de sódio em todas as concentrações
- Tween 80 a 0,5% (Sigma Chemical Com.-Saint Louis, USA) + Lecitina de soja a 0,07% (Proderma –Farmácia de Manipulação-Piracicaba-SP) para a clorexidina gel e líquida.

4.1.7 Testes bioquímicos de identificação bacteriana

- Api 20 Strep (BioMérieux SA, Marcy-L'Etoile, França)

4.1.8 Instrumentos

- Hero 642 (MicroMega, Besançon, França).
- Limas tipo K 21mm (DYNA-FFDM instrumentos endodônticos, Bourges, França).
- Brocas Gates-Gliden 19 mm #5, #4, #3, #2 (DYNA-FFDM instrumentos endodônticos, Bourges, França).
- Brocas tronco-cônicas diamantadas 3069, 3139, 4137, 720 G (KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri, SP).

4.2. Método

4.2.1 Seleção e preparo dos dentes

Foram selecionados 270 pré-molares inferiores, com ápices completos, raízes retas e canais únicos, extraídos por problemas periodontais ou indicação ortodôntica. A utilização destes dentes foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas em humanos da faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP. Os restos de tecido periodontal ou ósseo que, por ventura, estavam aderidos às superfícies radiculares foram removidos com o auxílio de curetas periodontais. As coroas dentais foram removidas com disco de carborundum (KG Sorensen Ind.

Com. Ltda., Barueri, SP). As raízes foram padronizadas no comprimento de 15 milímetros. Marcas delimitando os terços radiculares (apical, médio e cervical) foram intencionalmente confeccionadas com disco de carborundum (KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri, SP) (**FIG.1-A**).

Os canais foram instrumentados progressivamente até a lima tipo K #20 na altura do forame apical. Durante este preparo, 1,0 ml de soro fisiológico estéril foi utilizado como irrigante a cada troca de lima. A fim de se evitar a desidratação, os dentes foram mantidos em gazes estéreis umedecidas durante toda a instrumentação.

Durante a instrumentação inicial, forma-se *smear layer*, que foi removida lavando-se os dentes em EDTA 17% por 10 minutos, em NaOCl 5,25% por mais 10 minutos sob agitação constante (Agitador-Aquecedor FANEM, São Paulo, Brasil). Então, os espécimes foram submetidos a uma nova lavagem com solução de fosfato tamponado por 10 minutos, seguida de água destilada por 1 hora para a remoção dos possíveis resíduos de EDTA e NaOCl (Perez *et al.* 1993, Ferraz *et al.* 2001).

O próximo passo foi autoclavá-los por 30 minutos a 121°C e 1 atm em grupos de 5 dentes em frascos de vidro com tampas rosqueáveis contendo 5 ml de BHI. Finalmente, após a autoclavagem, os dentes foram mantidos por 48 horas em estufa de 10% de CO₂ a 37°C, para a comprovação da esterilidade dos mesmos (Haapasalo & Ørstavik 1987).

4.2.2 Grupos experimentais

As 270 raízes foram divididas em 18 grupos, os quais as técnicas (Hero 642 (preconizada pelo fabricante), Híbrida (Valdrighi *et al.* 1998) e a Cérvico-Apical empregada pela FOP-Unicamp) e as substâncias químicas auxiliares (Clorexidina gel e líquida a 2% e NaOCl 5,25%, 2,5%, 0,5%) foram variadas entre si. Os grupos 16,17 e 18 (nos quais a substância química e a solução irrigadora utilizadas foi o soro fisiológico estéril) foram considerados os controles positivos. Estas informações foram compiladas no quadro a seguir (**QUADRO1**).

Quadro 1- Distribuição dos espécimes (n) por grupo de acordo com as substâncias químicas auxiliares e técnicas de instrumentação testadas.

Grupos	Substâncias químicas auxiliares	Técnicas	Espécimes (n)
1	Clorexidina gel 2%	Hero 642	15
2	Clorexidina gel 2%	Híbrida	15
3	Clorexidina gel 2%	Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP	15
4	Clorexidina líquida 2%	Hero 642	15
5	Clorexidina líquida 2%	Híbrida	15
6	Clorexidina líquida 2%	Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP	15
7	NaOCl 5,25%	Hero 642	15
8	NaOCl 5,25%	Híbrida	15
9	NaOCl 5,25%	Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP	15
10	NaOCl 2,5%	Hero 642	15
11	NaOCl 2,5%	Híbrida	15
12	NaOCl 2,5%	Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP	15
13	NaOCl 0,5%	Hero 642	15
14	NaOCl 0,5%	Híbrida	15
15	NaOCl 0,5%	Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP	15
16	Soro fisiológico estéril	Hero 642	15
17	Soro fisiológico estéril	Híbrida	15
18	Soro fisiológico estéril	Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP	15

4.2.3 Contaminação dos espécimes com *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)

Para a contaminação das raízes, foram utilizadas culturas puras de *Enterococcus faecalis* em caldo de BHI. *Enterococcus faecalis* foi subcultivado em BHI Agar + 5 % de sangue desfibrinado de carneiro e incubado a 37 °C em atmosfera de 10% de CO₂, por 24 horas (**FIG. 1-B**).

Decorrido o tempo de incubação, as colônias isoladas foram transportadas para tubos rosqueáveis contendo 5,0 mL de BHI, respeitando o padrão de concentração 2,0 da escala McFarland ($6,0 \times 10^8$ bactérias/ mL), com absorbância de 800 nm através do espectrofotômetro (FEMTO 432, Marconi, Piracicaba, SP) (**FIG. 1-C, D**).

Na câmara de fluxo laminar, após a agitação mecânica dos tubos contendo inóculo bacteriano (VORTEX MA 162, Marconi, Piracicaba, SP) e concentração adequada, 5,0 ml de BHI estéril foi substituído por 5,0 mL da suspensão de *Enterococcus faecalis*. Posteriormente, o frasco foi vedado e incubado em estufa a 37 °C por 21 dias, com trocas de 2,0 mL de BHI contaminado por 2,0 mL de BHI estéril a cada 2 dias para se evitar a saturação do meio.

O crescimento bacteriano verificou-se pela presença de turbidez do meio (**FIG. 1-E, F**). A pureza das culturas foi confirmada através da morfologia das colônias plaqueadas em BHIA sangue, teste de catalase e método bioquímico de identificação bacteriana Api 20 Strep (BioMérieux SA., Marcy-L'Etoile, França).

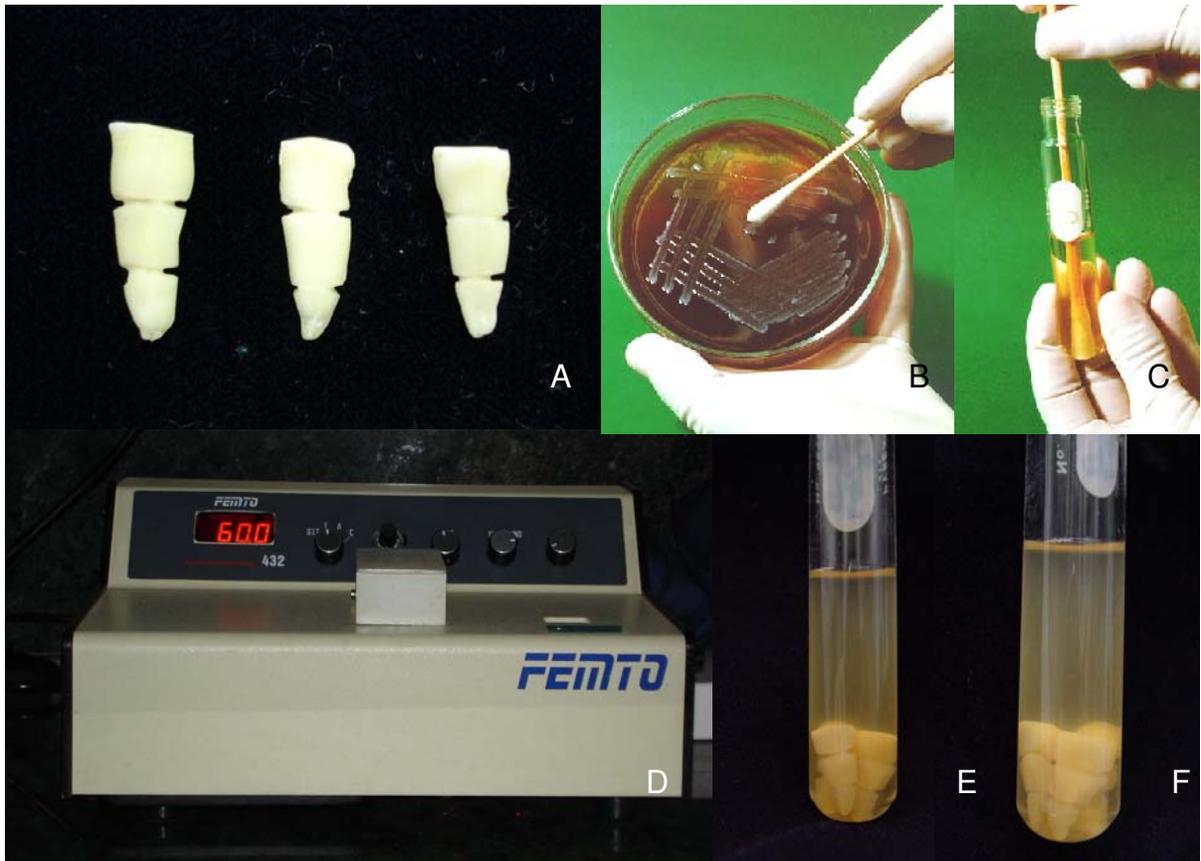


FIGURA 1: A- Preparo dos dentes, B- Placa contendo *E.faecalis*, C- Preparo do inóculo, D- Espectrofotômetro regulado a 2,0 McFarland, E e F- Dentes antes e após a contaminação com *E.faecalis* por 21 dias.

A contaminação dos túbulos dentinários e da luz do canal radicular foi confirmada através de imagens em microscopia eletrônica de varredura, em estudo piloto, como na **FIG. 2**.

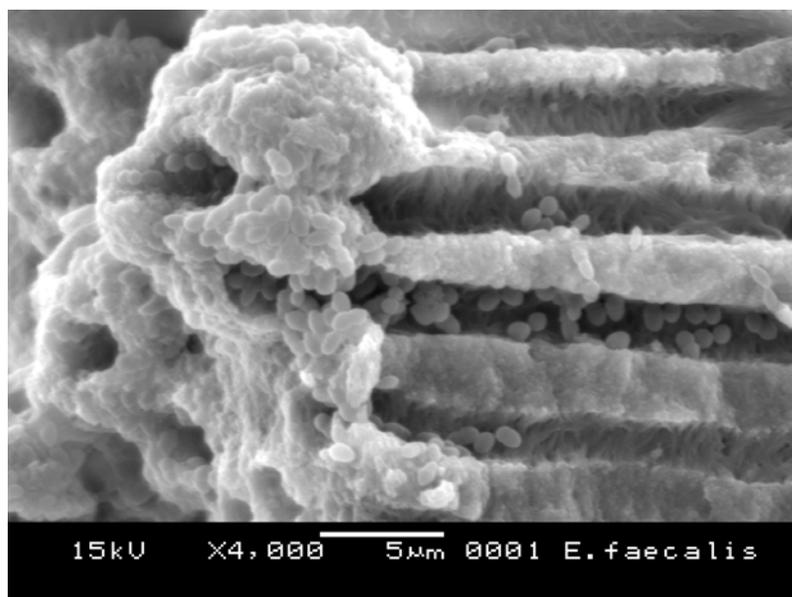


FIGURA 2: Imagem de microscopia eletrônica de varredura, visão intratubular e da luz do canal radicular contaminado por *Enterococcus faecalis*.

4.2.4 Coleta bacteriana inicial

Após a contaminação, os dentes foram dispostos em uma plataforma metálica estéril que foi levada para o interior da câmara de fluxo laminar. Lá, cada raiz foi irrigada com 1,0 mL de solução salina estéril e a seguir coletadas amostras microbiológicas do canal radicular contaminado, com o auxílio de cones de papel absorventes estéreis #20 (TANARI, Tanarian Industrial Ltda, Macapuru- AM). Depois estes cones foram depositados individualmente em tubos estéreis tipo eppendorf (Elkay Products Inc.-Shrewsbury, USA) contendo 1 mL de BHI.

4.2.5 Descrição das técnicas de instrumentação

4.2.5.1. Técnica Híbrida (Valdrighi *et al.* 1998)

Os 2/3 cervicais dos canais dos grupos 2,5,8,11,14,17 foram inicialmente preparados com limas tipo K, a partir da lima # 20 até a # 35. Posteriormente, a broca Gates – Glidden (GG) # 2 foi introduzida nos canais radiculares com movimentos firmes até o comprimento alcançado pela lima # 35. Seguidamente, a GG # 3 foi introduzida 1,0 mm aquém que a GG # 2. Uma lima tipo K # 10 recapitulou o canal radicular em cada troca de lima ou broca com 1,0 mm além do comprimento pré-estabelecido com o intuito de se manter a patência. Com a odontometria determinada ainda no preparo dos dentes, iniciou-se a instrumentação a fim de se confeccionar o ombro apical utilizando a lima tipo K # 35. Após a preparação do ombro, o *step - back* com recuo programado em intervalos de 1,0 mm até a lima # 50 foi realizado (**FIG. 4A**).

4.2.5.2. Técnica Cérvico-Apical (empregada pela FOP-UNICAMP)

O acesso cervical dos grupos 3,6,9,12,15,18 foi realizado com limas HERO *tip* 20, *taper* 0.06; penetrando no máximo 5 mm aquém do ápice . Em seguida, as brocas de *Gates - Glidden* (GG) # 5, # 4, # 3, # 2 foram utilizadas em intervalos de aproximadamente 2,0 mm até 5,0 mm aquém do comprimento total da raiz (15mm). Posteriormente, o ombro apical foi confeccionado com lima manual tipo K progressivamente até a # 35. Em seqüência, o *step – back* com recuo programado em intervalos de 1,0 mm até a lima # 50 foi realizado (**FIG. 4B**).

4.2.5.3. Instrumentação com rotatórios HERO 642 até o ápice (seqüência de acordo com as instruções do fabricante):

Os 2/3 cervicais (10 mm) das raízes dos grupos 1,4,7,10,13,16 foram instrumentados com a lima rotatória Hero *taper* 0.06. Seguidamente, HERO *taper* 0.04 foi levada ao canal até 2,0 mm aquém do ápice radicular. No comprimento de trabalho pré-estabelecido, instrumentou-se com a HERO *taper* 0.02. Os rotatórios usados tinham o diâmetro 30 (*tip* 30) constante (**FIG. 4C**).

O tempo de instrumentação foi padronizado em 10 minutos para todas as técnicas e substâncias químicas auxiliares testados.

As limas HERO foram utilizadas em peça de mão acionada por motor elétrico (Endo Pro Driller, São Paulo – Brasil) com velocidade de 300 rotações por minuto além de penetrarem acionadas no canal.

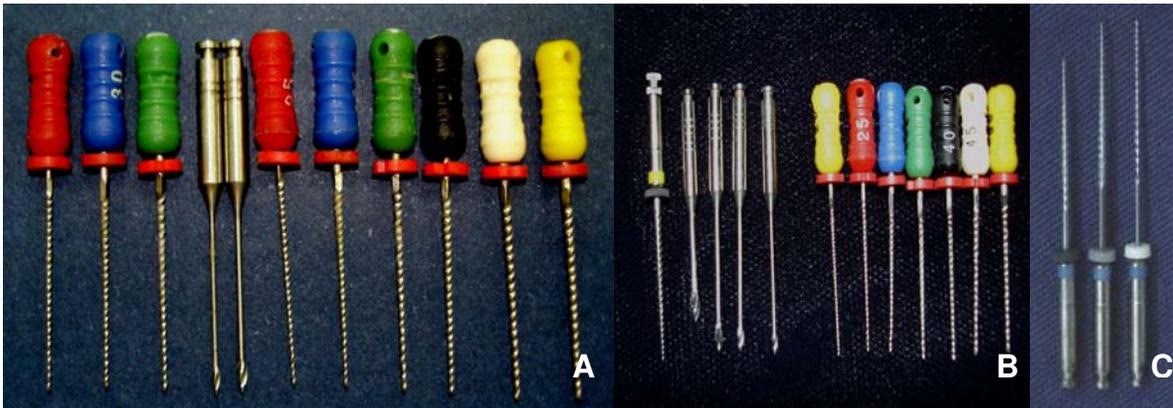


Figura 3: Seqüência dos instrumentos utilizados para: **A-** Técnica Híbrida, **B-**Técnica Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP, **C-** Técnica com rotatórios HERO 642 até o ápice.



Figura 4: Instrumentos do Sistema HERO 642.

4.2.6 Irrigação dos canais radiculares

A cada início de uma nova lima ou broca, para as técnicas Híbrida e Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP, 0,5 mL de cada substância auxiliar foram levados ao canal com o auxílio de seringa descartável estéril BD de 10 mL e agulha 20 x 5,5, totalizando 6,0 mL. Após o uso de cada lima ou broca, o canal foi irrigado com 1,0 mL de solução fisiológica estéril, totalizando 12 mL.

Levando-se em conta que a técnica preconizada pelo fabricante da Hero 642, este sistema apresenta apenas 3 limas rotatórias quando se trata de canais retos. Portanto, para se manter a mesma proporção de substâncias químicas auxiliares durante o preparo químico-mecânico colocou-se no interior de cada canal radicular a cada troca de broca, 2,0 mL da substância química auxiliar, totalizando 6,0 mL. Após o uso de cada lima, o canal foi irrigado com 4,0 mL de soro fisiológico estéril, totalizando 12 mL.

Os grupos nos quais a solução irrigadora testada foi somente o soro fisiológico estéril os mesmos procedimentos foram utilizados.

Após a instrumentação completa do canal radicular, uma nova irrigação utilizando 1,0 ml do neutralizador específico das substâncias testadas foi feita a fim de se evitar a ação residual das substâncias químicas auxiliares nas coletas microbiológicas. Por fim, 1,0 ml de soro fisiológico estéril foi utilizado como irrigação final (**FIG. 6-B**).

A agulha foi inserida o mais próximo possível do comprimento de trabalho sem travar em seu interior.

4.2.7 Coleta final

Uma vez realizada a irrigação final com soro fisiológico estéril, os canais foram secos com cones de papel absorventes estéreis e depositados em eppendorfs individuais. Esta foi considerada a coleta final.

4.2.8. Preparo das coletas (diluição, contagem das unidades formadoras de colônias-UFC)

Imediatamente após cada coleta, as amostras foram agitadas (Vortex MA 162, Marconi, Piracicaba) por 1 minuto e diluídas em série 1/10, 1/100 em BHI estéril (**FIG. 6-D**). Vinte e cinco μL da diluição 10^{-2} foram plaqueados em triplicatas em BHIA sangue e incubados em estufa de CO_2 a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, as colônias de microrganismos presentes nas placas foram contadas determinando-se as unidades formadoras de colônias (UFC). A pureza das culturas foi confirmada através da morfologia das colônias, coloração de Gram, teste de catalase e método bioquímico de identificação bacteriana (Api 20 Strep, BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França).

Para a obtenção das unidades formadoras de colônias por mL foi necessário multiplicar por 4000 vezes o número de UFC obtidas na contagem das placas. Ou seja, como foi utilizada na contagem apenas a diluição a 10^{-2} , o valor a ser multiplicado correspondendo a essa diluição é 100. A alíquota plaqueada foi de 25 μL , ou seja 40 vezes menor que 1,0 mL. A mediana das 3 placas foi utilizada como valor final da contagem, ou seja: placa A: cresceu 1 UFC, placa B: 10 UFC, placa C: 4 UFC, portanto a mediana das placas A-B-C é 4 UFC/mL.

Exemplo: se a mediana das 3 placas foi 4 unidades formadoras de colônias, multiplica-se 4 por 4000. O que resultaria numa contagem final de 16.000, ou seja, $1,6 \times 10^4$ UFC/mL.

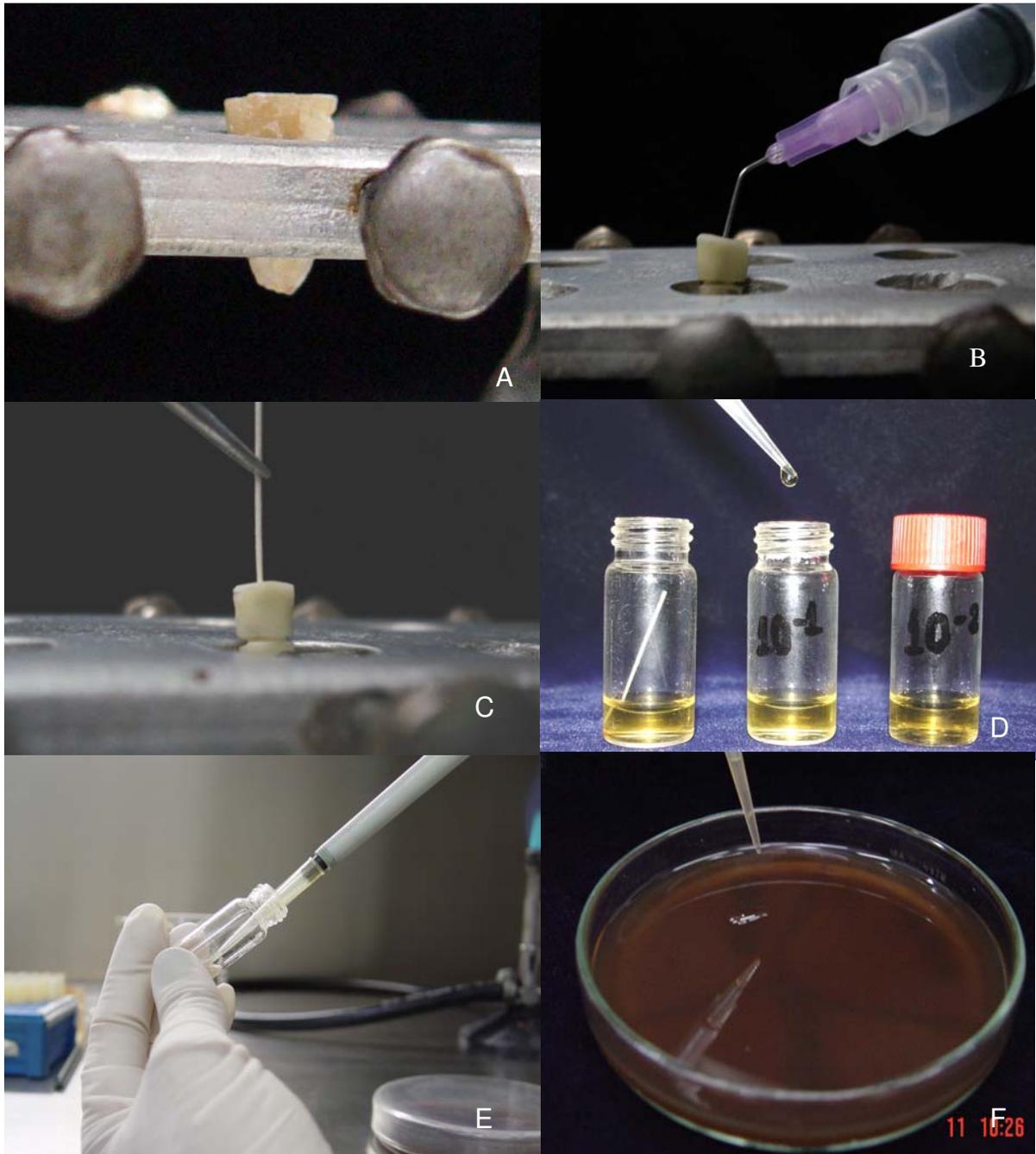


Figura 5: **A-** Posicionamento do dente no suporte metálico, **B-** Irrigação com 1,0 mL de soro fisiológico, **C-** Coleta microbiológica, **D-** Diluição (1/10, 1/100), **E-** Alíquota de 25 μ L, **F-** Plaqueamento em BHI agar.

4.2.9. Desinfecção dos túbulos dentinários pelas substâncias químicas auxiliares

Ainda no interior da câmara de fluxo laminar, os espécimes de cada grupo foram fragmentados em 3 blocos: apical, médio e cervical (**FIG. 7A**) com o auxílio de um cinzel e martelo.

Cada espécime foi fixado em um suporte de alumínio estéril para a remoção seqüencial das raspas de dentina da superfície da luz do canal que estiveram em contato com as substâncias testadas durante a instrumentação. Para isso, utilizaram-se brocas tronco-cônicas diamantadas estéreis de diâmetro crescente 3069 (Broca 1/ISO 018) cujo maior diâmetro é de 1,8 mm, 3139 (Broca 2/ ISO 021) cujo maior diâmetro é 2,1mm, 4137 (Broca 3/ ISO 025) em que o maior diâmetro é de 2,5 mm, 720 G (Broca 4/ ISO 029) cujo maior diâmetro é de 2,9 mm (KG Sorensen) em baixa rotação (**FIG. 7B**) de acordo com a **FIG. 6**. As brocas foram colocadas e retiradas do canal 3 vezes.

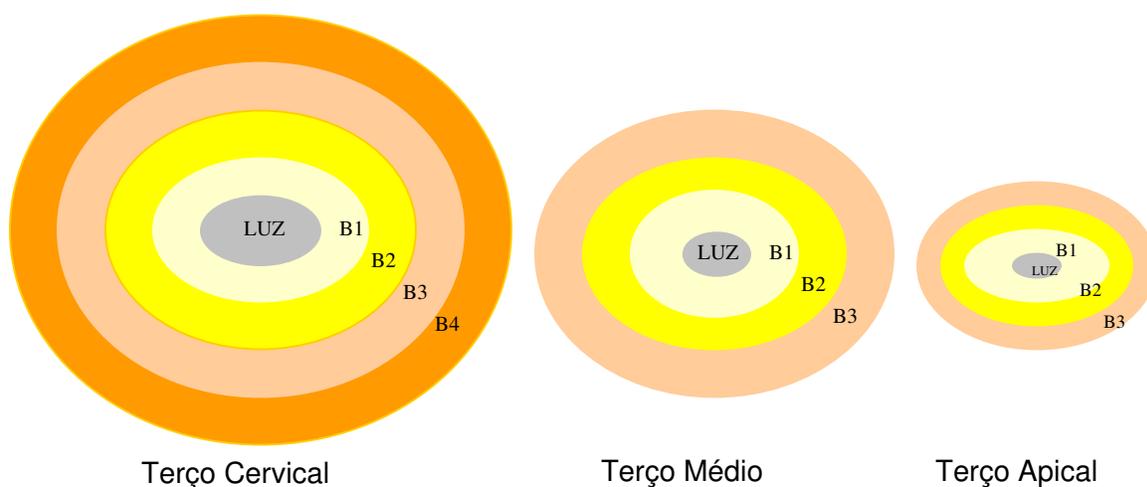


Figura 6: Representação esquemática do desgaste produzido pelas brocas nos terços cervical, médio e apical.

As raspas de dentina obtidas durante o uso de cada broca foram imediatamente coletadas em frascos de vidro contendo 1,0 mL de BHI estéril (**FIG. 7H**). A partir daí, cada tubo teste foi agitado por 1 minuto. Vinte e cinco μL desta suspensão foram plaqueados em triplicatas em BHIA sangue, e as placas incubadas em estufa de CO_2 a 37°C por 48 horas (**FIG. 7-J**). Após o período de incubação, as colônias de microrganismos foram contadas (**FIG. 7-K**), determinando-se as unidades formadoras de colônias (UFC).

A fim de se determinar as UFC/mL, a contagem destas placas foi multiplicada por 40, já que foram plaqueados $25\mu\text{L}$ (40 vezes menor que 1,0 mL). A mediana das 3 placas foi utilizada como valor final de contagem.

A pureza das culturas foi confirmada através da morfologia das colônias, coloração de Gram, teste de catalase e método bioquímico de identificação bacteriana (Api 20 Strep, Biomérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) (**FIG 7-L, M**).

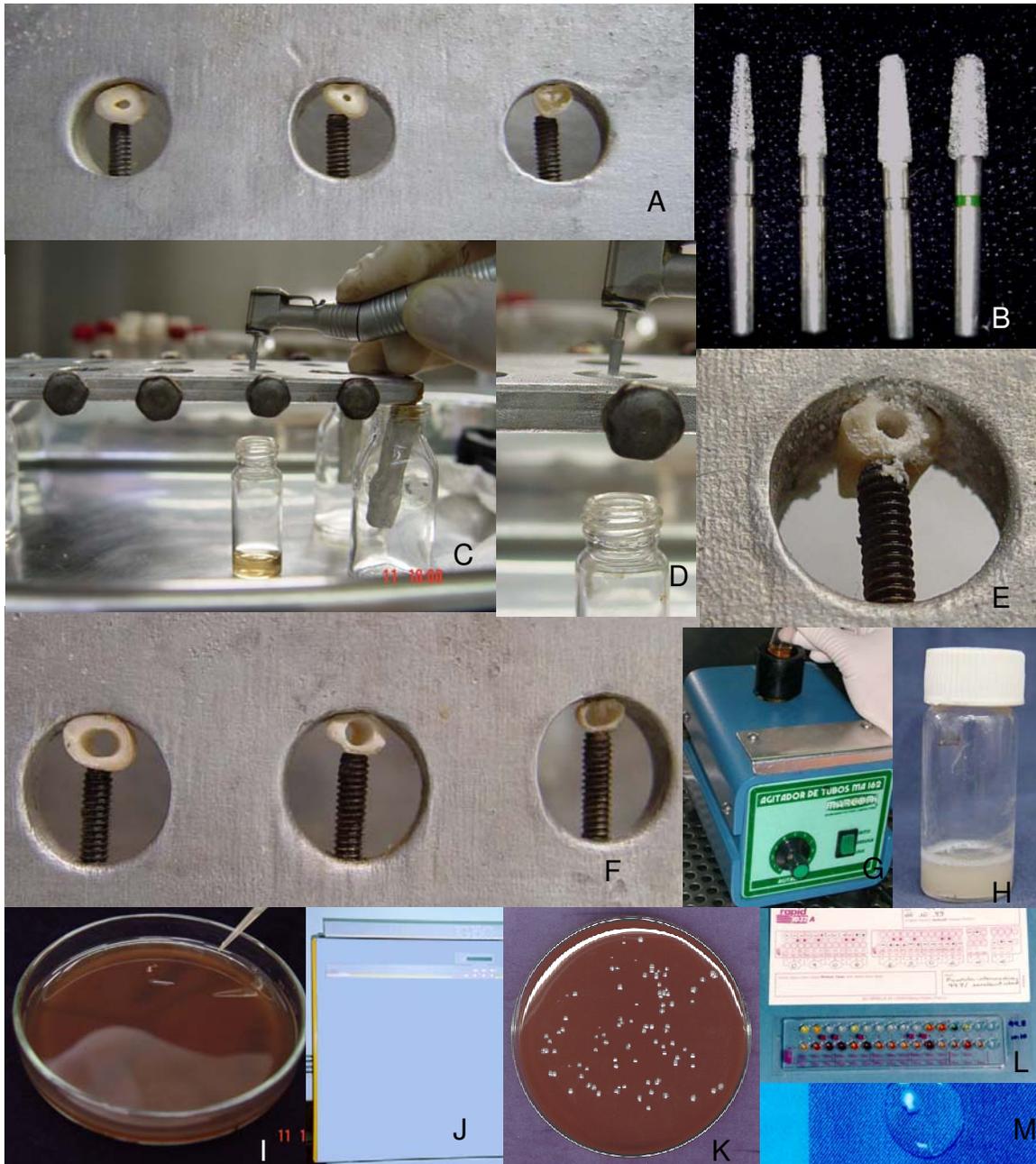


Figura 7: **A-** Terços posicionados em suporte metálico, **B-** Brocas ISO 018,021,025,029, **C,** **D e E-** Desgaste das raspas de dentina e coleta, **F-** Terços após o uso da terceira broca, **G-** Agitação dos tubos, **H-** Tubo com 1,0 ml de BHI caldo contendo as raspas de dentina, **I-** Plaqueamento de 25µl da coleta de dentina, **J-** Incubação por 48 horas, **K-** Contagem das UFC, **L e M-** testes para confirmação da pureza das colônias.

5. RESULTADOS

5.1 Redução bacteriana imediatamente após os diferentes preparos químico-mecânicos – *Estatística.*

Para realização das comparações entre as combinações de técnicas e substâncias químicas auxiliares, observando-se os valores das coletas iniciais e finais em cada caso, calculou-se inicialmente a redução provocada por cada uma das 18 combinações possíveis. Nos casos em que foram utilizadas as substâncias químicas auxiliares Clorexidina Gel 2%, NaOCl 5,25% e Clorexidina Líquida 2%, todos os dentes das amostras apresentaram contagem final das UFC nula, ou seja, houve redução de 100%. Assim, esses casos não foram incluídos nas comparações. Por outro lado, quando foi utilizada a substância química auxiliar NaOCl 2,5%, apenas com a utilização da técnica HERO houve sobrevivência de alguns poucos microrganismos. Assim, os seguintes testes foram realizados:

- a) Na técnica HERO e na técnica Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP: Soro Fisiológico vs NaOCl 0,5%;
- b) Na técnica HERO: Soro Fisiológico vs NaOCl 0,5% vs NaOCl 2,5%
- c) Nas substâncias testadas: Soro Fisiológico, NaOCl 0,5% e NaOCl 2,5%: entre as três técnicas;
- d) Comparações das combinações: Técnica Híbrida- Soro Fisiológico, Técnica Híbrida-NaOCl 0,5%, Técnica HERO-Soro Fisiológico, Técnica HERO-NaOCl 0,5%, Técnica HERO-NaOCl 2,5%, Técnica FOP-UNICAMP-Soro Fisiológico e Técnica FOP-UNICAMP-NaOCl 0,5%

Quando foram comparadas somente duas substâncias químicas auxiliares ou duas técnicas, o teste utilizado foi o de *Wilcoxon-Mann-Whitney*. Nesse caso, o próprio resultado do teste já informa a ordem em que ocorre a comparação, sem necessitar de testes posteriores. Com três ou mais técnicas ou

substâncias químicas auxiliares, o teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado e, nos casos em que apresentaram significância, os testes de comparações múltiplas foram realizados.

5.1.2 Redução bacteriana imediatamente após os diferentes preparos químico-mecânicos – *Resultados.*

Houve significativa redução da contagem de *Enterococcus faecalis* em todos os grupos estudados após o preparo químico-mecânico. Nos casos em que foram utilizadas as substâncias químicas auxiliares Clorexidina Gel 2%, NaOCl 5,25% e Clorexidina Líquida 2%, todos os dentes das amostras apresentaram redução de 100% na contagem das UFC. O NaOCl 2,5% também obteve redução em 100% das amostras quando utilizado em conjunto com as técnicas Híbrida e Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP. Em contrapartida, quando associado à técnica HERO, algumas poucas colônias foram contadas.

Os grupos Controles (Soro fisiológico estéril), apesar de não apresentarem ação antimicrobiana obtiveram uma grande redução na média de contagem da coleta final de UFC (imediatamente após a instrumentação) por agir em conjunto com a instrumentação mecânica em todas as técnicas testadas. Estes resultados podem ser observados na **TAB.1**.

Tabela 1. Porcentagem de redução da contagem de UFC da coleta inicial para a final

	Híbrida	FOP-UNICAMP	HERO 642
CLX gel 2%	100%	100%	100%
NaOCl 5,25%	100%	100%	100%
Soro Fisiológico	99,56%	99,92%	99,32%
NaOCl 2,5%	100%	100%	99,99%
CLX Líquida 2%	100%	100%	100%
NaOCl 0,5%	99,99%	99,98%	99,98%

O teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney* forneceu a estatística $W = 138,0$ com um p -valor $< 0,0001$ indicando diferenças significativas entre as substâncias químicas auxiliares na Técnica Híbrida.

Portanto, nesta técnica o Soro Fisiológico apresentou-se menos efetivo que o NaOCl 0,5% como na **TAB. 2**.

Tabela 2. Substâncias químicas auxiliares na Técnica Híbrida

Substâncias químicas auxiliares	n_i	Médias (Desvio-padrão)	Medianas	
NaOCl 0,5%	15	99,996 (0,370)	100,00	A
Soro Fisiológico	15	99,556 (0,009)	99,73	B

O teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney* forneceu a estatística $W = 120,0$ com um p -valor $< 0,0001$ indicando diferenças significativas entre as substâncias químicas auxiliares para a técnica Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP.

Como no caso anterior, de acordo com TAB.3, o Soro Fisiológico apresentou-se menos efetivo que o NaOCl 0,5%.

Tabela 3. Substâncias químicas auxiliares na Técnica Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP.

Substâncias químicas auxiliares	n_i	Médias (Desvio-padrão)	Medianas	
NaOCl 0,5%	15	99,989 (0,015)	99,990	A
Soro	15	99,321 (0,753)	99,330	B

Na comparação das três substâncias químicas auxiliares (NaOCl 2,5%, NaOCl 0,5% e soro fisiológico estéril) utilizando a técnica HERO, aplicou-se o teste de *Kruskal-Wallis*. A estatística $H = 31,78$ foi significativa a 5% e 1% (p -valor $< 0,0001$), indicando que as substâncias químicas auxiliares diferem em sua ação, quando a técnica HERO é utilizada.

Ao comparar as três substâncias, verificou-se que o Soro tem a pior *performance* em relação aos outros. Por outro lado, os NaOCl 2,5% e NaOCl 0,5% não diferem significativamente entre si quando se utilizou a técnica HERO como pode ser visto na **TAB.4**.

Tabela 4. Substâncias químicas auxiliares na Técnica HERO.

Substâncias químicas auxiliares	n _i	Médias (Desvio-padrão)	Medianas	
NaOCl 2,5%	15	99,998 (0,0083)	100,00	A
NaOCl 0,5%	15	99,995 (0,0041)	100,00	A
Soro Fisiológico	15	99,521 (0,3906)	99,56	B

Ao se comparar todas as técnicas, para cada uma das substâncias químicas auxiliares nas quais houve sobrevivência de colônias de *Enterococcus faecalis* (contagem de UFC) imediatamente após os preparos químico -mecânicos, verificou-se que (**TAB.5**):

- i) Não se constataram diferenças significativas entre as técnicas quando se utilizou o Soro Fisiológico e NaOCl 0,5%;
- ii) Para o NaOCl 2,5%, a técnica HERO é considerada pior que as outras duas, ao nível de 5% de significância; entretanto, devido ao fato dos valores referentes às outras duas técnicas (Híbrida e Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP) serem todos iguais a 100%, tal resultado não deveria ser considerado isoladamente.

Tabela 5. Técnicas, dentro das substâncias químicas auxiliares

Substâncias químicas auxiliares	H	p-valor	Diagnóstico
Soro Fisiológico	0,86	0,652	Não significativo
NaOCl 0,5%	3,59	0,166	Não significativo
NaOCl 2,5% (*)	6,29	0,043	Significativo a 5%

(*) duas das três técnicas têm seus valores todos iguais a 100%.

Foram consideradas também as sete combinações técnicas-substâncias químicas auxiliares que apresentaram um ou mais valores distintos de 100% (**TAB. 6**). Nesse caso, o teste de *Kruskal-Wallis* foi significativo com $H = 72,584$, com quatro graus de liberdade ($p\text{-valor} < 0,0001$), ou seja, existem diferenças significativas entre as combinações comparadas.

Tabela 6. Combinações entre técnicas e substâncias químicas auxiliares: medianas e situação a 5%.

Combinações	Mediana	Postos médios	5%
1- HERO & NaOCl 2,5%	100,00	79,00	A
2- Híbrida & NaOCl 0,5%	100,00	77,53	A
3- HERO & NaOCl 0,5%	100,00	72,63	A
4- FOP-UNICAMP & NaOCl 0,5%	99,99	66,07	A
5- Híbrida & Soro Fisiológico	99,73	30,43	B
6- HERO & Soro Fisiológico	99,56	24,70	B
7- FOP-UNICAMP & Soro Fisiológico	99,33	20,63	B

5.2 Desinfecção dos túbulos dentinários imediatamente após os diferentes preparos químico-mecânicos – Estatística.

Os dados são referentes a medidas bastante variáveis, com muitos valores nulos, ou seja, muitas contagens negativas de UFC. Nesse caso específico, a normalidade não ocorre. Portanto, testes não-paramétricos foram

aplicados por serem mais efetivos e robustos, mesmo considerando-se o grande número de dados deste estudo. Nesse caso, utilizar-se-á, para fazer as comparações entre técnicas, substâncias químicas auxiliares, profundidades (brocas) e terços, o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*, tendo em vista que não foi estabelecido, até o momento, formas mais confiáveis e com a utilização de softwares para delineamentos mais complicados, como é o caso presente. Assim, discutir-se-á cada um dos fatores envolvidos separadamente. Obviamente que a melhor técnica seria a utilização de todas as informações num único delineamento. Entretanto, a dificuldade de realização de testes não-paramétricos desse tipo nos leva a uma maneira que, apesar da perda de informações que ocorre, traz resultados mais robustos e ainda de acordo com a necessidade do pesquisador. Por outro lado, o grande número de dados a serem analisados minimiza essa perda.

Para fazer os testes de comparações múltiplas, como não são encontrados nos programas estatísticos mais comuns, dois caminhos poderiam ter sido tomados:

- a) Fazer uma adaptação, transformando os dados em postos e, nos dados transformados aplica-se o teste t ou o teste de Tukey; mas como o número de dados é grande, (8100 elementos amostrais), essa técnica permite obter resultados aproximados para as comparações múltiplas de dados transformados em postos;
- b) Outra técnica utilizada é dada em Campos (1983 p. 223), ou seja, utiliza-se a aproximação através da amplitude estandardizada ou da distribuição normal, que, nesse caso, são bastante efetivas.

A técnica escolhida para este estudo foi a apresentada em Campos (1983), na qual calcula-se a diferença mínima significativa (d.m.s.), ou seja, a menor diferença para a qual dois tratamentos podem ser considerados diferentes, ao nível de significância a ser considerado (5% ou 1%, em geral) e compara-se

com as diferenças entre as médias de postos de tratamentos obtidas através dos dados, em módulo.

5.4 Desinfecção dos túbulos dentinários imediatamente após os diferentes preparos químico-mecânicos – *Resultados*.

Nesta parte do estudo, muitas correlações poderiam ter sido feitas sem responder os objetivos esperados. Portanto, para um resultado mais objetivo separamos as análises de acordo com os questionamentos propostos:

5.4.1 Em todos os terços, profundidades e substâncias químicas auxiliares testados qual foi a melhor técnica de instrumentação?

Na comparação entre as técnicas, independentemente dos terços, profundidades ou substâncias químicas auxiliares testados, o número de elementos amostrais para as técnicas Híbrida, HERO 642 e FOP-UNICAMP é o mesmo ($n_1 = n_2 = n_3 = 2700$). Na Tabela 7, são apresentadas as médias dos postos para cada uma das técnicas e o resultado do teste de comparações múltiplas. A estatística do teste de Kruskal-Wallis foi significativa ($H = 55,724$ e $p\text{-valor} < 0,001$), indicando diferenças a 5% (e também a 1%) entre as três técnicas. Observa-se que nesse caso, menores postos são favoráveis ao tratamento, já que indicam uma incidência menor de colônias.

Assim, no caso presente, as técnicas HERO 642 e Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP foram mais efetivas que a técnica Híbrida, independente dos terços, profundidades e substâncias químicas auxiliares como na **TAB.7**.

Tabela 7. Médias de postos para as técnicas consideradas.

Técnicas	n_i	Média dos Postos	5%	1%
Híbrida	2700	4286,00	A	A
HERO	2700	3906,25	B	B
FOP-UNICAMP	2700	3959,36	B	B

Obs.: letras diferentes indicam significância ao nível indicado

5.4.2 **Em cada terço, em todas as substâncias químicas auxiliares e profundidades qual é a melhor técnica?**

Nesse caso, em cada terço, verificou-se as diferenças entre técnicas, independente das substâncias químicas auxiliares utilizadas e profundidades.

5.4.2.1 **Terço Cervical**

O teste de *Kruskal-Wallis* indicou diferenças significativas entre as técnicas no Terço Cervical. O valor da estatística de teste foi 35,993 (p -valor < 0,001), ou seja, as diferenças foram significativas a um nível menor que 0,1%. Na **TAB.8** são apresentados os valores utilizados para o teste bem como o resultado das comparações múltiplas.

Tabela 8. Médias de postos para as técnicas consideradas no Terço Cervical.

Técnicas	n_i	Médias dos Postos	5%	1%
Híbrida	1080	1745,35	A	A
HERO	1079	1553,81	B	B
FOP-UNICAMP	1080	1560,78	B	B

Obs.: letras diferentes indicam significância ao nível indicado

5.4.2.2 Terço Médio

O teste de *Kruskal-Wallis* não indicou diferenças significativas entre as técnicas apenas ao nível de 5% ($H = 6,465$ e $p\text{-valor} = 0,039$) como na **TAB.9**. Para a comparação entre as técnicas HÍBRIDA e HERO e entre as técnicas Híbrida e Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP, as diferenças mínimas significativas foram $d.m.s._{5\%} = 83,47$ e $d.m.s._{1\%} = 102,35$ e na comparação entre a técnica HERO e FOP-UNICAMP, os valores são $d.m.s._{5\%} = 81,72$ e $d.m.s._{1\%} = 101,59$.

Tabela 9. Médias de postos para as técnicas consideradas no Terço Médio.

Técnicas	n_i	Médias dos <i>Postos</i>	5%	1%
1. Híbrida	810	1259,77	A	A
2. HERO	810	1190,98	A	A
3.FOP-UNICAMP	810	1197,19	A	A

Obs.: letras diferentes indicam significância ao nível indicado

5.4.2.3 Terço Apical

Quando se averiguaram as diferenças entre as técnicas, relativas ao Terço Apical, obteve-se a estatística de *Kruskal-Wallis* igual a 19,677 ($p\text{-valor} < 0,001$), indicando que há diferenças entre as três técnicas ao nível de 5% de significância (e também ao nível de 1%). Averiguou-se, então, quais comparações foram as responsáveis por essa diferença. Assim, o teste de comparações múltiplas indicado anteriormente foi utilizado.

Os resultados apontaram para a diferença significativa entre a técnica Híbrida e a técnica HERO apenas, indicando que essa última é significativamente melhor. A técnica Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP, para o terço Apical, não

difere nem da técnica Híbrida e nem da técnica HERO, ficando como uma técnica intermediária (**TAB.10**).

Tabela 10. Médias de postos para as técnicas consideradas no Terço Apical.

Técnicas	n_i	Médias dos Postos	5%	1%
Híbrida	810	1283,64	A	A
FOP-UNICAMP	810	1203,87	AB	AB
HERO	810	1159,15	B	B

Obs.: letras diferentes indicam significância ao nível indicado.

5.4.3 **Em todos os terços, profundidades e técnicas qual é a melhor substância química auxiliar?**

Quando se comparou substâncias químicas auxiliares, independente dos terços, profundidades ou técnicas, ocorreu a diferenciação completa de todos eles, ou seja, a ordem (da melhor para a pior substância química auxiliar) que foi dada por: NaOCl 5,25%, Clorexidina Gel 2%, NaOCl 2,5%, Clorexidina Líquida 2%, NaOCl 0,5% e finalmente, o Soro Fisiológico (**TAB. 11**).

O valor da estatística de *Kruskal-Wallis* foi 2853,06, com um p-valor menor que 0,001, que indica diferenças significativas entre as substâncias químicas auxiliares. O teste de comparações múltiplas indicou que as diferenças mínimas significativas são de 256,48, para o nível de 5% e 302,75 para o nível de 1% de significância.

Tabela 11. Médias de postos para as substâncias químicas auxiliares e teste de comparações múltiplas.

Substâncias químicas auxiliares	n _i	Médias dos Postos	Médias dos	
			5%	1%
2-NaOCl 5,25%	1350	2521,50	A	A
1- Clorexidina Gel 2%	1350	2868,14	B	B
4- NaOCl 2,5%	1350	3590,00	C	C
5- Clorexidina Líquida 2%	1350	4392,03	D	D
6- NaOCl 0,5%	1350	4922,23	E	E
3- Soro Fisiológico	1350	6009,09	F	F
Total	8100			

5.4.4 Qual a melhor substância química auxiliar em cada terço?

5.4.4.1 Terço Cervical

No Terço Cervical, constatou-se diferenças significativas entre as substâncias químicas auxiliares. Obteve-se o valor 1355,42 para a estatística *H* do teste de *Kruskal-Wallis* (p -valor < 0,0001).

Tabela 12. Médias de postos para as substâncias químicas auxiliares e teste de comparações múltiplas.

Substâncias químicas auxiliares	n_i	Médias dos		
		Postos	5%	1%
2- NaOCl 5,25%	540	915,00	A	A
1- Clorexidina Gel 2%	540	1136,38	B	B
4- NaOCl 2,5%	540	1408,97	C	C
5- Clorexidina Líquida 2%	540	1693,16	D	D
6- NaOCl 0,5%	540	2043,46	E	E
3- Soro Fisiológico	539	2524,71	F	F
Total	3239			

5.4.4.2 Terço Médio

No Terço Médio, como ocorreu no terço cervical, foram constatadas diferenças significativas entre as substâncias químicas auxiliares (**TAB.13**), com o $H = 838,757$ (p-valor < 0,0001 para a aproximação de *Qui-Quadrado* com 5 graus de liberdade).

Tabela 13. Médias de postos para as substâncias químicas auxiliares e teste de comparações múltiplas.

Substâncias químicas auxiliares	n_i	Médias dos		
		Postos	5%	1%
2- NaOCl 5,25%	405	770,50	A	A
1- Clorexidina Gel 2%	405	872,83	A	A
4- NaOCl 2,5%	405	1071,10	B	B
5- Clorexidina Líquida 2%	406	1338,30	C	C
6- NaOCl 0,5%	405	1433,39	C	C
3- Soro Fisiológico	405	1809,57	D	D
Total	2431			

5.4.4.3 Terço Apical

No terço Apical, as diferenças entre as substâncias químicas auxiliares, independentemente das profundidades ou das técnicas, o resultado do teste de Kruskal-Wallis ($H = 737,638$) foi significativo, tanto a 5% como a 1% ($p\text{-valor} < 0,0001$). A **TAB. 14** mostra os resultados.

Tabela 14. Médias de postos para as substâncias químicas auxiliares e teste de comparações múltiplas.

Substâncias químicas auxiliares	n_i	Médias dos		
		Postos	5%	1%
2- NaOCl 5,25%	405	837,00	A	A
1- Clorexidina Gel 2%	405	849,61	A	A
4- NaOCl 2,5%	405	1105,51	B	B
5- Clorexidina Líquida 2%	404	1359,55	C	C
6- NaOCl 0,5%	405	1439,88	C	C
3- Soro Fisiológico	406	1700,60	D	D
Total	2431			

5.4.5 Em cada profundidade, em todos os terços e técnicas qual é a melhor substância química auxiliar?

Para as profundidades 1, 2 e 3, o número total de amostras foi $N = 2430$ e todos os seis grupos testados apresentaram 405 elementos.

Para testar as substâncias químicas auxiliares na profundidade 4, o número total de amostras é $N = 810$ e os grupos têm 135 elementos.

5.4.5.1 Profundidade 1

Para a profundidade 1, a estatística de *Kruskal-Wallis* foi 1012,208 com um p-valor < 0,001, ou seja, as ações das substâncias químicas auxiliares são significativamente diferentes nessa profundidade.

As substâncias químicas auxiliares NaOCl 5,25%, Clorexidina Gel 2% e NaOCl 2,5% foram as mais efetivas. O outro grupo é formado pelas substâncias químicas auxiliares NaOCl 0,5% e Clorexidina Líquida 2% e, por último, o Soro Fisiológico como mostra a **TAB.15**.

Tabela 15. Médias de postos para as substâncias químicas auxiliares e teste de comparações múltiplas.

Substâncias químicas auxiliares	n _i	Médias dos		
		Postos	5%	1%
2- NaOCl 5,25%	405	846,00	A	A
1- Clorexidina Gel 2%	405	887,26	A	A
4- NaOCl 2,5%	405	917,49	A	A
6- NaOCl 0,5%	405	1388,68	B	B
5- Clorexidina Líquida 2%	405	1393,36	B	B
3- Soro Fisiológico	405	1860,21	C	C
Total	2430			

5.4.5.2 Profundidade 2

Na profundidade 2 apenas as substâncias químicas auxiliares 2 (NaOCl 5,25%) e 1 (Clorexidina Gel 2%) não diferiram significativamente entre si. Cada uma das substâncias químicas auxiliares seguintes diferiu do anterior ao nível de 5% (e também a 1% de significância). Assim, teve-se, pela ordem, do melhor para o pior, as seguintes substâncias NaOCl 5,25% e Clorexidina Gel 2%, NaOCl 2,5%, Clorexidina Líquida 2%, NaOCl 0,5% e Soro Fisiológico (**TAB.16**).

Tabela 16. Médias de postos para as substâncias químicas auxiliares e teste de comparações múltiplas.

Substâncias químicas auxiliares	n_i	Médias dos Postos	5%	1%
2- NaOCl 5,25%	405	773,00	A	A
1- Clorexidina Gel 2%	405	790,30	A	A
4- NaOCl 2,5%	405	1026,77	B	B
5- Clorexidina Líquida 2%	405	1336,19	C	C
6- NaOCl 0,5%	405	1535,90	C	C
3- Soro Fisiológico	405	1830,85	D	D
Total	2430			

5.4.5.3 Profundidade 3

No caso da profundidade 3, as substâncias químicas auxiliares formaram quatro grupos distintos: no primeiro, o mais efetivo, estão o NaOCl

5,25% e Clorexidina Gel 2%; o segundo grupo, um pouco menos efetivo, é formado pelo NaOCl 2,5% e a Clorexidina Líquida 2%; o terceiro grupo é formado pelo NaOCl 0,5%, que só é mais efetivo que o grupo controle (Soro Fisiológico). Essa ordem vale tanto para o nível de 5% como para o de 1% de significância.

Tabela 17. Médias de postos para as substâncias químicas auxiliares e teste de comparações múltiplas.

Substâncias químicas auxiliares	n _i	Médias dos		
		Postos	5%	1%
2- NaOCl 5,25%	405	724,50	A	A
1- Clorexidina Gel 2%	405	854,72	A	A
4- NaOCl 2,5%	405	1228,50	B	B
5- Clorexidina Líquida 2%	405	1260,95	B	B
6- NaOCl 0,5%	405	1499,03	C	C
3- Soro Fisiológico	405	1725,30	D	D
Total	2430			

5.4.5.4 Profundidade 4

Para a profundidade 4, o valor da estatística do teste de Kruskal-Wallis foi 281,971 (p-valor < 0,001), significando que houve diferenças entre as substâncias químicas auxiliares. A tabela 18 mostra em que comparações essas diferenças ocorreram.

Observando-se a ação das substâncias químicas auxiliares nas quatro profundidades, percebe-se que há diferenças nas suas ações nas diversas profundidades. Entretanto, quando se consideram todas as profundidades conjuntamente, fica evidente o fato de que a substância química auxiliar NaOCl 5,25% é a mais efetiva, seguido da Clorexidina Gel 2%, enquanto que o Soro Fisiológico (grupo controle) é o menos efetivo (**TAB.18**).

Tabela 18. Médias de postos para as substâncias químicas auxiliares e teste de comparações múltiplas.

Substâncias químicas auxiliares	n_i	Médias dos Postos	
		5%	1%
2- NaOCl 5,25%	135	179,50	A
1- Clorexidina Gel 2%	135	339,40	B
4- NaOCl 2,5%	135	394,03	B C
5- Clorexidina Líquida 2%	135	429,28	C D
6- NaOCl 0,5%	135	497,26	D
3- Soro Fisiológico	135	593,54	E
Total	810		

5.4.6 Em cada profundidade, em todos os terços e substâncias químicas auxiliares qual é a melhor técnica?

Nas profundidades 1, 2 e 3, o número total de amostras foi $N = 2430$ e todos os três grupos (técnicas) testados 810 elementos.

Ao testar as técnicas na profundidade 4, o número total de amostras foi $N = 810$ e os grupos 270 elementos.

5.4.6.1 Profundidade 1

Na profundidade 1, as técnicas diferiram entre si ao nível de 5% e de 1% de significância ($H = 24,662$ com um p -valor $< 0,001$). Ao fazer as comparações múltiplas, verificaram-se diferenças significativas entre a técnica Híbrida e as outras duas técnicas. Por outro lado, as técnicas Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP e HERO não diferiram significativamente aos níveis considerados (**TAB.19**).

Tabela 19. Médias de postos para as técnicas consideradas – Profundidade 1.

Técnicas	n_i	Médias dos Postos	5%	1%
Híbrida	810	1296,28	A	A
FOP-UNICAMP	810	1181,59	B	B
HERO	810	1168,63	B	B

Obs.: letras diferentes indicam significância ao nível indicado.

5.4.6.2 Profundidade 2

O teste de *Kruskal-Wallis* indicou que, ao nível de 0,003 de significância, existiram diferenças significativas entre as técnicas na profundidade 2. As comparações múltiplas indicaram que tais diferenças ocorreram apenas para o

nível de 5% de significância, entre a técnica Híbrida e as técnicas HERO e Cérvico-Apical da FOP. Quando se considera o nível de 1%, não foram detectadas diferenças significativas entre as técnicas.

Tabela 20. Médias de postos para as técnicas consideradas – Profundidade 2.

Técnicas	n_i	Médias dos Postos	5%	1%
Híbrida	810	1274,92	A	A
FOP-UNICAMP	810	1189,10	B	A
Hero	810	1182,47	B	A

Obs.: letras diferentes indicam significância ao nível indicado.

5.4.6.3 Profundidade 3

Com $H = 19,183$ ($p\text{-valor} < 0,001$), verificou-se que as técnicas diferiram entre si na profundidade 3. Em 5% de significância, a técnica Híbrida é considerada pior que as outras duas. Entretanto, a 1% de significância, apenas a técnica HERO diferiu da técnica Híbrida (**TAB.21**).

Tabela 21. Médias de postos para as técnicas consideradas – Profundidade 3.

Técnicas	n_i	Médias dos Postos	5%	1%
Híbrida	810	1288,69	A	A
FOP-UNICAMP	810	1201,37	B	A B
HERO	810	1156,45	B	B

Obs.: letras diferentes indicam significância ao nível indicado.

5.4.6.4 Profundidade 4

O teste de *Kruskal-Wallis* indicou não haver diferenças significativas entre as três técnicas na profundidade 4 ($H = 3,224$ e $p\text{-valor} = 0,200$). Os testes de comparações múltiplas, como era de se esperar, indicaram a mesma coisa, ou seja, nenhuma das três diferenças pôde ser considerada significativa, nem a 5% e muito menos a 1% de probabilidade (**TAB. 22**).

Tabela 22. Médias de postos para as técnicas consideradas – Profundidade 4.

Técnicas	n_i	Médias dos Postos	5%	1%
Híbrida	270	422,61	A	A
HERO	270	405,07	A	A
FOP-UNICAMP	270	388,82	A	A

Obs.: letras diferentes indicam significância ao nível indicado.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram selecionados dentes humanos extraídos para serem utilizados como espécimes, muito embora a maior parte dos estudos *in vitro* relatem infecção dos túbulos dentinários em dentes bovinos (Haapasalo & Ørstavik 1987, Ørstavik & Haapasalo 1990, Vahdaty *et al.* 1993, Perez *et al.* 1996, Siqueira & Uzeda 1996, Heling & Chandler 1998, Komorowski *et al.* 2000, Gomes *et al.* 2003). A dentina bovina, entretanto, difere da humana. O diâmetro dos túbulos dentinários bovinos são mais amplos (Perez *et al.* 1993, Schilke *et al.* 2000). Isto pode afetar o microambiente bacteriano, ou seja, a difusão de nutrientes, substâncias químicas auxiliares ou medicações intracanaís no interior dos túbulos dentinários. Similarmente, a presença de cimento intacto na superfície radicular pode limitar o crescimento bacteriano oriundo da polpa em direção às camadas mais profundas de dentina devido a uma fonte limitada de nutrientes. Isto indica que os microrganismos no interior dos túbulos dentinários podem ser diferentes em um ambiente rico em nutrientes ou em um ambiente deficiente. Portanto, a utilização de dentes humanos parece ser mais confiável na investigação da viabilidade bacteriana do interior dos túbulos dentinários do que a dentina bovina e a remoção do cimento é interessante quando feita a contaminação dos túbulos dentinários *in vitro*.

E. faecalis foi o microrganismo de escolha por possuir uma considerável resistência a substâncias químicas auxiliares e medicações comumente utilizadas em endodontia além de estar freqüentemente associado à presença de lesões periapicais persistentes e insucesso no tratamento endodôntico (Hancock *et al.* 2001, Love 2001, Pinheiro *et al.* 2003, 2004). É um microrganismo anaeróbio facultativo, relativamente fácil de ser cultivado e de alta relevância clínica. Outra espécie bacteriana poderia requerer simbiose de outro microrganismo para sobreviver no interior dos túbulos dentinários, enquanto o *E. faecalis* tem a capacidade de se estabelecer e sobreviver na ausência de outras bactérias (Dahlen & Haapasalo 1998) e sobre stress. *E. faecalis* é encontrado como

monoinfecção principalmente, em casos de dentes com necessidade de retratamento, na presença de lesões periapicais (Pinheiro *et al.* 2003). Encontra-se disponível na literatura um grande número de estudos avaliando diferentes métodos de infecção e desinfecção na presença do *E.faecalis* tornando, assim, possível a comparação dos nossos resultados a outros já relatados.

O tempo da contaminação foi estabelecido em 3 semanas, ou 21 dias, de acordo com Haapasalo & Ørstavik (1987). Estes autores verificaram através de Microscopia eletrônica de varredura e Brown-Brenn a completa contaminação dos túbulos dentinários. Um tempo de infecção prolongado leva a uma maior quantidade de túbulos infectados considerando que a profundidade média de penetração bacteriana aumenta vagarosamente com o tempo. Nossos resultados demonstraram que o *E. faecalis* foi capaz de penetrar profundamente no interior dos túbulos dentinários em todos os terços testados dos dentes humanos em 21 dias, já que houve crescimento bacteriano nas coletas de dentina dos grupos em que a substância química auxiliar não apresentava ação antimicrobiana. A remoção da *smear layer* previamente à contaminação pode ter ajudado nesta difusão bacteriana.

São encontrados estudos em que o tempo utilizado para a contaminação dos dentes varia entre 24 horas (Lynne *et al.* 2003), 7 dias (Sukawat & Srisuwan 2002, Gomes *et al* 2003, Dametto *et al. in press*), 9 dias (Schäfer & Bössmann 2005) e 21 dias (Siqueira & Uzeda 1996, Saleh *et al.* 2004, Cwikla *et al.* 2005).

Outro fator variável entre os estudos é a concentração bacteriana utilizada na contaminação do espécime que pode variar de 10^8 a $7,0 \times 10^8$. Geralmente, a concentração dos inóculos de bactérias facultativas utilizadas em trabalhos de suscetibilidade antimicrobiana aos agentes irrigantes e medicação intracanal, utilizando os métodos de difusão em agar e contato direto (Gomes *et al.* 2001, 2003, Vianna *et al.* 2004) é de $1,5 \times 10^8$ bactérias/ mL (correspondendo

ao padrão 0,5 da escala de McFarland) . Entretanto, preferimos utilizar o padrão 2 de McFarland ($6,0 \times 10^8$ bactérias/ mL) para podermos contaminar mais intensamente os túbulos dentinários em um período de 21 dias.

Várias metodologias podem ser utilizadas na verificação da atividade antimicrobiana de soluções químicas auxiliares ao preparo químico-mecânico e até medicações intracanaís. Realmente, a metodologia pode ser a possível explicação das diferenças encontradas entre alguns estudos na literatura. Algumas metodologias permitem um contato direto entre a substância e o microrganismo, como a difusão em Agar ou a própria metodologia do “contato direto” (Gomes *et al.* 2001, Vianna *et al.* 2004). Até mesmo na primeira parte deste estudo, em que são feitas coletas microbiológicas imediatamente após a instrumentação, há um contato direto entre os microrganismos presentes no interior do canal radicular e a substância química auxiliar testada. Em outras metodologias que, como exemplo, pode-se citar a segunda parte deste estudo, onde as amostras de dentina são removidas e plaqueadas, os microrganismos presentes no interior dos túbulos dentinários não apresentam íntimo contato com as substâncias antimicrobianas e as substâncias químicas auxiliares necessitam agir com certo distanciamento das células bacterianas.

As condutas tomadas durante as coletas microbiológicas também variam na literatura (Siqueira *et al.* 1997). No presente estudo, as amostras bacterianas coletadas do interior do canal foram realizadas com o auxílio de cones de papel absorvente estéreis. Estes cones foram transferidos para tubos contendo o meio de cultura BHI, e então plaqueados. O uso de cones de papel absorvente tem a vantagem de poder ser utilizado em metodologias *in vivo* e *in vitro*. Por outro lado, estas amostras são de certa forma limitadas, já que somente os microrganismos presentes no interior do canal radicular podem ser coletados, pois os localizados no interior dos túbulos dentinários são inacessíveis aos cones de papel absorvente (Menezes *et al.* 2004). Com a intenção de preencher esta lacuna, apresentamos no mesmo trabalho duas metodologias distintas: a coleta da

luz do canal e a dos túbulos dentinários imediatamente após o preparo químico-mecânico.

A metodologia das coletas iniciais e finais amostradas da luz do canal radicular utilizadas neste estudo foi similar às utilizadas por Ørstavik & Haapasalo (1990), Dalton *et al.* (1998) e Siqueira *et al.* (1999). Siqueira *et al.*, em 1999 e Dalton *et al.*, em 1998, não utilizaram solução irrigadora com ação antimicrobiana. Por esta razão somente a ação mecânica da instrumentação foi testada, assim como neste trabalho quando o soro fisiológico foi a solução irrigadora.

Nas coletas microbiológicas realizadas imediatamente após o preparo químico-mecânico, variando as substâncias químicas auxiliares, verificou-se a desinfecção de aproximadamente 100% dos canais radiculares inclusive na utilização de uma substância sem qualquer efeito antimicrobiano como o soro fisiológico, concordando com os trabalhos de Ferraz *et al.* 2001, Dametto *et al. in press*, Menezes *et al.* 2004. Isto se deve ao fato de que a ação mecânica dos instrumentos endodônticos associada ao fluxo contínuo de uma substância irrigadora promove uma significativa redução bacteriana (Byström & Sundqvist 1981,1983).

A utilização de substâncias químicas auxiliares e o ato da irrigação são de extrema importância na limpeza do canal radicular. Para ser efetivo, vários aspectos têm de ser considerados: lavagem, ação antimicrobiana e química, tipo de soluções e de sistema de irrigação (Walton 1982). Os debrís e os conteúdos bacterianos são reduzidos em quase 95% pela ação de lavagem com salina (Siqueira *et al.* 1999, Dametto *et al. in press*) quando associados a uma técnica de instrumentação assim como nos nossos resultados. Os grupos nos quais apenas a solução salina foi testada, a redução do *E.faecalis* na luz do canal proporcionada pelas técnicas de instrumentação e solução salina esteve em torno de 99%. Esta redução é significativa mas estatisticamente apresenta diferença quando comparada às outras substâncias químicas auxiliares testadas.

Entretanto, a efetividade da irrigação com salina está diretamente relacionada com o volume e a frequência de irrigação, como também com a profundidade da agulha irrigadora, da cânula aspiradora e do fluxo e refluxo. A ação da lavagem, que é a remoção física dos debris do interior do canal radicular, deve ser realizada com salina estéril, por ser esta mais biocompatível aos fluidos teciduais que a água destilada ou outros agentes químicos.

Substâncias químicas auxiliares tais como NaOCl, clorexidina nas formulações gel ou em solução, EDTA, devem ser utilizados durante o preparo químico-mecânico por possuírem ação antimicrobiana. A salina seria a responsável pela remoção dos debris, podendo dispor de um volume e pressão maiores por ser compatível com os tecidos periapicais quando extravasada pelo forame apical.

O uso de agentes químicos, além da solução salina como solução irrigadora, é necessário para atuar na desinfecção dos túbulos dentinários, istmos, áreas onde o instrumento não pode alcançar; para dissolução de tecido pulpar, para promover limpeza de parede com a remoção da *smear layer* e agir como lubrificante durante a exploração ou negociação de canais constrictos.

Embora o NaOCl seja a substância química auxiliar ao preparo mecânico mais popular em endodontia, não há consenso sobre sua concentração ideal (Byström & Sundqvist 1983). Spangberg *et al.* (1973) testaram vários agentes químicos tanto em métodos *in vitro* quanto *in vivo*, e relataram que a solução ideal deveria combinar um máximo efeito antimicrobiano com uma baixa toxicidade. O NaOCl 5,25% tem sido considerado mais forte que o necessário para a eliminação da maior parte dos microrganismos encontrados no interior dos canais radiculares, sendo extremamente tóxico e irritante. Em contrapartida, o NaOCl 0,5% necessita de um tempo relativamente alto para exercer sua ação antimicrobiana contra alguns microrganismos mais resistentes à terapia endodôntica como o *E.faecalis* e *S.aureus*. Vianna *et al.*, em 2004, mostraram em

seu experimento que o NaOCl 0,5% necessitou de 30 minutos em contato direto com o *E.faecalis* para inibir totalmente seu crescimento, enquanto o NaOCl 2,5% e o 5,25% necessitaram de 10 minutos e 15 segundos, respectivamente.

O gluconato de clorexidina, embora não tão difundido quanto o NaOCl como substância química auxiliar, possui uma excelente ação antimicrobiana (Siqueira & Uzeda 1997, Ferraz *et al.* 2001, Gomes *et al.* 2001, Zamany *et al.* 2003, Vianna *et al.* 2004) e muitos autores sugerem sua utilização na prática endodôntica (Vahdaty *et al.* 1993, Jeansonne & White 1994), embora sempre na forma líquida.

A clorexidina gel foi primeiramente avaliada como medicação intracanal demonstrando bons resultados (Delany *et al.* 1982, Lindskog *et al.* 1997, Barbosa *et al.* 1997, Siqueira & Uzeda 1997) assim como quando foi avaliada como substância química auxiliar ao preparo mecânico (Ferraz 1999, Ferraz *et al.* 2001). O gel de natrosol (hidroxietil celulose, pH 5,5) utilizado como gel-base para a clorexidina é solúvel em água e amplamente utilizado em formulações de xampus, géis e sabões. Pelo fato do gel ser solúvel em água, a clorexidina e os debris são removidos fisicamente pela irrigação com a salina. A formulação em gel pode manter o princípio ativo do gluconato de clorexidina por mais tempo em contato com os microrganismos inibindo o crescimento bacteriano (Ferraz *et al.* 2001).

Em estudos prévios, Gomes *et al.* (1999) testaram a atividade antibacteriana de várias substâncias químicas auxiliares, incluindo a clorexidina em ambas as formulações (gel e líquida) e diferentes concentrações do NaOCl contra determinados microrganismos endodônticos. Na difusão em Agar, a clorexidina gel foi mais eficiente que a líquida em concentrações equivalentes (2%), embora nenhuma diferença estatística tenha sido encontrada. Os halos de inibição formados pelos grupos que continham a clorexidina foram significativamente maiores que os halos formados pelo NaOCl em todas as concentrações inclusive o NaOCl 5,25%. Vianna *et al.* (2004) demonstraram

através do teste de contato direto que a clorexidina líquida 2% levou menos que 30 segundos para eliminar completamente o *E.faecalis* ao passo que clorexidina gel na mesma concentração levou 2 minutos.

Em nosso experimento, o tempo de contato, ou seja, o tempo em que a substância auxiliar esteve presente no interior dos canais radiculares durante o preparo químico-mecânico foi 10 minutos. Esse tempo foi suficiente para o NaOCl 5,25% eliminar todos os microrganismos presentes, tanto na luz do canal radicular, como em todas as profundidades de dentina testadas, imediatamente após o preparo químico-mecânico. A clorexidina gel 2% também obteve resultados satisfatórios, todavia, diferiu estatisticamente do NaOCl 5,25% na desinfecção das profundidades de dentina. Este tempo não foi suficiente para a eliminação do *E.faecalis* nos grupos em que a solução química utilizada foi o NaOCl 0,5%, onde em alguns casos assemelhou-se ao grupo controle. O NaOCl 2,5% também não agiu da mesma forma que o NaOCl 5,25% e a clorexidina gel 2%, mas obteve resultados mais satisfatórios que o 0,5%. Tal fato indica a importância da concentração e do tempo de contato do NaOCl na eliminação dos microrganismos. Buck *et al.* (2001) verificaram a ação antimicrobiana do NaOCl 0,5% e da solução de clorexidina 0,12% com o tempo de contato estabelecido em 1 minuto e concluíram que este tempo foi insuficiente para que a substância química auxiliar penetrasse através de toda a extensão dos túbulos dentinários o que não permitiu sua ação nos microrganismos presentes em seu interior.

Provavelmente, algumas células bacterianas presentes no interior dos túbulos, sobreviveram ao preparo químico-mecânico, como já visto na literatura (Dametto *et al. in press*). Entretanto, devido sua baixa concentração, não foi possível detectá-las pela técnica da cultura microbiológica clássica.

Embora os resultados dos grupos que continham a clorexidina gel 2% e o NaOCl 5,25% não sejam compatíveis estatisticamente, deve-se levar em consideração trabalhos previamente publicados que indicam uma menor

toxicidade da clorexidina, além da importância de sua atividade antibacteriana residual que não foi avaliada neste estudo, a qual inibe por um período de 7 dias a recolonização do canal radicular por bactérias remanescentes (Dametto *et al. in press*). Outro fator seria que em um tempo maior de contato, como em um tratamento endodôntico *in vivo* que não levaria menos que 30 minutos, sua ação poderia se comparar ao do NaOCl 5,25%.

A ação antibacteriana proporcionada pela clorexidina líquida 2%, em nosso estudo, não foi a esperada. No interior dos túbulos dentinários, os grupos nos quais esta substância foi empregada como agente químico, não obteve o mesmo efeito que a clorexidina gel 2% e o NaOCl 5,25%, chegando, a se comportar como o NaOCl 0,5% nos terços médio e apical e nas profundidades 1, 2 e 4 cuja ação em períodos curtos (10 minutos) não foi suficiente para a eliminação do *E.faecalis* intratubular. Estes resultados discordam de estudos que verificam a efetividade da substância via contato direto como de Vianna *et al.* 2004. Esta diferença pode ser explicada pela capacidade que a clorexidina na forma gel possui em diminuir a formação de *smear layer* nas paredes do canal radicular (Ferraz *et al.*2001), fato este que não se repete com a líquida. Sendo assim, a clorexidina gel associada à instrumentação mecânica permite que os túbulos dentinários não fiquem totalmente obliterados por remanescentes pulpare, dentinários, bactérias, o que proporciona uma ação mais efetiva desta substância no seu interior. Talvez ao associar a clorexidina líquida a uma solução quelante, como o EDTA, a diferença entre as duas formulações diminua.

Neste estudo, optamos pela não utilização de uma solução quelante pois, em estudos prévios, verificou-se a presença de ação antimicrobiana proporcionada pelo EDTA na metodologia de halos de inibição. Esta atividade antibacteriana poderia influenciar nos resultados já que o objetivo deste trabalho foi avaliar esta atividade apenas para as substâncias químicas auxiliares.

Na coleta microbiológica realizada na luz do canal radicular a clorexidina líquida 2% reduziu em 100% a contagem de UFC pós preparo biomecânico, concordando com os resultados publicados previamente por Dametto *et al.* (*in press*) o que comprova sua eficácia quando em contato com os microrganismos.

Visando a verificação da manutenção da desinfecção promovida pelas substâncias químicas auxiliares testadas no interior dos túbulos dentinários imediatamente após o preparo químico-mecânico, neutralizadores específicos dos agentes antimicrobianos testados foram utilizados com a finalidade de interromper a ação do agente desinfetante no momento em que a instrumentação foi finalizada.

Com relação às técnicas estudadas, não houve diferença estatística entre elas na luz do canal radicular. Apesar de não haver diferenças quanto a redução bacteriana proporcionada pelas diferentes técnicas, deve-se levar em consideração o tempo, a facilidade, a forma do preparo, limpeza de parede, segurança e habilidade do profissional (Shäfer *et al.* 2003). Todavia, no interior dos túbulos dentinários, as melhores técnicas foram a Cérvico –Apical da FOP-UNICAMP e a HERO diferindo estatisticamente da técnica Híbrida. Ao avaliar cada terço separadamente, no terço cervical este mesmo resultado foi obtido. No terço médio, não houve diferenças estatísticas entre as técnicas. No terço apical, a técnica Híbrida e a Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP agiram semelhantemente, fato este, explicado pois as duas técnicas possuem a mesma seqüência de instrumentação manual.

O tempo interfere muito no tratamento endodôntico já que quanto maior o tempo que a substância química auxiliar fica em contato com os microrganismos, melhor é sua ação. Caso o agente antimicrobiano não possua uma ação efetiva em um curto espaço de tempo, terminar rapidamente o tratamento endodôntico pode não eliminar uma quantidade de microrganismos

suficiente para o sucesso do tratamento. Entretanto, como foi padronizado o tempo de instrumentação dos canais radiculares em 10 min, não foi possível avaliar a influência do tempo na efetividade das técnicas empregadas utilizando as substâncias químicas testadas.

Baseado nas evidências deste estudo, a desinfecção do sistema de canais radiculares promovida pela ação mecânica da instrumentação como as técnicas Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP e HERO associadas ao uso de uma substância química auxiliar como o NaOCl 5,25% e mesmo a clorexidina gel 2% são as terapias de eficazes na desinfecção dos microrganismos presentes na luz do canal radicular e no interior dos túbulos dentinários.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, frente às metodologias empregadas, é possível concluir que:

✓ A instrumentação dos canais radiculares reduz consistentemente a população de *Enterococcus faecalis* presente na luz do canal radicular.

✓ O NaOCl 5,25% e a clorexidina gel 2% são as substâncias químicas auxiliares testadas mais eficientes na desinfecção dos túbulos dentinários, sendo a primeira melhor que a segunda, seguidas do NaOCl 2,5%, clorexidina líquida 2% e NaOCl 0,5%.

✓ No interior dos túbulos dentinários as técnicas Cérvico-Apical da FOP-UNICAMP e a HERO apresentaram os melhores resultados.

✓ A clorexidina gel 2% obteve melhores resultados que a líquida na mesma concentração quando associadas à instrumentação mecânica na desinfecção dos túbulos dentinários.

8. REFERÊNCIAS*

1. Abbott PV, Hume WR, Heithersay GS. The release and diffusion through human coronal dentine *in vitro* of triamcinolone and demeclocycline from Ledermix paste. *Endod Dent Traumatol*. 1989; 5:92-7.
2. Abbott PV. Medicaments: aids to success in endodontics. Part 1. A review of literature. *Aust Dent J* 1990; 35:438-48.
3. Abou-Rass M, Piccinino MV. The effectiveness of four irrigation methods on the removal of root canal debris. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1982; 54: 323-8.
4. Adib V, Spratt D, Ng Y-L, Gulabivala K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J* 2004; 37: 542-551.
5. Ando N, Hoshino E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. *Int Endod J* 1990; 23: 20-7.
6. Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall *in vitro*. *J Dent Res* 1982; 61: 435-8.
7. Barbosa CAM, Gonçalves RB, Siqueira Jr JF, Uzeda M. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament: a clinical and laboratory study. *J Endod* 1997; 23:297-300.
8. Basrani B, Santos MJ, Tjäderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, Lawrence HP, Friedman S. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94: 240-5.*

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

9. Baumgartner JC, Falkler Jr WA. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* 1991; 17: 380-3.*
10. Baumgartner IC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J Endod* 1992; 18: 605-12.
11. Becking AG. Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 192-96.
12. Beltz RE, Torabinejad M, Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. *J Endod* 2003; 29:334-7.
13. Bondestam O, Gahnberg L, Sund ML, Linder L. Effect of chlorhexidine treatment on the prevalence of *mutans streptococci* and *lactobacilli* in patient with impaired salivary secretion rate. *Spec Care Dentist* 1996; 16: 123-7.
14. Buck R, Eleazer PD, Staat RH. *In vitro* disinfection of dentinal tubules by various endodontic irrigants. *J Endod* 2002; 25:786-8.
15. Byström A & Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res*, 1981; 89:321-8.
16. Byström A & Sundqvist G. Bacteriological evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1983; 55: 307-12.
17. Campos H. Estatística Experimental não-paramétrica. 4ª edição. Piracicaba: FEALQ, 1983. 349p.
18. Chong BS, Pitt Ford TR The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J* 1992; 25,97-106.
19. Ciucchi B, Kheitabi M, Holz I. The effectiveness of different endodontic irrigation procedures on the removal of the smear layer: a scanning electron microscopic study. *Int Endod J* 1989; 1:21-8.

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

20. Civjan S, Huget EF, De Simon LB. Potencial application of certain nickel-titanium (nitinol) alloys. *J Dent Res* 1975; 54: 89-96.
21. Cwikla SJ, Bélanger M, Giguère S, Progulske-Fox A, Vertucci FJ. Dentinal tubule disinfection using three calcium hydroxide formulations. *J Endod* 2005; 31: 50-52.
22. Coldero LG, McHugh S, MacKenzie D & Saunders WP. Reduction in intracanal preparation with and without apical enlargement. *Int Endod J* 2002; 35: 437-446.
23. Dahlen G, Haapasalo M. Microbiological of apical periodontitis. In: *Orstavik D, Pitt Ford TR, eds Essential Endodontology: Prevention and treatment of apical periodontitis* (1998). 1st edn. Oxford, UK: Blackwell Sciences Ltd., 106-25.
24. Dahlen G, Samuelsson W, Moander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15: 775-12.
25. Dalton BC, Ørstavik D, Philips C, Pettiette, Trope M. Bacterial reduction with Nickel-Titanium rotary instrumentation. *J Endod* 1998; 24: 763-767.
26. Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA,Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* (In press).
27. Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1928;53:518-23.
28. Eliopoulos GM. Enterococcal endocarditis. In: Kaye D.ed. *Infective Endocarditis*. New York, USA: Raven Press 1992; 209-23.*

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

29. Engström B, Hard AF, Segerstad L, Ramstrom G, Frostell G. Correlation of positive cultures with the prognosis for root canal therapy. *Odontol Revy* 1964; 15: 257-69.
30. Engström B. The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontol Revy* 1964; 15: 87-105.
31. Epstein JB, McBride BC, Stevenson-Moore P, Merilees H, Spinelli J. The efficacy of chlorhexidine gel in reduction of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* species in patients treated with radiation therapy. *Oral Sug Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 172-8.
32. Ercan E, Özekinci T, Atakul F, Gül K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *J Endod* 2004; 30: 84-87.
33. Fabricius L, Dahlen G, Holm SE, Moller AJR. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982; 90: 200-6.
34. Fardal O, turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc* 1986; 112: 863-9.
35. Felmingham D, Wilson APR, Quintana AI, Grüneberg RN. Enterococcus species in urinary tract infection. *Clin Infec Dis* 1992; 15:295-301.
36. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod* 2001; 7: 452-5.
37. Foley DB, Weine FS, Hagen JC, deObarrio JJ. Effectiveness of selected irrigants in the elimination of *Bacterioides melaninogenicus* from the root canal system: an *in vitro* study. *J Endod* 1983; 9: 236-41.
38. Garberoglio R, Brannström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol* 1976;21:355-362.

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

39. Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A & Brandt M. Toxicity concentrated sodium hypochlorite used as endodontic irrigant. *Int Endod J* 2004; 37: 272-80.
40. Gomes BPFA, Drucker DB, Liley JD. Negative and positive associations between bacterial species in root canals. *Microbios* 1994a; 80:231-243.
41. Gomes B PF A, Drucker DB, Liley JD. Association of specific bacteria with some endodontic sings and symptoms. *Int Endod J*, 1994b;27: 291-298.
42. Gomes BPFA. An investigation into the root canal microflora. Manchester (Thesis of Doctor of Philosophy-UDHM, UK) 1995.
43. Gomes BPFA, Drucker DB, Liley JD. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J* 1996 a; 29: 69-75.
44. Gomes BPFA, Liley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J* 1996 b;29:235-241.
45. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Variations in the susceptibility of selected microorganisms to endodontic irrigants (BES Spring Meeting abstract). *J Endod* 1999; 25: 299.
46. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001; 34: 424-8.
47. Gomes BPFA. Microrganismos: quais são, onde estão e que danos causam? In: CARDOSO, Rielson José Alves; GONÇALVES, Elenice Aparecida Nogueira.(Org). Endodontia & Trauma. 1^a.ed. 2002,v. 2, p.77-97.*

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

48. Gomes BPFA, Sato CC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. *Int Endod J* 2003 a; 36: 604-9.
49. Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. *J Endod* 2003 b; 36:267-275.
50. Graninger W, Ragette R. Nasocomial bacteremia due to *E. faecalis* without endocarditis. *Clin Infect* 1992; 15: 49-57.
51. Greenstein G, Bermant C, Jaffin R. Chlorhexidine an adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol* 1986; 00: 370-8.
52. Haapasalo M, Ranta H, Ranta KT. Facultative gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta Odontol. Scand* 1983; 41:19-22.
53. Haapasalo M, Ørstavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987; 1375-1379.
54. Hancock HH III, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacetria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North America population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91: 579-86.
55. Hauman CHJ & Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J* 2003; 36; 75-85.
56. Heling I, Pecht M. Efficacy of Ledermix paste in eliminating *Staphylococcus aureus* from infected dentinal tubules *in vitro*. *Endod Dent Traumatol* 1991; 7: 251-4.*

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

57. Heling I, Steinberg D, Kening S, Gavrilovich I, Sela MN, Friedman M. Efficacy of sustained-released device containing chlorhexidine and Ca(OH)₂ in preventing secondary infection of dentinal tubules. *Int Endod J* 1992; 25: 20-4.
58. Heling I, Chandler NP. Antimicrobial effects of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J* 1998; 31:8-14.
59. Hennessey TD. Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Periodontol* 1977;4:36-48.
60. Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation: literature review and case reports. *Int Endod J* 2000; 33:186-93.
61. Hülsmann M, Schade M, Schäfers F. A comparative study of canal root preparation with Hero 642 and Quantec SC rotary NiTi instruments. *Int Endod J* 2001; 34:538-546.
62. Ida RD, Gutmann JL. Importance of anatomic variables in endodontic treatment outcomes: case report. *Endod Dent Traumatol.* 1995; 11: 199-203.
63. Jansen HJ, Van der Hoeven JS. Protein degradation by *Prevotella intermedia* and *Actinomyces meyeri* supports the growth of non-protein-cleaving oral bacteria in serum. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 346-53.
64. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigant. *J Endod* 1994;20: 276-8.
65. Jones WG, Barie PS, Yurt RW, Goodwin CW. Enterococcal burn sepsis: a highly lethal complication in severely burned patients. *Arch Surg* 1986; 121: 649-52.
66. Jung S, Safavi K, Spangberg L. The effectiveness of chlorhexidine in the prevention of canal root reinfection. *J Endod* 1999; 28: 288.*

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

67. 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;26:599-604.*
68. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20: 340-9.
69. Karagöz-Küçükay I, Ersev H, Engin-Akkoca E, Küçükay S, Gürsoy T. Effect of rotational speed on root canal preparation with HERO 642 rotary NiTi Instruments. *J.Endod* 2003;29:447-449.
70. Kettering JD, Torabinejad M. *Microbiologia e Imunologia* 1997. In: Cohen S & Burns RC. Caminhos da Polpa. 6 th edn. Rio de Janeiro. Koogan SA Mosby CO.
71. Khardori N, Wong E, Carrasco CH, Wallace S, Patt Y, Bodey GP. Infections associated with biliary drainage procedures in patients with cancer. *Rev of Infect Dis* 1991; 13: 587-91.
72. Komorowski R, Grad H, Wu XY Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine treated bovine root dentin. *J Endod* 2000; 26: 315-7.
73. Kvist T, Molander A, Dahlén G, Reit C. Microbiological evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized, clinical trial. *J Endod* 2004; 30:572-576.
74. Kuttler Y. Endodoncia prática. México, *Alpha* 1961:3.
75. Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microbiol Immunol* 1997; 12: 318-22.
76. Lenet BJ, Komorowski R, Wu XY, *et al.* Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. *J Endod* 2000; 11: 652-5.

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

77. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silava LAB, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as root canal irrigating solution. *J Endod* 1999; 3: 167-71.
78. Lindskog S, Pierce AM, Blomlöf L. Chlorhexidine as root canal medicament for treating inflammatory lesions in the periodontal space. *Endod Dent Traumatol* 1998; 14: 186-90.
79. Longworth AR. Chlorhexidine. In: Hugo WB (ed): Inhibition and destruction of the microbial cell. Academic Press, London, New York 1971:96-106.
80. Lopes HP & Siqueira JR JF. Endodontia-biologia e técnica. 1ª ed. MEDSI, 1999.
81. Love MR. Regional variation in root dentinal tubule infection by *Streptococcus gordonii*. *J Endod* 1996; 22: 290-3.
82. Love RM. *Enterococcus faecalis*- a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001; 34:399-405.
83. Lynne RE, Liewehr FR, West LA, Patton WR, Buxton TB, McPherson JC. *In vitro* antimicrobial activity of various medication preparations on *E. faecalis* in root canal dentin. *J Endod* 2003;29: 187-190.
84. Marsh P & Martin M. *Oral Microbiol* 1992; 3rd edn, London, UK: Champan and Hall.
85. Matusow RJ Endodontic cellulitis flare-up Case report. *Aust Dent Journal* 1995; 36-8.
86. Mayrand D, McBride BC. Ecological relationships of bacteria involved in a site, mixed anaerobic infection. *Infect Immun* 1980; 27: 44-50.
87. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.*1999;12: 147-79.
88. Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo CHR, Mancini MNG. *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and

- intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J* 2004; 37:311-319.*
89. Messer HH, Chen RS. The duration of the effectiveness of canal root medicaments. *J Endod* 1984; 6:240-5.
 90. Miller W D. The microorganisms of the human. 1st edn. Philadelphia, PA, USA: SS White Dental Mfg.Co., 1894.
 91. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31:1-7.
 92. Möller AJR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth: methodological studies. *Odontol Tidskr.* 1966; 74:1-380.
 93. Möller AJR, Fabricus L, Dahlén G, Öhman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigeneous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981; 89:475-84.
 94. Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod* 2004; 30:785-787.
 95. Nagaoka S, Miyazaki Y, Liu HJ, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. *J Endod* 1995; 21: 70-73.
 96. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod* 2004; 11: 778-781.
 97. Nair R. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 1987; 1:29-39.
 98. Nair PNR, Sjögren U, Key G, Kahnberg K-E, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, a symptomatic human teeth with therapy-

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

resistant periapical lesions: a long term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990; 16: 580-8.*

99. Nair PNR, Sjögren U, Fidgor D, Sundqvist G. Persistent periapical radioluscencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1999; 87:617-27.
100. Oguntebi PR Dentine tubule infection and endodontic therapy implications. *Int Endod J* 1994; 27:218-22.
101. Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J* 2004; 37: 38-41.
102. Önçag Ö, Hosgör 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: 423-32.
103. Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6: 142-9.
104. Parsons GJ, Patterson SS, Miller CH, Katz S, Kafrawy AH, Newton CW. Uptake and release of chlorhexidine by bovine pulp and dentin specimens and their subsequent acquisition of antibacterial properties. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1980; 49: 455-9.
105. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod* 1985;11:525-8.
106. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in Lithuanian population. *J Endod* 2000; 26: 593-5.

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

107. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *J Endod* 2001; 34:429-34. *
108. Perez F, Rochd T, Lodter JP. *In vitro* study of the penetration of three bacterial strains into root dentine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993; 76:97-103.
109. Perez F, Calas P, Rochd T. Effect of dentin treatment on *in vitro* root tubule bacterial invasion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 82:446-51.
110. Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. *Int Endod J* 1995; 28: 95-9.
111. Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR. Penetration of bacteria in bovine root dentine *in vitro*. *Int Endod J* 2000; 33: 28-36.
112. Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, Van Wilkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2001; 27: 76-81.
113. Pettiette M, Metzger Z, Phillips C, Trope M. Endodontic complications of root canal therapy performed by dental students with stainless steel K-files and NiTi hand files. *J Endod* 1999; 25: 230-4.
114. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root –filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003; 36, 1-11.
115. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Drucker DB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Antimicrobial susceptibilities of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2004; 37: 756-63.
116. Rams TE, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J. Enterocci in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1992; 7: 249-52.

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

117. Richet H, Hubert B, Nitemberg A, Andreumont A, Buu-Hoi P, Ourbak P *et al.* Prospective multicentre study of vascular catheter related complications and risk factors for positive central catheter cultures in intensive care unit patients. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2520-5.*
118. Rôças IN, Siqueira Jr JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; 30: 315-320.
119. Rogers GO. Bacteria in teeth. *Dent Cosmos* 1878; 20: 181.
120. Röllä G, Løe H, Schiott CR. The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins. *J Periodontol* 1970; 5: 90-5.
121. Ruoff KL, de la Marza L, Murtagh MJ, Spargo JD, Ferraro MJ. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 435-7.
122. Safavi KE, Spangberg LSW, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. *J Endod* 1990; 16: 207-210.
123. Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Ørstavik D. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers *in vitro*. *Int Endod J* 2004;37:193-198.
124. Schäfer E, Fritzenschaft F. Vergleichende Untersuchung zweier permanent rotierender Wurzelkanalaufbereitungssysteme auf Nickel-titan basis. *Endodontie* 1999; 8: 213-26.
125. Schäfer E, Bossmann K. Antimicrobial efficacy of chloroxylenol and chlorhexidine in the treatment of infected root canals. *Am J Dent* 2001a; 14:233-37.
126. Schäfer E. Shaping ability of Hero 642 rotary NiTi instruments and stainless steel hand K-Flexofiles in simulated curved root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001b; 92: 215-20.

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

127. Schäfer E, Bossmann K. Antimicrobial efficacy of clorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005; 31: 53-56. *
128. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11:6-9.
129. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LSW. Antifungal effects of sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *J Endod* 1999; 25: 235-8.
130. Schieler H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am* 1974; 18:269-96.
131. Schilke R, Lisson JA, Baub O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 355-361.
132. Shovelton DS The presence and distribution of microorganisms within non-vital teeth. *Br Dent J* 1964; 117: 101-7.
133. Shuping GB, Ørstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod* 2000; 26: 751-55.
134. Siqueira Jr JF, Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod* 1996; 22:674-676.
135. Siqueira Jr JF, Uzeda M. Intracanal medicaments: Evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod* 1997a; 3: 167-9.
136. Siqueira Jr JF, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three

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

- irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal *in vitro*. *Int Endod J* 1997b; 30:279-82.
137. Siqueira jr JF, Batista MMD, Fraga RC, Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod*. 1998; 24: 414-6.
138. Siqueira Jr JF, Lima KC, Magalhães FAC, Lopes HP, Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod* 1999; 25:332-335.
139. Siqueira Jr JF. Endodontic infections: Concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 ; 94: 281-293.
140. Siqueira JF, Rôças IN, Santos SRLD, Lima KC, Magalhães FAC, Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod* 2002 ; 28: 181-184.
141. Siren EK, Haapasalo MPP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 1997; 30: 91-95.
142. Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An *in vitro* evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 2001; 34:300-307.
143. Spangberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1973: 36; 856-70. *

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

144. Spangberg LSM Endodontic Medicaments. In: Smith DC & Williams DF, eds. *Biocompatibility of Dental Materials* 1st edn. Boca Raton, USA: CRC Press 1982: 223-257.*
145. Sukawat C, Srisuwan T. A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations human dentin infected with *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2002; 28:102-4.
146. Sundqvist G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. *Dissertation*. Umea, Sweden, University of Sweden, 1976.
147. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992 a; 18:427-30.
148. Sundqvist G. Association between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992 b; 257-62.
149. Sundqvist G, Figdor D, Person S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998; 85: 86-93.
150. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Anibal FF, Faccioli LH. Inflammatory response of to different endodontic irrigating solution. *Int Endod J* 2002; 35: 735-9.
151. Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol* 1990;6: 73-7.
152. Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules *in vitro*. *Endod Dent Traumatol* 1993; 9:243-8.
153. Valdrighi L, Biral RR, Pupo J, Souza-Filho FJ. Técnicas de instrumentação que incluem instrumentos rotatórios no preparo biomecânico dos canais radiculares. In: *Endodontia: Tratamento de*

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

canais radiculares, 3 rd edn. São Paulo, Brazil: Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda 1998: 419-28.

154. Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, 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;97:79-84.
155. Zamany A, Safavi K, Spangberg LSW. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96: 578-81.
156. Walia H, Brantley WA, Gerstein H. An initial investigation of bending and torsional properties of Nitinol root canal files. *J Endod* 1988; 14:346-51.
157. Walker a. A definitive and dependable therapy for pulplessteeth. *J Am Assoc* 1936; 23: 1418-24.
158. Weiger R, de Lucena J, Decker HE, Löst C. Vitality status of microorganisms in infected human root dentine. *Int Endod J* 2002; 35, 166-171.
159. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod* 1997; 229-31.

*

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

ANEXO I- Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

Este projeto de pesquisa intitulado “Avaliação *in vitro* da suscetibilidade do *Enterococcus faecalis* na associação de 3 técnicas de instrumentação e 3 irrigantes no tratamento endodôntico” foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em humanos da FOP-UNICAMP .

ANEXO II- Meio de cultura

1. Brain Heart Infusion Agar (BHI) – LAB M (Bury, UK)

1.1 Descrição

Este meio foi desenvolvido inicialmente para o isolamento de patógenos orais. Com a adição de 5% de sangue desfibrinado, este meio permite o crescimento da maioria dos microrganismos fastidiosos. O fosfato tamponado ajuda neutralizar os ácidos produzidos pela utilização da glicose mantendo a viabilidade dos microrganismos. Este meio não é recomendado para a determinação das reações hemolíticas porque contém glicose em sua composição.

1.2 Preparo

Adicionar 24.5 g do pó em 500 ml de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47 °C antes de distribuir sobre as placas. Caso deseje adicionar assepticamente 5% de sangue de carneiro desfibrinado, misturar bem e distribuir nas placas de petri.

1.3 Aparência

Amarelo claro (sem a adição de sangue) ou vermelho devido à adição de sangue.

1.4 Armazenagem

Placas: até 7 dias a 4 °C no escuro.

1.5 Inoculação

Em superfície.

1.6 Incubação

Tempo e temperatura para cada microrganismo.

1.7 Fórmula

	g/L
Infusão de sólidos de cérebro e coração	17,5
Proteose peptona	10,0
Glicose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato di-sódico	2,5
Ágar nº 2	12,0

pH: 7,4 ± 0,2

2. Brain Heart Infusion Broth (BHI) – LAB M (Bury, UK)

2.1 Descrição

Meio de infusão isotônico rico em triptose (uma mistura de carne e peptonas do leite) promovendo uma ampla gama de substratos. Uma concentração baixa de glicose é utilizada para estimular o crescimento precoce. É ligeiramente tamponado para impedir a morte rápida de algumas espécies devido à produção de ácido.

2.2 Preparo

Dispensar 18,5 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ficar em repouso por 10 minutos e depois dissolvida sob aquecimento brando antes de ser dispensada em tubos que são deixados semiabertos durante a esterilização. A esterilização é feita por autoclavagem a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a autoclavagem.

2.3 Aparência

Amarelo claro.

2.4. Armazenagem

Em tubos com tampas, até 3 meses a 15-20°C no escuro.

2.5 Inoculação (como meio de cultura para sangue)

Usar um volume mínimo de 50 ml de meio e adicionar sangue numa diluição de 1:10 a 1:20. Usar em conjunto com um meio de cultura anaeróbico.

2.6 Incubação

37°C aerobicamente até 15 dias.

2.7 Fórmula

	g/L
Infusão de sólidos de cérebro de boi	12,5
Infusão de sólidos de coração	5,0
Proteose peptona	10,0
Glicose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato di-sódico	2,5

pH: 7,4 ± 0,2	

ANEXO III- Soluções neutralizadoras (Siqueira *et al.* 1998)

As soluções neutralizadoras foram utilizadas nos testes com a finalidade de neutralizar as ações residuais dos irrigantes ou medicações nos experimentos.

1. Neutralizadores da clorexidina

0,5 % de Tween 80 e 0,07 % de lecitina de soja

1.1 Preparo

Previamente à esterilização, deve-se adicionar 0,5 g de Tween 80 (Polyoxyethylene-sorbitan monooleate, Sigma, Chemical, St. Louis, USA) e 0,07 g de

lecitina de soja (Proderma Farmácia de Manipulação Ltda., Piracicaba, SP, Brasil) em 100 ml de meio de cultura em caldo. A suspensão deve ficar em repouso por 10 minutos e depois ser dissolvida sob aquecimento brando antes de ser dispensada em tubos que são deixados semi-abertos durante a esterilização. A esterilização é feita por autoclavagem a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a autoclavagem.

2. Neutralizador do Hipoclorito de Sódio

0,6 % de tiosulfato de sódio

2.1 Preparo

Previamente à esterilização, deve-se adicionar 0,6 g de tiosulfato de sódio (Chemco Industrial e Comércio Ltda., Campinas, SP, Brasil) em 100 ml de meio de cultura em caldo. A suspensão deve ficar em repouso por 10 minutos e depois ser dissolvida sob aquecimento brando antes de ser dispensada em tubos que são deixados semi-abertos durante a esterilização. A esterilização é feita por autoclavagem a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a autoclavagem.

ANEXO IV- Kits de identificação microbiana

1. API 20 Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France)

1.1 Descrição

Api 20 Strep é um método padronizado que combina 20 testes bioquímicos que permitem a identificação, em grupos ou espécies, da maioria dos Streptococcus encontrados na microbiologia médica.

A fita do Api 20 Strep consiste em 20 microtubos contendo substratos desidratados para demonstração da atividade enzimática ou fermentação de açúcares.

Os testes enzimáticos são inoculados com uma suspensão densa de microrganismos, feita de uma cultura pura, que é utilizada para reidratar os substratos enzimáticos. Os produtos metabólicos finais produzidos durante o período de incubação são

revelados através de reações caracterizadas por alterações cromáticas que ocorrem espontaneamente ou por adição de reagentes.

Os testes de fermentação são inoculados com um meio enriquecido (API GP Medium) que reconstituem os substratos de açúcares. A fermentação de carboidratos é detectada por uma mudança no indicador de pH.

As reações são lidas de acordo com o quadro de leitura do manual do fabricante, e a identificação obtida no catálogo “Api 20 Strep Analytical Profile Index”.

1.2 Materiais

Um Kit contém:

- 25 fitas API 20 STREP
- 25 caixas para incubação
- 25 ampolas de API GP Medium
- 25 folhas de resposta
- 25 swabs

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

- Meio para suspensão: Suspension Medium, 2 ml
- Reagentes: NIN, VP 1, VP 2, ZYM A, ZYM B
- Padrão de McFarland
- Pipetas plásticas
- Óleo mineral
- Catálogo: Api Staph Analytical Profile Index
- Rack para ampolas
- Placas de ágar-sangue

Equipamentos laboratoriais requeridos:

- Estufa de incubação a 37 °C

- Refrigerador
- Bico de Bunsen
- Cabine ou jarra de anaerobiose

1.3 Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sangue por 18-24 horas a 37°C, em condições aeróbicas ou anaeróbicas, de acordo com as melhores condições de crescimento das amostras. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase negativos e anaeróbios facultativos.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio para suspensão “Suspension Medium” ou em água destilada estéril, para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4.

Cinco mL de água são colocados no recipiente de incubação para manter a umidade da atmosfera e a tira do Api Staph é colocada dentro da caixa.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do Api Strep com o inóculo bacteriano preparado até a metade da fita (até o teste da arginina-ADH). A seguir, abre uma ampola de “API GP Medium” e transfere o resto da suspensão para dentro dela, mistura bem, e preenche a segunda metade da fita (testes de ribose-RIB até glicogênio-GLYG). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37 °C por 4 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP 1 e VP 2 no teste do piruvato de sódio (VP); ZYM A e ZYM B no teste de PYRA até LAP, e NIN no teste HIP. Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas.

1.4 Resultados

Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Api Strep Analytical Profile Index”.

ANEXO V – Tabelas

Médias e medianas das unidades formadoras de colônias (UFC) dispostas de acordo com as técnicas e soluções químicas auxiliares em cada profundidade de dentina (broca 1, broca 2, broca 3 e 4) e na somatória de todas elas (Total).

Broca 1 (Mediana)

	Híbrida	FOP-UNICAMP	HERO 642
Clorexidina gel 2%	0	0	0
Clorexidina líquida 2%	40	0	0
NaOCl 5,25%	0	0	0
NaOCl 2,5%	0	0	0
NaOCl 0,5%	40	0	0
Controle	120	40	40

Broca 1 (Média)

	Híbrida	FOP-UNICAMP	HERO 642
Clorexidina gel 2%	3,84	0,59	2,66
Clorexidina líquida 2%	119,11	26,66	24,88
NaOCl 5,25%	0	0	0
NaOCl 2,5%	11,26	1,48	3,36
NaOCl 0,5%	34,07	22,52	35,26
Controle	120	40	40

Broca 2 (Mediana)

	Híbrida	FOP-UNICAMP	HERO 642
Clorexidina gel 2%	0	0	0
Clorexidina líquida 2%	40	0	0
NaOCl 5,25%	0	0	0
NaOCl 2,5%	0	0	0
NaOCl 0,5%	40	40	40
Controle	120	40	40

Broca 2 (Média)

	Híbrida	FOP-UNICAMP	HERO 642
Clorexidina gel 2%	1,18	0,296	0,59
Clorexidina líquida 2%	79,70	26,68	25,77
NaOCl 5,25%	0	0	0
NaOCl 2,5%	15,11	14,22	9,18
NaOCl 0,5%	52,64	38,81	43,55
Controle	213,036	123,85	164,44

Broca 3 (Mediana)

	Híbrida	FOP-UNICAMP	HERO 642
Clorexidina gel 2%	0	0	0
Clorexidina líquida 2%	0	0	0
NaOCl 5,25%	0	0	0
NaOCl 2,5%	40	0	0
NaOCl 0,5%	40	40	40
Controle	80	40	40

Broca 3 (Média)

	Híbrida	FOP-UNICAMP	HERO 642
Clorexidina gel 2%	7,40	6,52	5,33
Clorexidina líquida 2%	45,48	26,96	24,00
NaOCl 5,25%	0	0	0
NaOCl 2,5%	35,85	27,26	22,22
NaOCl 0,5%	85,92	31,11	68,14
Controle	247,11	63,40	154,37

Broca 4 (Mediana)

	Híbrida	FOP-UNICAMP	HERO 642
Clorexidina gel 2%	0	0	0
Clorexidina líquida 2%	40	0	40
NaOCl 5,25%	0	0	0

NaOCl 2,5%	40	40	0
NaOCl 0,5%	40	40	40
Controle	160	40	40

Broca 4 (Média)

	Híbrida	FOP-UNICAMP	HERO 642
Clorexidina gel 2%	30,22	32,88	19,55
Clorexidina líquida 2%	31,11	25,77	37,33
NaOCl 5,25%	0	0	0
NaOCl 2,5%	56,00	52,44	27,55
NaOCl 0,5%	37,33	55,11	51,55
Controle	338,66	97,76	152,88

Total (Mediana)

	Híbrida	FOP-UNICAMP	HERO 642
Clorexidina gel 2%	0	0	0
Clorexidina líquida 2%	40	0	0
NaOCl 5,25%	0	0	0
NaOCl 2,5%	0	00	0
NaOCl 0,5%	40	40	40
Controle	80	40	40

Total (Média)

	Híbrida	FOP-UNICAMP	HERO 642
Clorexidina gel 2%	6,75	5,51	4,53
Clorexidina líquida 2%	76,00	26,64	26,13
NaOCl 5,25%	0	0	0
NaOCl 2,5%	24,24	18,13	13,68
NaOCl 0,5%	55,52	33,24	49,24
Controle	252,08	84,24	193,60

ANEXO VI – Tabelas

Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) de acordo com as técnicas e soluções químicas auxiliares testadas.

Técnica manual /clorexidina gel				Técnica manual /NaOCl 5,25%				Técnica manual /Soro fisiológico			
Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***	Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***	Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***
1	$5,36 \times 10^5$	0	100%	31	$8,60 \times 10^5$	0	100%	61	$7,40 \times 10^5$	1440	99,81%
2	$6,32 \times 10^5$	0	100%	32	$4,20 \times 10^5$	0	100%	62	$9,96 \times 10^5$	6000	99,40%
3	$5,92 \times 10^5$	0	100%	33	$8,72 \times 10^5$	0	100%	63	$1,06 \times 10^6$	11360	98,93%
4	$4,20 \times 10^5$	0	100%	34	$1,76 \times 10^6$	0	100%	64	$5,44 \times 10^5$	4440	99,19%
5	$4,20 \times 10^5$	0	100%	35	$7,72 \times 10^5$	0	100%	65	$9,08 \times 10^5$	9040	99,01%
6	$6,32 \times 10^5$	0	100%	36	$1,84 \times 10^6$	0	100%	66	$1,46 \times 10^6$	12120	99,17%
7	$4,72 \times 10^5$	0	100%	37	$4,72 \times 10^5$	0	100%	67	$6,24 \times 10^5$	3920	99,38%
8	$1,00 \times 10^5$	0	100%	38	$9,96 \times 10^5$	0	100%	68	$1,09 \times 10^6$	2360	99,79%
9	$8,40 \times 10^5$	0	100%	39	$5,80 \times 10^5$	0	100%	69	$6,68 \times 10^5$	0	100%
10	$6,76 \times 10^5$	0	100%	40	$5,32 \times 10^5$	0	100%	70	$1,20 \times 10^6$	0	100%
181	$3,20 \times 10^4$	0	100%	186	$1,00 \times 10^4$	0	100%	191	$5,28 \times 10^5$	840	99,85%
182	$6,40 \times 10^4$	0	100%	187	$1,36 \times 10^5$	0	100%	192	$4,80 \times 10^4$	280	99,42%
183	$1,24 \times 10^5$	0	100%	188	$4,00 \times 10^3$	0	100%	193	$4,80 \times 10^5$	40	100%
184	$8,00 \times 10^4$	0	100%	189	$6,00 \times 10^4$	0	100%	194	$6,00 \times 10^4$	160	99,74%
185	$4,00 \times 10^4$	0	100%	190	$1,32 \times 10^6$	0	100%	195	$4,60 \times 10^5$	1000	99,79%
Mediana	$4,20 \times 10^5$	0	100%		$5,80 \times 10^5$	0	100%		$6,60 \times 10^5$	1440	99,74%
Média	$3,77 \times 10^5$	0	100%		$7,04 \times 10^5$	0	100%		$7,20 \times 10^5$	3533	99,56%

* Número absoluto de UFC na coleta inicial (antes do preparo químico-mecânico).

** Número absoluto de UFC na coleta final (após o preparo químico-mecânico).

*** Porcentagem de UFC final em relação à contagem inicial.

Técnica manual / NaOCl 2,5%				Técnica manual / clorexidina líquida 2%				Técnica manual / NaOCl 0,5%			
Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***	Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***	Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***
91	6,68 x10 ⁵	0	100%	121	5,12 x10 ⁵	0	100%	151	5,16 x10 ⁵	0	100%
92	6,60 x10 ⁵	0	100%	122	5,56 x10 ⁵	0	100%	152	4,56 x10 ⁵	80	99,98%
93	4,76 x10 ⁵	0	100%	123	5,44 x10 ⁵	0	100%	153	8,40 x10 ⁴	0	100%
94	3,80 x10 ⁵	0	100%	124	6,00 x10 ⁵	0	100%	154	1,16 x10 ⁵	0	100%
95	5,12 x10 ⁵	0	100%	125	7,04 x10 ⁵	0	100%	155	8,00 x10 ⁵	0	100%
96	6,76 x10 ⁵	0	100%	126	5,76 x10 ⁵	0	100%	156	3,88 x10 ⁵	0	100%
97	3,08 x10 ⁵	0	100%	127	5,48 x10 ⁵	0	100%	157	8,36 x10 ⁵	0	100%
98	5,40 x10 ⁵	0	100%	128	5,88 x10 ⁵	0	100%	158	7,32 x10 ⁵	0	100%
99	2,92 x10 ⁵	0	100%	129	1,04 x10 ⁶	0	100%	159	5,32 x10 ⁵	0	100%
100	5,08 x10 ⁵	0	100%	130	1,10 x10 ⁵	0	100%	160	2,60 x10 ⁵	0	100%
196	1,00 x10 ⁵	0	100%	201	3,20 x10 ⁴	0	100%	206	4,80 x10 ⁵	40	99,99%
197	1,12 x10 ⁵	0	100%	202	8,00 x10 ⁴	0	100%	207	2,32 x10 ⁵	0	100%
198	2,00 x10 ⁴	0	100%	203	4,80 x10 ⁵	0	100%	208	1,02 x10 ⁶	40	99,99%
199	8,80 x10 ⁴	0	100%	204	1,60 x10 ⁴	0	100%	209	3,32 x10 ⁵	0	100%
200	1,28 x10 ⁵	0	100%	205	1,00 x10 ⁵	0	100%	210	1,32 x10 ⁵	40	99,97%
Mediana	3,80 x10 ⁵	0	100%		5,44 x10 ⁵	0	100%		4,56 x10 ⁵	0	100%
Média	3,64 x10 ⁵	0	100%		4,32 x10 ⁵	0	100%		4,61 x10 ⁵	13,33	99,99%

* Número absoluto de UFC na coleta inicial (antes do preparo químico-mecânico).

** Número absoluto de UFC na coleta final (após o preparo químico-mecânico).

*** Porcentagem de UFC final em relação à contagem inicial.

Técnica Hero /clorexidina gel				Técnica Hero /NaOCl 5,25%				Técnica Hero /Soro fisiológico			
Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***	Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***	Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***
21	8,60 x10 ⁵	0	100%	51	4,48 x10 ⁵	0	100%	81	1,00 x10 ⁵	3200	96,80%
22	1,00 x10 ⁵	0	100%	52	3,92 x10 ⁵	0	100%	82	4,24 x10 ⁵	3600	99,16%
23	6,16 x10 ⁵	0	100%	53	5,00 x10 ⁵	0	100%	83	4,56 x10 ⁵	3480	99,24%
24	7,20 x10 ⁵	0	100%	54	5,44 x10 ⁵	0	100%	84	4,88 x10 ⁵	1800	99,64%
25	6,24 x10 ⁵	0	100%	55	1,30 x10 ⁶	0	100%	85	5,56 x10 ⁵	2280	99,59%
26	1,08 x10 ⁶	0	100%	56	1,20 x10 ⁶	0	100%	86	1,00 x10 ⁶	6720	99,33%
27	5,12 x10 ⁵	0	100%	57	1,40 x10 ⁶	0	100%	87	1,14 x10 ⁶	8400	99,27%
28	5,08 x10 ⁵	0	100%	58	1,30 x10 ⁶	0	100%	88	1,27 x10 ⁵	10640	99,17%
29	9,04 x10 ⁵	0	100%	59	6,96 x10 ⁵	0	100%	89	1,07 x10 ⁶	9640	99,10%
30	3,96 x10 ⁵	0	100%	60	8,36 x10 ⁵	0	100%	90	3,80 x10 ⁵	2560	99,33%
241	4,88 x10 ⁵	0	100%	246	5,72 x10 ⁵	0	100%	251	6,40 x10 ⁵	600	99,91%
242	1,12 x10 ⁵	0	100%	247	5,16 x10 ⁵	0	100%	252	1,80 x10 ⁵	200	99,99%
243	9,60 x10 ⁵	0	100%	248	2,64 x10 ⁵	0	100%	253	1,00 x10 ⁵	200	99,80%
244	4,80 x10 ⁵	0	100%	249	1,80 x10 ⁵	0	100%	254	1,56 x10 ⁵	120	99,93%
245	4,80 x10 ⁵	0	100%	250	5,20 x10 ⁵	0	100%	255	2,00 x10 ⁴	80	99,60%
Mediana	5,12 x10 ⁵	0	100%		5,44 x10 ⁵	0	100%		4,24 x10 ⁵	2560	99,33%
Média	5,89 x10 ⁵	0	100%		7,11 x10 ⁵	0	100%		4,55 x10 ⁵	3568	99,32%

* Número absoluto de UFC na coleta inicial (antes do preparo químico-mecânico).

** Número absoluto de UFC na coleta final (após o preparo químico-mecânico).

*** Porcentagem de UFC final em relação à contagem inicial.

Técnica HERO 642 / NaOCl 2,5%				Técnica HERO 642/clorexidina líquida 2%				Técnica HERO 642 / NaOCl 0,5%			
Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***	Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***	Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***
111	9,60 x10 ⁵	0	100%	141	3,04 x10 ⁵	0	100%	171	3,24 x10 ⁵	40	99,99%
112	5,60 x10 ⁵	40	99,99%	142	5,88 x10 ⁵	0	100%	172	2,64 x10 ⁵	40	99,98%
113	2,64 x10 ⁵	0	100%	143	6,12 x10 ⁵	0	100%	173	4,36 x10 ⁵	0	100%
114	2,60 x10 ⁵	40	99,98%	144	5,84 x10 ⁵	0	100%	174	4,76 x10 ⁵	0	100%
115	5,32 x10 ⁵	0	100%	145	6,96 x10 ⁵	0	100%	175	4,00 x10 ⁵	0	100%
116	6,16 x10 ⁵	0	100%	146	1,20 x10 ⁶	0	100%	176	7,40 x10 ⁵	0	100%
117	9,24 x10 ⁵	40	99,99%	147	2,64 x10 ⁵	0	100%	177	3,40 x10 ⁵	0	100%
118	4,84 x10 ⁵	40	99,99%	148	5,96 x10 ⁵	0	100%	178	6,16 x10 ⁵	40	99,99%
119	6,52 x10 ⁵	0	100%	149	7,16 x10 ⁵	0	100%	179	3,28 x10 ⁵	0	100%
120	5,84 x10 ⁵	0	100%	150	9,32 x10 ⁵	0	100%	180	6,96 x10 ⁵	40	99,99%
256	1,06 x10 ⁶	0	100%	261	1,76 x10 ⁵	0	100%	266	1,32 x10 ⁴	0	100%
257	1,08 x10 ⁵	0	100%	262	5,20 x10 ⁵	0	100%	267	7,60 x10 ⁴	40	99,95%
258	7,20 x10 ⁴	0	100%	263	5,08 x10 ⁵	0	100%	268	1,44 x10 ⁵	0	100%
259	6,00 x10 ⁴	0	100%	264	5,32 x10 ⁵	0	100%	269	4,48 x10 ⁵	80	99,83%
260	5,08 x10 ⁵	0	100%	265	6,36 x10 ⁵	0	100%	270	5,20 x10 ⁴	0	100%
Mediana	5,04 x10 ⁵	40	100%		5,88 x10 ⁵	0	100%		3,40 x10 ⁵	0	100%
Média	4,99 x10 ⁵	8,88	99,99%		5,90 x10 ⁵	0	100%		3,56 x10 ⁵	18,66	99,98%

* Número absoluto de UFC na coleta inicial (antes do preparo químico-mecânico).

** Número absoluto de UFC na coleta final (após o preparo químico-mecânico).

*** Porcentagem de UFC final em relação à contagem inicial.

Técnica FOP-UNICAMP /clorexidina gel				Técnica FOP-UNICAMP /NaOCI 5,25%				Técnica FOP-UNICAMP /Soro fisiológico			
Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***	Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***	Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***
11	5,88 x10 ⁵	0	100%	41	1,14 x10 ⁶	0	100%	71	5,16 x10 ⁵	2440	99,53%
12	1,12 x10 ⁵	0	100%	42	1,84 x10 ⁵	0	100%	72	9,32 x10 ⁵	6120	99,35%
13	3,08 x10 ⁵	0	100%	43	1,16 x10 ⁵	0	100%	73	3,92 x10 ⁵	3360	99,15%
14	1,52 x10 ⁵	0	100%	44	5,84 x10 ⁵	0	100%	74	4,60 x10 ⁵	3880	99,16%
15	6,00 x10 ⁴	0	100%	45	1,12 x10 ⁵	0	100%	75	1,64 x10 ⁵	440	99,74%
16	8,40 x10 ⁵	0	100%	46	1,19 x10 ⁶	0	100%	76	4,40 x10 ⁵	1920	99,57%
17	2,04 x10 ⁵	0	100%	47	5,92 x10 ⁵	0	100%	77	8,84 x10 ⁵	3600	99,60%
18	1,52 x10 ⁵	0	100%	48	5,12 x10 ⁵	0	100%	78	6,44 x10 ⁵	4720	99,27%
19	3,44 x10 ⁵	0	100%	49	5,00 x10 ⁵	0	100%	79	4,60 x10 ⁵	4000	99,14%
20	5,12 x10 ⁵	0	100%	50	4,56 x10 ⁵	0	100%	80	5,28 x10 ⁵	6920	98,69%
211	5,00 x10 ⁵	0	100%	216	1,12 x10 ⁵	0	100%	221	4,40 x10 ⁴	80	99,82%
212	5,00 x10 ⁵	0	100%	217	4,88 x10 ⁵	0	100%	222	1,12 x10 ⁵	80	99,93%
213	5,28 x10 ⁵	0	100%	218	6,16 x10 ⁵	0	100%	223	3,00 x10 ⁵	160	99,95%
214	5,68 x10 ⁵	0	100%	219	5,68 x10 ⁵	0	100%	224	4,88 x10 ⁵	80	99,99%
215	1,32 x10 ⁵	0	100%	220	5,32 x10 ⁵	0	100%	225	3,40 x10 ⁵	40	99,99%
Mediana	3,44 x10 ⁵	0	100%		5,12 x10 ⁵	0	100%		4,60 x10 ⁵	2440	99,57%
Média	3,66 x10 ⁵	0	100%		5,13 x10 ⁵	0	100%		4,46 x10 ⁵	2394	99,52%

* Número absoluto de UFC na coleta inicial (antes do preparo químico-mecânico).

** Número absoluto de UFC na coleta final (após o preparo químico-mecânico).

*** Porcentagem de UFC final em relação à contagem inicial.

Técnica FOP-UNICAMP / NaOCl 2,5%				Técnica FOP-UNICAMP/ clorexidina líquida 2%				Técnica FOP-UNICAMP/ NaOCl 0,5%			
Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***	Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***	Dentes	Coleta inicial*	Coleta final**	Redução***
101	5,44 x10 ⁵	0	100%	131	8,88 x10 ⁵	0	100%	161	1,10 x10 ⁵	0	100%
102	5,72 x10 ⁵	0	100%	132	9,32 x10 ⁵	0	100%	162	6,80 x10 ⁵	40	99,99%
103	7,56 x10 ⁵	0	100%	133	7,28 x10 ⁵	0	100%	163	5,64 x10 ⁵	0	100%
104	8,24 x10 ⁵	0	100%	134	6,08 x10 ⁵	0	100%	164	7,08 x10 ⁵	0	100%
105	4,28 x10 ⁵	0	100%	135	9,32 x10 ⁵	0	100%	165	5,80 x10 ⁵	0	100%
106	5,00 x10 ⁵	0	100%	136	9,64 x10 ⁵	0	100%	166	5,80 x10 ⁵	40	100%
107	5,28 x10 ⁵	0	100%	137	6,44 x10 ⁵	0	100%	167	5,12 x10 ⁵	0	100%
108	2,92 x10 ⁵	0	100%	138	5,12 x10 ⁵	0	100%	168	6,60 x10 ⁵	0	99,99%
109	7,88 x10 ⁵	0	100%	139	5,72 x10 ⁵	0	100%	169	6,32 x10 ⁵	0	100%
110	6,64 x10 ⁵	0	100%	140	6,36 x10 ⁵	0	100%	170	5,88 x10 ⁵	0	99,99%
226	1,20 x10 ⁵	0	100%	231	4,00 x10 ⁵	0	100%	236	3,40 x10 ⁵	0	100%
227	1,12 x10 ⁵	0	100%	232	5,60 x10 ⁵	0	100%	237	1,52 x10 ⁵	40	99,95%
228	4,00 x10 ⁵	0	100%	233	5,52 x10 ⁵	0	100%	238	4,00 x10 ⁵	40	100%
229	2,00 x10 ⁵	0	100%	234	5,32 x10 ⁵	0	100%	239	2,32 x10 ⁵	0	99,83%
230	4,60 x10 ⁵	0	100%	235	5,68 x10 ⁵	0	100%	240	5,92 x10 ⁵	40	100%
Mediana	5,00 x10 ⁵	0	100%		6,08 x10 ⁵	0	100%		5,80 x10 ⁵	0	100%
Média	4,80 x10 ⁵	0	100%		6,68 x10 ⁵	0	100%		4,88 x10 ⁵	13,33	99,98%

* Número absoluto de UFC na coleta inicial (antes do preparo químico-mecânico).

** Número absoluto de UFC na coleta final (após o preparo químico-mecânico).

*** Porcentagem de UFC final em relação à contagem inicial.