

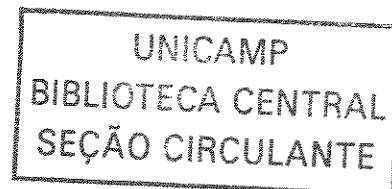
MORGANA ELI VIANNA

**Atividade antimicrobiana de alguns medicamentos
utilizados como irrigantes e medicações intracanais**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Clínica Odontológica – Área de
Endodontia**

PIRACICABA

2002



MORGANA ELI VIANNA

**Atividade antimicrobiana de alguns medicamentos
utilizados como irrigantes e medicações intracanaais**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG. 31 / 3 / 03
Assinatura do Orientador

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Clínica Odontológica – Área de
Endodontia**

Orientadora: Profª Drª Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

PIRACICABA

2002

iii

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	PC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	V655a
V	EX
TOMBO SCI	53414
PROC.	124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	RS 11,00
DATA	29/04/03
Nº CPD	

CM001B2580-1

BIBID. 290704

Ficha Catalográfica

V655a

Vianna, Morgana Eli.

Atividade antimicrobiana de alguns medicamentos utilizados como irrigantes e medicações intracanaais. / Morgana Eli Vianna. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002.
xxvi, 293p. : il.

Orientadora : Profª Drª Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.

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

1. Endodontia. 2. Clorexidina. 3. Microorganismos. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

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



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 13 de Dezembro de 2002, considerou a candidata MORGANA ELI VIANNA aprovada.

1. Profa. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

2. Profa. Dra. IZABEL CRISTINA FRÖNER

3. Prof. Dr. CAIO CEZAR RANDI FERRAZ

8895710/000

Dedico este trabalho a ...

... minha mãe, MARY ELY POSSATTI VIANNA, pelo amor, exemplo de honestidade e luta.

...meu esposo, REGINALDO FERREIRA, pelo amor, companheirismo, compreensão, paciência e apoio financeiro. As alegrias de hoje são também as suas, pois seus estímulos foram às armas desta conquista, juntamente com você pude percorrer este caminho, vencer cada etapa e sentir-me segura.

...a todos os meus familiares, em especial a MÔNICA, MÁRIO, MARIANA, MURILO, ZÉ PAES e NEYDE por todos os momentos já vividos.

Agradeço ...

...a Deus

“Senhor, se hoje percorro este caminho é porque vós trilhastes, deste-me sabedoria para aprender a discernir, alegria e entusiasmo para transmitir aos que estiveram ao meu lado, coragem para a luta e força para vencer mais esta etapa em minha vida. Peço sua benção para a nova jornada que se inicia.”

Agradeço ...

... a minha Orientadora, Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, pelo exemplo de competência e dedicação profissional. A minha homenagem àquela que dedica sua vida ao ensino, pois dela é o mérito de moldar as vocações e incentivar o raciocínio, transformando nossos ideais em realizações.

Agradeço ...

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho, de quem recebi apoio necessário para realização deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, instituição onde me graduei e me especializei, a qual sempre levarei em minhas memórias, agradeço aos professores, funcionários e amigos.

À Profa Dra. Izabel Cristina Fröner, a qual foi minha orientadora durante a Graduação e meu curso de Residência em Endodontia na FORP-USP, pelos ensinamentos transmitidos e amizade.

À Profa Dra. Izabel Yoko Ito, a qual me orientou no Laboratório de Microbiologia durante a graduação e meu curso de Residência em Endodontia, despertando em mim o interesse pela pesquisa.

Ao Prof. Dr Lourenço Correr Sobrinho, coordenador geral do curso de pós-graduação da FOP/UNICAMP.

À Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, na qualidade de coordenadora do curso pós-graduação de Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho, chefe Do Departamento de Odontologia Resturadora e responsável pela área de Endodontia da FOP/UNICAMP, pelo exemplo de competência.

Aos Professores Doutores Alexandre Augusto Zaia, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Caio Cezar Randi Ferraz, Fabrício Batista Teixeira, Francisco José de Souza Filho e Luis Valdrighi, professores da área de Endodontia da FOP/UNICAMP, pelos ensinamentos transmitidos e atenção dispensada sempre que solicitada.

Aos meus estimados amigos do curso de Mestrado em Clínica Odontológica, Douglas G. N. Cortez, Fábio R. Dametto, Daniel P. de Oliveira, Helena R. C. Rabbang, Nilton V. Gomes, Iadasa de Quadros e em especial Rogério C. Jacinto pela amizade e companheirismo.

Aos meus amigos alunos e ex-alunos do curso de Pós Graduação em Clínica Odontológica área Endodontia: Adelmo M. de Souza Filho, Alexandre R. Heck, Gerson H. Yoshinari, Cicero R. Gadê-Neto, Éricka T. Pinheiro, Eduardo D. Gurgel Filho, Egas M. Aragão, Eneida B. S. de Araújo, Eudes Gondim Jr., Ezilmara L. R. Souza, Flaviana Bombarda A. Ferreira, João Eduardo G. Filho, Júlio César B. dos Santos, Ronaldo R. Rodrigue, Soraia C. Souza e Tetis Serejo Saiua.

A todos alunos de iniciação científica e estagiários: Débora C. Almeida, Fernanda G. C. Sinhoretti, Frederico M. L. dos Santos, Gustavo B. Cordeiro, Maraisa G. Delboni, Patrick

Baltieri, e em especial a Neylla Teixeira Senna, Vanessa B. Berber, Danila M. Zilio pela dedicação e companheirismo.

Aos funcionários da disciplina de Endodontia da FOP/UNICAMP Denize L. de Pinho, Maria Aparecida Buscariol, Rubens Marques Payão e Adailton do Santos Lima, pela convivência e auxílio em meus trabalhos diários.

Patsy e a Vicky ,minhas cachorrinhas, que me esperaram com paciência todos os dias, acolhendo me alegremente após cada dia de trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Homenagem ao meu pai Antonio e meu irmão Marco que já partiram desta vida...

*Hoje vocês não estão aqui, mas estarão com certeza a cada instante em meus pensamentos,
sentindo comigo as minhas alegrias.*

Terminei mais uma batalha, não a primeira, nem a última, apenas mais uma.

SUMÁRIO

	Lista de Tabelas	01
	Lista de Abreviaturas	07
1.	Resumo	17
2.	Abstract	19
3.	Introdução	21
4.	Proposição	29
5.	Materiais e Métodos	31
6.	Capítulos	39
6.1.	Capítulo 1: <i>In vitro</i> antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of <i>Enterococcus faecalis</i> .	49
6.2.	Capítulo 2: Antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite against endodontic pathogens: an <i>in vitro</i> evaluation.	69
6.3	Capítulo 3: <i>In vitro</i> antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms.	91
6.4.	Capítulo 4: <i>In vitro</i> evaluation of the susceptibility of some endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with several vehicles.	113

6.5.	Capítulo 5: <i>In vitro</i> evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine gel, calcium hydroxide paste and both intracanal medicaments combined.	137
7.	Discussão	163
8.	Conclusão	185
9.	Referências Bibliográficas	187
10.	Apêndice	207
10.1.	Meios de cultura	209
10.1.1	Fastidious Anaerobe Agar (FAA)	209
10.1.2.	Fastidious Anaerobe Broth (FAB)	211
10.1.3.	Brain heart Infusion Agar (BHI)	213
10.1.4.	Brain heart Infusion Broth (BHI)	215
10.1.5.	Mueller-Hinton Agar (MHA)	217
10.2.	Soluções neutralizadoras da ação residual	219
10.3.	Kits de Identificação Microbiana	221
10.3.1.	API 20 Strep	221
10.3.2.	API Staph	225
10.3.3.	API 20 C AUX	229
10.3.4.	Rapid ID 32 A	233
10.3.5.	Rapid ANA II	237
10.4.	Cabine de anaerobiose	241
10.5.	Análise estatística	243

10.5.1. Análise estatística do Capítulo 1	243
10.5.2. Análise estatística do Capítulo 2	245
10.5.3. Análise estatística do Capítulo 3	249
10.5.4. Análise estatística do Capítulo 4	251
10.5.5. Análise estatística do Capítulo 5	253
10.5.6. Laudo Técnico das substâncias testadas	257
10.5.7. Artigos e Resumos Publicados	267

I. LISTA DE TABELAS

6.1.1.	Contact time required by each tested irrigant to produce negative cultures (i.e. 100% inhibition growth) of <i>E. faecalis</i> .	56
6.2.1	Contact time required for chlorhexidine gluconate in different concentrations, in liquid and gel formulations to produce negative cultures (ie: 100% inhibition of growth) against all tested microorganisms	79
6.2.2	Contact time required for sodium hypochlorite in different concentration s to produce negative culture s (ie: 100% inhibition of growth) again st all te sted microorganisms	81
6.3.1.	Mean area of the zones of microbial growth inhibition (in mm) provided by calcium hydroxide associated with several vehicles (zero means inhibition by direct contact)	101
6.3.2.	Mean area of the zones of microbial growth inhibition (in mm) provided by the substances used to manipulate the calcium hydroxide pastes.	102
6.4.1.	The contact time required for several calcium hydroxide pastes combined with several vehicles to produce negative cultures (i.e.: 100% inhibition growth) against the tested microorganisms	125
6.4.2.	The contact time required for the control groups to produce negative cultures (i.e.: 100% inhibition growth) against the tested microorganisms	127

6.5.1.	Means of microbial inhibition of growth (in mm) produced by 2.0% chlorhexidine gel, calcium hydroxide paste and both as intracanal medicament combined against all microorganisms tested.	149
6.5.2.	Means of contact time required by 2.0% chlorhexidine gel, calcium hydroxide paste and both intracanal medicaments combined to produce 100% of microbial inhibition growth.	151
10.1.1.7.	Fórmula do Fastidious Anaerobe Agar (FAA)	210
10.1.2.7.	Fórmula do Fastidious Anaerobe Broth (FAB)	212
10.1.3.7.	Fórmula do Brain heart Infusion Agar (BHI agar)	214
10.1.4.7.	Fórmula do Brain heart Infusion Broth (BHI caldo)	216
10.1.5.1.	Fórmula do Mueller Hinton Agar	218
10.5.1.1.	Transformação dos valores (tempos) das clorexidinas em segundos para realização dos testes estatísticos (expressos na tabela pela média de cada sextuplicata)	243
10.5.1.1.1	Teste de aderência à curva normal: Valores originais (Programa GMC, Ribeirão Preto, SP)	244
10.5.2.1.	Tabela 1. Transformação dos valores (tempos) das clorexidinas em segundos para realização dos testes estatísticos (expressos na tabela pela média de cada sextuplicata)	245
10.5.2.1.1.	Teste de aderência à curva normal: Valores originais (Programa GMC, Ribeirão Preto, SP)	246

10.5.2.2.	Análise estatística: hipoclorito de sódio.	247
	Tabela 1: Transformação dos valores (tempos) das dos hipocloritos de sódio em segundos para realização dos testes estatísticos (expressos na tabela pela média de cada sextuplicata)	
10.5.2.2.1.	Teste de aderência à curva normal: Valores originais (Programa GMC, Ribeirão Preto, SP)	248
10.5.3.1.	Média das zonas de inibição do crescimento microbiano (em mm) promovidas pelo hidróxido de cálcio associado a diversos veículos (Valor= 0, inibição por contato direto).	249
10.5.3.1.1.	Teste de aderência à curva normal: Valores originais (Programa GMC, Ribeirão Preto, SP)	250
10.5.3.1.3.	Análise estatística das médias das áreas de inibição de crescimento microbiano (em mm) promovidas pelas pastas de hidróxido de cálcio associadas a diversos veículos.	251
10.5.4.2.1.	Transformação dos valores (tempos) das pastas de hidróxido de cálcio em segundos para realização dos testes estatísticos (expressos na tabela pela média de cada sextuplicata)	253
10.5.4.4.1.1	Teste de aderência à curva normal: Valores originais (Programa GMC, Ribeirão Preto, SP)	254
10.5.5.5.1.1	Médias de inibição do crescimento microbiano (em mm) produzidas pela clorexidina gel 2.0%, pasta de hidróxido de cálcio e associação de ambos utilizados como medicação intracanal contra os microrganismos testados.	

10.5.5.5.1.1	Teste de aderência à curva normal: Valores originais	256
10.5.5.5.2.	Médias dos tempos de contato (em segundos) necessários (Tabela 1) para a clorexidina gel 2%, pasta de hidróxido de cálcio e associação de ambos, utilizados como medicação intracanal, contra os microrganismos testados (expressos na tabela pela média de cada sextuplicata)	257
10.5.5.5.2.1	Teste de aderência à curva normal: Valores originais	258

II. LISTA DE FIGURAS

- Figure 4.1.1. Etapas do método do contato direto.
- Figure 4.2.1. Etapas do método de difusão em ágar.
- Figure 6.3.1. Average values of growth inhibition zones (in mm) by different formulations of Ca(OH)_2 paste against all microorganisms tested.
- Figure 6.3.2. Average values of growth inhibition zones (in mm) by Ca(OH)_2 paste in combination with several vehicles against all microorganisms tested.
- 10.5.1.1.1 Histograma & Curva Normal
(Fig 1) Capítulo 1: clorexidinas e hipocloritos
- 10.5.2.1.1. Histograma & Curva Normal
Capítulo 2: clorexidinas
- 10.5.2.2.1. Histograma & Curva Normal
Capítulo 2: hipocloritos
- 10.5.3.1.1. Histograma & Curva Normal
Capítulo 3: pastas de hidróxido de cálcio
- 10.5.4.4.1.1. Histograma & Curva Normal
Capítulo 4: pastas de hidróxido de cálcio
- 10.5.5.5.1.1.1. Histograma & Curva Normal
Capítulo 5: medicamentos intracanaais (halo de inibição)
- 10.5.5.5.2.1 Histograma & Curva Normal
Capítulo 5: medicamentos intracanaais (contato direto)

III. LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	= <i>American Type Culture Collection</i>
Atm	= atmosfera
BHI	= <i>Brain Heart Infusion Broth</i>
BHIA	= <i>Brain Heart Infusion Agar</i>
°C	= graus Celcius
Ca ⁺	= íon cálcio
Ca(OH) ₂	= hidróxido de cálcio
cfu	= <i>formed unitis of colonies</i>
CMCP	= Paracloorphenol canfored
CO ₂	= gás carbônico
D.O.	= densidade ótica
&	= e
EDTA	= Ácido Etileno Diamino-Tetracético
<i>et al.</i>	= e outros (abreviatura de "et alli ")
FAA	= <i>Fastidious Anaerobe Agar</i>
FAB	= <i>Fastidious Anaerobe Broth</i>
Fig.	= figura
h	= horas
H ⁺	= íons hidrogênio
H ₂ O	= água
H ₂	= gás hidrogênio
HOCl	= ácido hipocloroso

LPS	= lipopolissacarídeos
min	= minutos
MHA	= <i>Mueller-Hinton Agar</i>
mL	= mililitros
mm	= milímetros
N ₂	= gás nitrogênio
Na ⁺	= íons sódio
NaOCl	= hipoclorito de sódio
NaOH	= hidróxido de sódio
Nm	= nanômetro
OCI ⁻	= monóxido de cloro
OH ⁻	= íon hidroxila
pH	= potencial hidrogeniônico
PMC	= paramonoclorofenol
PMCC	= paramonoclorofenol canforado
s	= segundos
SP	= São Paulo
sp	= espécie
spp	= espécies
ssp	= subespécie
Tab	= tabela
TTC	= cloreto de trifeniltetrazólico
μL	= microlitro

ufc = unidades formadoras de colônias

% = porcentagem

2. RESUMO

Este trabalho teve como proposta avaliar *in vitro* a propriedade antimicrobiana de várias substâncias químicas. As soluções irrigadoras intracanaais testadas foram: a) hipoclorito de sódio e b) clorexidina utilizados como irrigantes intracanaais. Os medicamentos intracanaais testados foram: c) clorexidina gel 2%, d) hidróxido de cálcio e e) associação da clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio. A atividade antimicrobiana das substâncias foi avaliada frente a microrganismos aeróbios, anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos. Para realização deste trabalho foram empregadas duas metodologias: Método de Difusão em Ágar e Método do Contato Direto. Pôde-se verificar que dentre os irrigantes testados, NaOCl a 5,25%, clorexidina gel e líquida 2% e clorexidina líquida 1% necessitaram de 1 minuto ou menos para eliminar os microrganismos testados. As pastas de Ca(OH)_2 com paramonoclorofenol canforado apresentaram os maiores halos de inibição e necessitaram de menores tempos para eliminar os microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos. A associação da clorexidina gel 2% com Ca(OH)_2 apresentou menor atividade que a clorexidina gel 2% e maior atividade que a pasta de Ca(OH)_2 com água destilada. Concluímos que todos irrigantes e medicamentos intracanaais testados tiveram atividade antimicrobiana, sendo que esta atividade variou de acordo com as formulações empregadas.

3. ABSTRACT

The aim of the present work was to evaluate *in vitro* the antimicrobial property of various medicaments. The intracanal irrigating solutions testes were a) sodium hypochlorite and b) chlorhexidine. The intracanal medicaments were c) 2% chlorhexidine gel, d) calcium hydroxide combined with several vehicles, and e) calcium hydroxide combined with 2% chlorhexidine gel. The antimicrobial activity of the substances was evaluated against aerobic, facultative anaerobic and strict anaerobic microorganisms. For the accomplishment of this work Agar Diffusion Method and Broth Dilution Test methodologies were used. It could be verified that amongst the tested irrigants the 5.25% NaOCl, and the 2% chlorhexidine needed 1 min or less to eliminate the tested microorganisms. The Ca(OH)_2 pastes with CMCP presented the largest inhibitions growth zones and needed a shorter length of time to eliminate the aerobic and facultative anaerobic microorganisms. The 2% chlorhexidine gel combined with Ca(OH)_2 presented intermediate antimicrobial activity, being smaller than 2% chlorhexidine gel and larger than the Ca(OH)_2 with sterile water. We concluded that all tested irrigants and intracanal medicaments showed antimicrobial activity, which varied in accordance with their formulations.

4. INTRODUÇÃO

Atualmente existem mais de 500 espécies bacterianas reconhecidas como habitantes naturais da cavidade oral (Jung *et al.*, 2000). Entretanto, a microbiota dos canais radiculares e estruturas relacionadas constitui um grupo restrito de aproximadamente 150 espécies bacterianas identificadas. Canais radiculares infectados abrigam tipicamente uma microbiota mista, geralmente em combinações de 4 a 6 espécies por canal, com grande prevalência de anaeróbios estritos (Sundqvist, 1992; Gomes *et al.*, 1996). As bactérias anaeróbias facultativas são mais resistentes às substâncias auxiliares utilizadas no preparo químico- mecânico e medicamentos intracanais que os anaeróbios estritos, podendo persistir mais freqüentemente em canais radiculares após a terapia endodôntica (Molander *et al.*, 1998).

Com intuito de remover as bactérias, subprodutos bacterianos e substratos orgânicos, há uma incessante busca de técnicas de instrumentação e de substâncias auxiliares à terapia endodôntica, pois os microrganismos no interior dos canais radiculares não podem ser alcançados pelas células de defesa do hospedeiro (Takahashi, 1998).

Para limpar todo o complexo sistema de canais radiculares, faz-se necessário o uso de soluções químicas com ação antimicrobiana e capacidade de dissolução (Byström & Sundqvist, 1985) ou a remoção (Ferraz *et al.*, 2001 c) de tecido orgânico. A biomecânica dos canais radiculares constitui-se de uma fase mecânica e de uma fase química aplicadas simultaneamente. A ação física é

devido a movimentação hidráulica (irrigação e aspiração), que remove do interior dos canais radiculares detritos que estejam dissolvidos ou em suspensão. A ação química é devido a atividade antimicrobiana e a propriedade de dissolução de tecidos orgânicos e inorgânicos (Barbin, 1999).

Ao longo da história da Endodontia, inúmeras soluções químicas auxiliares da instrumentação têm sido defendidas e empregadas: a) compostos halogenados: soluções de hipoclorito de sódio; b) tensoativos aniônicos: lauril sulfato de sódio e o lauril dietileno glicol éter sulfato de sódio; c) tensoativos catiônicos: cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônio), cloreto de cetiltrimetilamônio, biosept (cloreto de cetilpiridino) e zefirol (cloreto de benzalcônio), d) tensoativos neutros: tween 80; e) quelantes: EDTA e salvizol; f) ácidos: ácido cítrico; g) peróxidos: peróxido de hidrogênio e peróxido de uréia; h) associações e/ou misturas: detergente aniônico + nitrofurazona (tergentol/furacin), detergente aniônico + hidróxido de cálcio (irrigocal e tergidrox), detergente aniônico + EDTA, hipoclorito de sódio alternado com peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio + ácido cítrico, detergente catiônico + EDTA = EDTA-C, peróxido de uréia + EDTA + carbowax (RC-prep) neutralizado com hipoclorito de sódio a 5%, e peróxido de uréia + tween 80 + carbowax neutralizado com solução de Dakin. Além dessas soluções podem ser utilizadas: a água destilada, soro fisiológico e água com hidróxido de cálcio (0,14%) e clorexidina (Pécora *et al.*, 1999). Muitas delas não são mais utilizadas, ficando apenas registradas na literatura especializada.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) tem seu uso consagrado a mais de 70 anos, mostrando-se efetivo como agente desinfetante (Bloomfield & Miles, 1979). A

solução de hipoclorito de sódio, devido ao seu equilíbrio dinâmico pode estar demonstrada pela seguinte reação química:



O NaOCl (hipoclorito de sódio, sal) reage com molécula de água (H₂O) formando NaOH (hidróxido de sódio, base forte) e HOCl (ácido hipocloroso, ácido fraco). O hidróxido de sódio atua como solvente orgânico e de gordura, formando sabão (reação de saponificação). O ácido hipocloroso possui efeito antimicrobiano por liberar cloro nascente, que se liga ao grupamento NH dos aminoácidos, formando as cloraminas, interferindo no metabolismo celular. Além disso, inibe a função enzimática bacteriana, a partir de uma oxidação irreversível dos grupos SH (sulfidril) de enzimas bacterianas essenciais (Estrela, 2000).

A clorexidina tem sido utilizada como um agente antimicrobiano efetivo, sendo utilizado como irrigante ou medicação intracanal (Kennedy *et al.*, 1967; Delany *et al.*, 1982; Komorowski *et al.*, 2000; Lenet *et al.*, 2000). Tem sido avaliada devido às propriedades de inibir o crescimento de bactérias comumente encontradas em infecções endodônticas (Cervone *et al.*, 1990), por apresentar efeito antimicrobiano residual (substantividade) (White *et al.*, 1997), possuir baixa citotoxicidade (Ohara *et al.*, 1993; Jeansonne & White, 1994, Tanomaru *et al.* 2002). Pode ser empregada na forma líquida ou gel. Na forma gel, quando o veículo é o natrosol (base de hidroxietilcelulose), este é hidrossolúvel. A forma gel pode impedir a formação da camada de *smear layer* durante a instrumentação dos canais radiculares (Ferraz *et al.*, 2001 a, b).

A clorexidina constitui-se de molécula catiônica, que ao se unir a compostos aniônicos, como sulfatos livres, radicais fosfatos e carboxílicos da película e glicoproteínas salivares, promove redução na adsorção de proteínas à superfície dentária que é requerida para a formação da película adquirida. Em virtude de sua natureza altamente catiônica, apresenta elevada afinidade pela parede celular bacteriana, alterando as estruturas da superfície dessa parede. A membrana citoplasmática fica destruída, havendo formação de vesículas e precipitação do citoplasma, com alteração no equilíbrio osmótico celular (Rolla & Melsen, 1975; Lindhe, 1995). O aumento da concentração da droga diminui a atividade intracelular dos microrganismos patogênicos, levando à liberação e/ou desnaturação das enzimas proteolíticas que constituem a membrana celular microbiana (Helgeland *et al.*, 1971).

O Preparo-Químico-Mecânico (PQM) reduz grande parte da microbiota dos canais radiculares infectados. Entretanto, se os microrganismos permanecerem em número suficiente e em ambiente favorável, poderão multiplicar-se e restabelecer a contaminação clínica do espaço pulpar (Byström *et al.*, 1985; Ando & Hoshino, 1990). Desta forma, entre sessões de atendimento, faz-se conveniente preencher o canal radicular com uma medicação intracanal adequada que apresente propriedades antimicrobianas e que funcione como barreira física (Chong & Pitt Ford, 1992; Estrela *et al.*, 2001), além da presença de efetivo selamento coronário (Friedman *et al.*, 1986).

Alguns autores como Byström *et al.* (1985) e Safavi *et al.* (1990) acreditam que o uso de uma medicação intracanal aumenta o efeito antimicrobiano conseguido pelo PQM. Além disso, a medicação intracanal possui como objetivos atuar como barreira físico-química contra infecção e ou reinfecção por bactérias da saliva, reduzir a inflamação perirradicular, solubilizar matéria orgânica, neutralizar produtos tóxicos, controlar a exsudação persistente, controlar a reabsorção dentária externa inflamatória e estimular a reparação por tecido mineralizado (Siqueira & Lopes, 1999).

Várias substâncias têm sido utilizadas como medicação intracanal: a) derivados fenólicos como o eugenol, paramonoclorofenol (PMC), PMC canforado (PMCC), cresatina, cresol, cresoto e timol; b) aldeídos representados pelo formaldeído e glutaraldeído; c) halóides representados pelo iodo e cloro (hipocloritos); d) bases e hidróxidos representada pelo hidróxido de cálcio; e) corticóides como a hidrocortisona, a prednisolona e a dexametasona; f) antibióticos sozinhos ou combinados com outras drogas; g) combinações como as associações de corticosteróides com antibióticos, PMC-furacin, hidróxido de cálcio-PMC e tricresol-formol (Siqueira & Lopes, 1999); e h) clorexidina (Delany *et al.*, 1982). Como no caso dos irrigantes muitas dessas substâncias estão em desuso.

O hidróxido de cálcio passou a ser empregado como medicação intracanal em dentes com necrose pulpar com os trabalhos de Heithersay (1975). Foi Byström *et al.* (1985) que incrementaram seu uso após demonstrar que essa substância apresentava melhores resultados que o fenol e o PMCC.

As propriedades do hidróxido de cálcio derivam de sua dissociação iônica em íons cálcio e íons hidroxila, sendo que as ações destes íons promovem propriedades biológicas sobre os tecidos, e antimicrobianas, sobre as bactérias. Os íons Ca^{+} são responsáveis pelo efeito antiinflamatório diminuindo a permeabilidade dos capilares, agem também como barreira física através dos túbulos. Os íons OH^{-} são responsáveis pela elevação do pH do meio, o qual influencia o transporte químico das proteínas da membrana. Várias proteínas presentes na superfície da membrana celular são especializadas no transporte de ácidos e bases pela membrana. A regulação de pH celular é fundamental, uma vez que mudanças de pH podem desregular e afetar o metabolismo celular, atuando na ionização de grupos de proteínas pela desconfiguração e alteração das suas atividades. O metabolismo celular depende do pH para a atividade enzimática, altera o substrato e afeta o crescimento e a proliferação celular (Estrela *et al.* 1999). Outra forma de ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio foi demonstrada por Safavi & Nichols (1993, 1994) e Barthel *et al.* (1996). Safavi & Nichols (1993), estudando o efeito do hidróxido de cálcio sobre o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, demonstraram que os íons hidroxila podem hidrolisar o LPS presente na parede celular das bactérias, degradando o lipídio A e neutralizando seu efeito residual após a lise celular. Estrela *et al.* (1994) reportaram que o hidróxido de cálcio inibe enzimas bacterianas, função esta que pode se reverter caso o pH retorne a níveis ácidos. Os íons hidroxila ativam enzimas teciduais como a fosfatase alcalina, o que pode iniciar ou favorecer a mineralização (Mitchell & Shankwalker, 1958; Tronstad *et al.*, 1981, Tronstad,

1991). Acredita-se que os íons cálcio são necessários para a atividade do sistema complemento imunológico, quando em abundância no tecido, poderiam auxiliar essa reação, ativando uma ATPase cálcio-dependente, que é associada à formação de tecido mineralizado (Tronstad *et al.* , 1981).

A pasta de hidróxido de cálcio tem sido preparada com vários veículos: solução aquosa, metilcelulose, heximetilcelulose, solução fisiológica, solução anestésica, glicerina, polietilenoglicol, propilenoglicol, óleo de oliva. (Berk, 1950; Laws, 1962; Maisto & Capurro, 1964; Holland *et al.*, 1978, 1983; Stamos *et al.*, 1985; Lopes *et al.*, 1986; Bramante *et al.*, 1986; Silva *et al.*, 1991; Fava, 1993; Leonardo *et al.*, 1993; Estrela *et al.*, 1995; Lopes *et al.* 1996; Estrela & Pesce, 1996, 1997). Além dos veículos, substâncias adicionais têm sido inseridas no intuito de melhorar suas propriedades físico-químicas, como por exemplo adição de iodofórmio para aumentar a radiopacidade, PMMC para acrescentar atividade antimicrobiana. A clorexidina em associação com o hidróxido de cálcio pode ser promissora com relação à atividade antimicrobiana (Gomes *et al.* 1999), visto que existem microrganismos que conseguem sobreviver a pH elevados (9-11,5), como por exemplo o *Enterococcus faecalis*.

O tempo necessário para que os irrigantes e a pasta de hidróxido de cálcio atuem sobre microrganismos considerados resistentes a agentes antimicrobianos, tem sido questionado e ainda não está bem definido. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de medicamentos utilizados como irrigantes endodônticos e medicação intracanal. Para isso foram realizados cinco experimentos distintos empregando duas metodologias: o teste de difusão em

ágar e o teste de diluição em caldo (teste do contato direto). Dos cinco trabalhos apresentados dois foram publicados, sendo o capítulo 1: *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis* (*International Endodontic Journal*, 2001;34: 424-8) e o capítulo 3: *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms (*Brazilian Dental Journal*, 2002; 13:155-61). Os outros capítulos foram enviados para periódicos internacionais, sendo que o Capítulo 2 foi enviado para o periódico *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. Os Capítulos 4 e 5 foram enviados para o *International Endodontic Journal*. Além dessas publicações todos os trabalhos foram apresentados na Reunião Anual de Pesquisa Odontológica (SBpQO) sob forma de Painel e os resumos estão publicados em português na revista da SbpQO e em inglês no *Journal of Dental Research*.

Pequenas diferenças podem ser encontradas entre os artigos já publicados e os capítulos desta Dissertação, pois as sugestões realizadas por parte dos avaliadores dos Periódicos e da Banca do Exame de Qualificação foram acatadas ou esclarecidas com o objetivo de melhorar a qualidade deste trabalho e torná-lo mais facilmente reproduzível.

4. PROPOSIÇÃO

O propósito deste estudo foi avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana de várias substâncias químicas para serem utilizadas como irrigantes intracanais ou medicações intracanais através de duas metodologias (teste de difusão em ágar e contato direto) frente a microrganismos aeróbios, anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos. As soluções irrigadoras testadas foram: hipoclorito de sódio (0,5%, 1,0%, 2,5%, 4,0% e 5,25%) e clorexidina gel e líquida (0,2%, 1,0% e 2,0%). Os medicamentos intracanais testados foram: clorexidina gel 2% e as pastas de hidróxido de cálcio associadas a água destilada, solução salina, solução anestésica, glicerina, polietilenoglicol, paramonoclorofenol canforado (PMCC), PMCC associado à glicerina e a clorexidina gel 2%.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. CONTATO DIRETO

5.1.1. Materiais

5.1.1.1. Microrganismos

a) Aeróbios:

Candida albicans (NTCC 3736)

Staphylococcus aureus (ATCC 25923)

b) Anaeróbio facultativo:

Enterococcus faecalis (ATCC 29212)

c) Anaeróbios estritos: isolados clinicamente dos canais radiculares.

Porphyromonas endodontalis

Phorphyromonas gingivalis

Prevotella intermedia/ nigrescens

5.1.1.2. Meios de cultura

Brain Heart Infusion Broth (BHI) - Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK

Fastidious Anaerobe Broth (FAB) – Lab M, Bury, UK

Brain Heart Infusion Agar (BHIA) - Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK

Fastidious Anaerobe Agar (FAA) – Lab M, Bury, UK

5.1.1.3. Irrigantes testados

clorexidina gel 0,2%

clorexidina gel 1%

clorexidina gel 2%

gel de natrosol (hidroxietilcelulose) – (grupo controle)

clorexidina líquida 0,2%

clorexidina líquida 1%

clorexidina líquida 2%

solução salina (grupo controle)

hipoclorito de sódio 0,5%

hipoclorito de sódio 1%

hipoclorito de sódio 2,5%

hipoclorito de sódio 4%

hipoclorito de sódio 5,25%

5.1.1.3. Medicações testadas

Ca(OH)_2 + água destilada

Ca(OH)_2 + glicerina

Ca(OH)_2 + PMCC + Glicerina

Ca(OH)_2 + PMCC + Polietilenoglicol (Calen PMCC ®)

Ca(OH)_2 + Polietilenoglicol (Calen ®)

Ca(OH)_2 + Clorexidina gel 2%

Como controle das medicações intracanaais foram usados:

água destilada

glicerina

PMCC

PMCC + Glicerina

PMCC + Polietilenoglicol

Polietilenoglicol

Natrosol

5.1.2. Método

A metodologia empregada no capítulo 1 foi uma adaptação da metodologia adotada por SIQUEIRA & UZEDA (1998). Nos capítulos 2, 4 e 5 foi utilizada a metodologia do capítulo 1.

5.1.2.1. Preparação do inóculo

Para padronização do inóculo utilizou-se da metodologia empregada por Koo *et al.* 1999.

Os microrganismos aeróbios (*C. albicans*, *S. aureus*) e o microrganismo facultativo (*E. faecalis*) foram subcultivados em placas de Brain Heart Infusion Agar (BHI), incubados em atmosfera de O₂ para os aeróbios e 10% CO₂ para o facultativo, por 24/48 horas. Os microrganismos anaeróbios estritos (*P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *P. intermedia/nigrescens*) foram subcultivados em placas de Fastidious Anaerobe Agar (FAA) enriquecidos com 5% sangue de

carneiro desfibrinado (EBEFARMA, Araras, SP) e incubados em câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, UK) em atmosfera de 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂ por 48 horas.

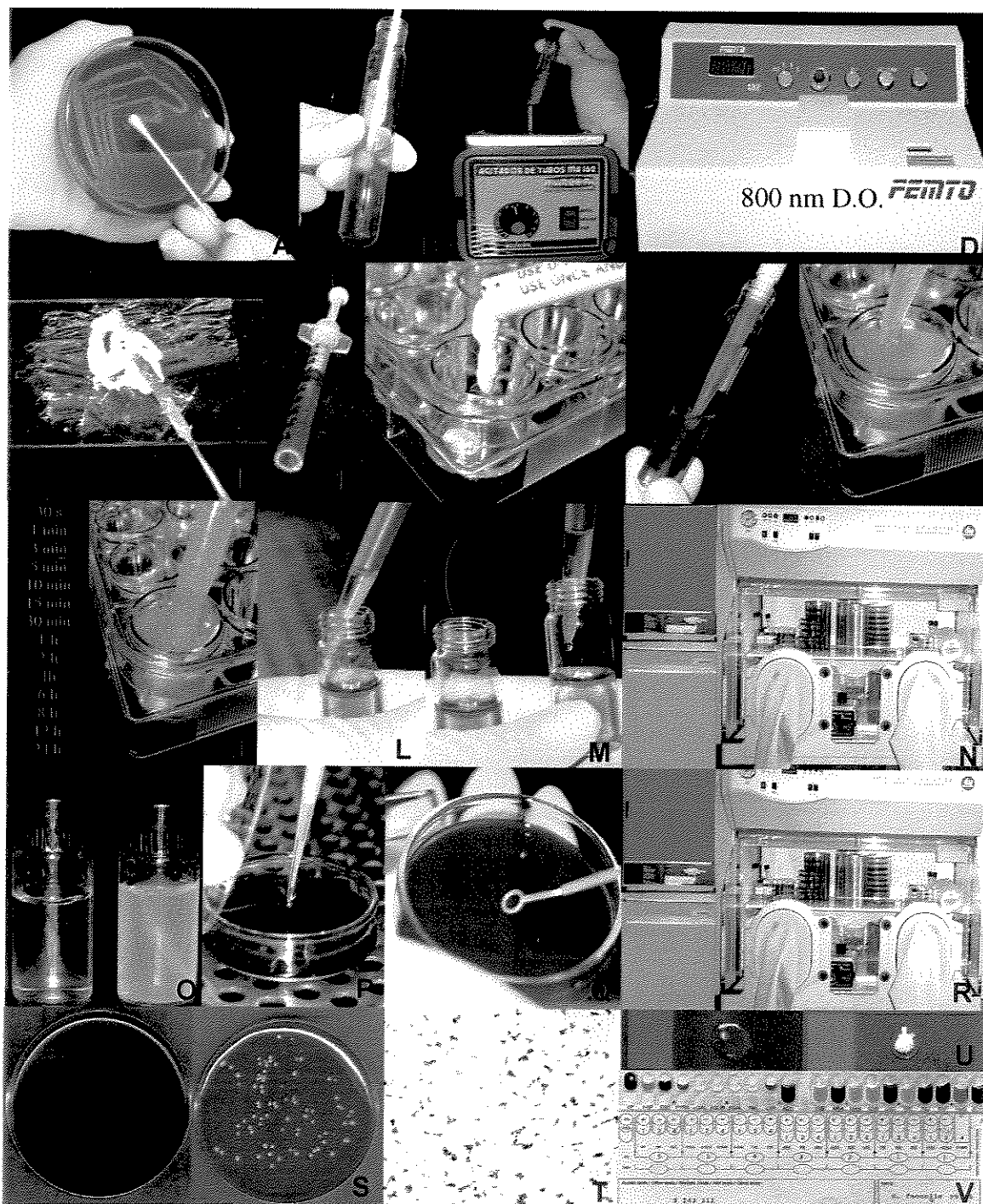
Após o crescimento em meio sólido, colônias isoladas de *C. albicans*, *S. aureus* e *E. faecalis* foram suspensas em tubos contendo 5 mL de BHI caldo. Após agitação mecânica, a suspensão foi ajustada no espectrofotômetro com absorbância de 800 nm, até atingir a concentração (transmitância 90) equivalente a 0.5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC). Para *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *P. intermedia/nigrescens* foram suspensas em tubos contendo 5 mL de Fastidious Anaerobe Broth (FAB). Após agitação mecânica, a suspensão foi ajustada no espectrofotômetro com absorbância de 800 nm, até atingir a concentração (transmitância 80) equivalente a 1.0 da escala de McFarland ($3,0 \times 10^8$ UFC).

5.1.2.2. Efeito antibacteriano dos irrigantes testados

Um mL de cada agente irrigante, medicação ou controles foi colocado no fundo dos poços de placas de cultura de células contendo 24 poços (Corning Cell Culture Cluster, Corning, NY). A seguir, 2 mL do inóculo bacteriano foram colocados em contato com as substâncias testes. Aguardaram-se os tempos de 15 s, 30 s, 45s, 1min, 3 min, 5 min, 10 min, 25 min, 20 min e 30 min, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas e 7 dias. Após cada período, foi retirado 1 mL de cada poço e levado para tubos contendo 2ml (Capítulo 1) ou 3 mL de BHI (para os microrganismos aeróbios e facultativos) e

FAB (para os microrganismos anaeróbios estritos) os quais continham os neutralizadores dos irrigantes ou medicações intracanais (0,6% de tiosulfato de sódio, para hipoclorito de sódio, 0,5% de Tween 80 e 0,07% de lecitina para clorexidina e 0,5% de ácido cítrico para hidróxido de cálcio) (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

Todos os tubos foram incubados a 37°C em condições gasosas específicas para permitir o crescimento microbiano (24 horas para aeróbios em estufa de O₂, 48 horas para facultativo em estufa de CO₂ e 7 dias para anaeróbios estritos em cabine de anaerobiose). Alíquotas (10 µL) foram plaqueadas em placas de BHI ágar ou FAA (de acordo com a necessidade nutricional dos microrganismos) acrescidos de 5% de sangue de carneiro desfibrinado. A interpretação dos resultados foi realizada através da turbidez do meio e do crescimento nas placas de ágar sangue. A pureza das culturas positivas foi confirmada através da morfologia das colônias nas placas de ágar sangue, coloração de Gram, e por métodos bioquímicos utilizando kits de identificação microbiana (*E. faecalis*: Api 20 Strep, *S. aureus*: API 20 Staph, *C. albicans*: API C AUX e *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *P. intermedia/nigrescens*: RapID 32 A – todos da bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França ou o RAPID ANA II da Remel Inc., Lenexa, KS, USA).



A. Colônias puras (24/48h); B. Diluição em meio de cultura líquido; C. Agitação; D. Padronização do inóculo; E. Manipulação das pastas de hidróxido de cálcio; F. Seringa hipodérmica esteril para medir as substâncias; G. Colocação de 1 mL da substância teste no fundo do poço das culturas de células (24- wells-Costar); H. Retirada de 2 mL do inóculo; I. Colocação dos 2 mL em contato com 1 mL com a substância a ser testada; J. Remoção de 1 mL do well após tempos testes; L. Colocação de 1 mL do well em tubo contendo 3 mL de meio de cultura com solução neutralizadora das substâncias testadas; M. Subcultura (1mL) em 3 mL de meio de cultura caldo; N. Incubação em condições gasosas apropriadas; O. 10 μ L sendo inoculados em placas de ágar sangue; P. Plaqueamento; Q. Incubação; R. Leitura em meio líquido (tubidez do meio); S. Leitura em meio sólido (morfologia das colônias); T. Coloração de Gram; U. Teste de catalase; V. Testes bioquímicos padronizados.

Fig 4.1.1. Etapas do método do contato direto.

5.2. DIFUSÃO EM ÁGAR

5.2.1. Materiais

5.2.1.1. Microrganismos:

5.2.1.1.1. Aeróbios:

Candida albicans (NTCC 3736)

Bacillus subtilis (ATCC19659)

Staphylococcus aureus (ATCC 25923)

5.2.1.1.2. Anaeróbios facultativos:

Actinomyces naeslundii (M104)

Enterococcus faecalis (ATCC 29212)

Streptococcus sobrinus 6715

Streptococcus sanguis (ATCC 10556)

Streptococcus mutans OMZ-175

5.2.1.1.3. Anaeróbios estritos isolados dos canais radiculares:

Porphyromonas gingivalis

Porphyromonas endodontalis

Prevotella denticola

Prevotella intermedia/nigrescens

5.2.1.2. Meios de cultura

Brain Heart Infusion Broth (BHI) - Oxoid, Basingstoke, UK

Brain Heart Infusion Agar (BHIA) - Oxoid, Basingstoke, UK

Fastidious Anaerobe Agar (FAA) - Oxoid, Basingstoke, UK

Mueller-Hinton Agar (MHA) - Oxoid, Basingstoke, UK

5.2.1.3. Substâncias testadas:

5.2.1.3.1. Clorexidina gel 2%

5.2.1.3.2. Pastas de hidróxido de cálcio preparadas com:

- H₂O destilada (9:7)
- salina (9:7)
- glicerina PA (9:7)
- propilenoglicol (9:7)
- anestésico (lidocaina a 2% sem vaso constritor) (9:7)
- paramonoclorofenol canforado (comercial) (9:7)
- glicerina+paramonoclorofenol canforado (65% canfora, 35% paramonoclorofenol) (2:1:1)
- Clorexidina gel 2% (1:1)

- 5.2.2. Métodos

- 5.2.2.1. Preparação do inóculo

A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método clássico de difusão em ágar, com algumas modificações, e posterior leitura dos halos de inibição de crescimento microbiano.

Os organismos aeróbios e facultativos foram subcultivados em placas de BHIA e incubados por 18-24 h a 37°C (em atmosfera de O₂ para aeróbios e 10% CO₂ para facultativos). Os organismos anaeróbios estritos foram subcultivados em placas de FAA + 5% sangue de carneiro desfibrinado (EBEFARMA, Araras, SP) e incubados em câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, UK) em atmosfera anaeróbia de 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂ por 48 h. O meio de cultura FAA foi usado para o cultivo dos anaeróbios por ser um meio não-seletivo que favorece o crescimento destes microrganismos, não sendo necessário incluir hemina e menadiona por já conter estas substâncias em sua fórmula (GOMES 1995; GOMES *et al.* 1994a,b; 1996a,b,c). Ele é bastante semelhante em sua composição ao Wilkens-Chalgren Agar, que é utilizado em testes de sensibilidade antimicrobiana para os anaeróbios.

Após crescimento em meio sólido, colônias isoladas de aeróbios e facultativos foram suspensas em tubos contendo 5 mL de solução estéril de NaCl a 0.89%. Após agitação mecânica, a suspensão era ajustada em espectrofotômetro com absorbância de 800 nm, até atingir a concentração equivalente a 0.5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ bactéria/mL) de acordo com Koo *et al.* (1999).

Para as bactérias estritamente anaeróbias colônias suspensas em solução estéril de NaCl a 0.89% até atingir a concentração equivalente a 1 da escala de McFarland. Tais inóculos foram utilizados por promoverem crescimento semiconfluyente de todos os microrganismos testados, de acordo com Koo *et al.* (1999).

5.2.2.2. Preparo das camadas de ágar e do inóculo

Para avaliar a atividade antimicrobiana das substâncias testadas frente às bactérias aeróbias, facultativas e levedura, foram utilizadas placas de 140 mm de diâmetro. Para o teste com bactérias anaeróbias estritas, foram utilizadas placas de 80 mm de diâmetro. Foram realizadas seis repetições para cada cada pasta contra cada microrganismo testado.

5.2.2.2.1. Bactérias aeróbias, facultativas e levedura

Utilizou-se o método de camada dupla.

Inicialmente foram preparadas placas (140 x 25mm) contendo 40 mL de MHA que serviram de base para a camada de inóculo (seed), que era preparada a seguir.

Cinqüenta mL de BHIA eram preparados e autoclavados em frascos de vidro com tampas rosqueáveis. Durante o processo de resfriamento, quando o BHIA atingia 45°C, ainda em estado líquido, se adicionava 500µL do inóculo microbiano e se promovia agitação uniforme do conjunto. O BHIA passava a ter, portanto, 1% de inóculo microbiano, e era então distribuído sobre a camada sólida de MHA .

5.2.2.2.2. Bactérias anaeróbias estritas

Para as bactérias anaeróbias estritas foi utilizada somente uma camada de meio de cultura, a qual o inóculo bacteriano foi plaqueado diretamente (camada seed). Estudos pilotos foram feitos para determinar qual a melhor concentração da suspensão bacteriana e a técnica de inoculação que permitisse crescimento semi-confluyente dos organismos a serem testados (Koo *et al.*, 1999). Nestes estudos foi observado que o método da camada dupla associada com 1% do inóculo nas concentrações de 0,5 e 1 na escala de McFarland, não produziam crescimento das bactérias anaeróbias estritas. Isto pode ocorrer devido sensibilidade térmica de tais bactérias e necessidade de ter uma concentração mais elevada de células bacterianas para haver crescimento (Gomes, 1995; Gomes, *et al.*, 1995).

Placas de 80 mm foram preparadas com 50 mL de FAA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Após a solidificação do ágar, as placas foram colocadas em atmosfera de anaerobiose por 24 horas para serem pré-reduzidas. A seguir, 150µl do inóculo bacteriano foi plaqueado, de forma uniforme, diretamente sobre o meio de cultura com o uso de um swab de madeira estéril.

5.2.2.3. Colocação dos tubos de inox sobre a superfície do ágar

Após a solidificação dos meios de cultura, tubos de inox com 6 mm de largura interna, 8 mm de largura externa e 10 mm de altura, foram colocados sobre a superfície do ágar. Cada tubo foi preenchido com 40 µL de cada solução a ser testada. As placas foram então mantidas por 2 h à temperatura ambiente para

permitir a difusão das substâncias testadas no ágar (as placas contendo os inóculos de anaeróbios estritos foram conservadas em jarros anaeróbios à temperatura ambiente). A manipulação das placas contendo culturas anaeróbias estritas foi feita sob o fluxo contínuo de nitrogênio para reduzir o tempo de exposição de tais bactérias à atmosfera ambiente.

5.2.2.4. Incubação

As placas foram então incubadas a 37 °C em condições gasosas apropriadas por período de tempo adequado.

5.2.2.5. Leitura dos halos de inibição

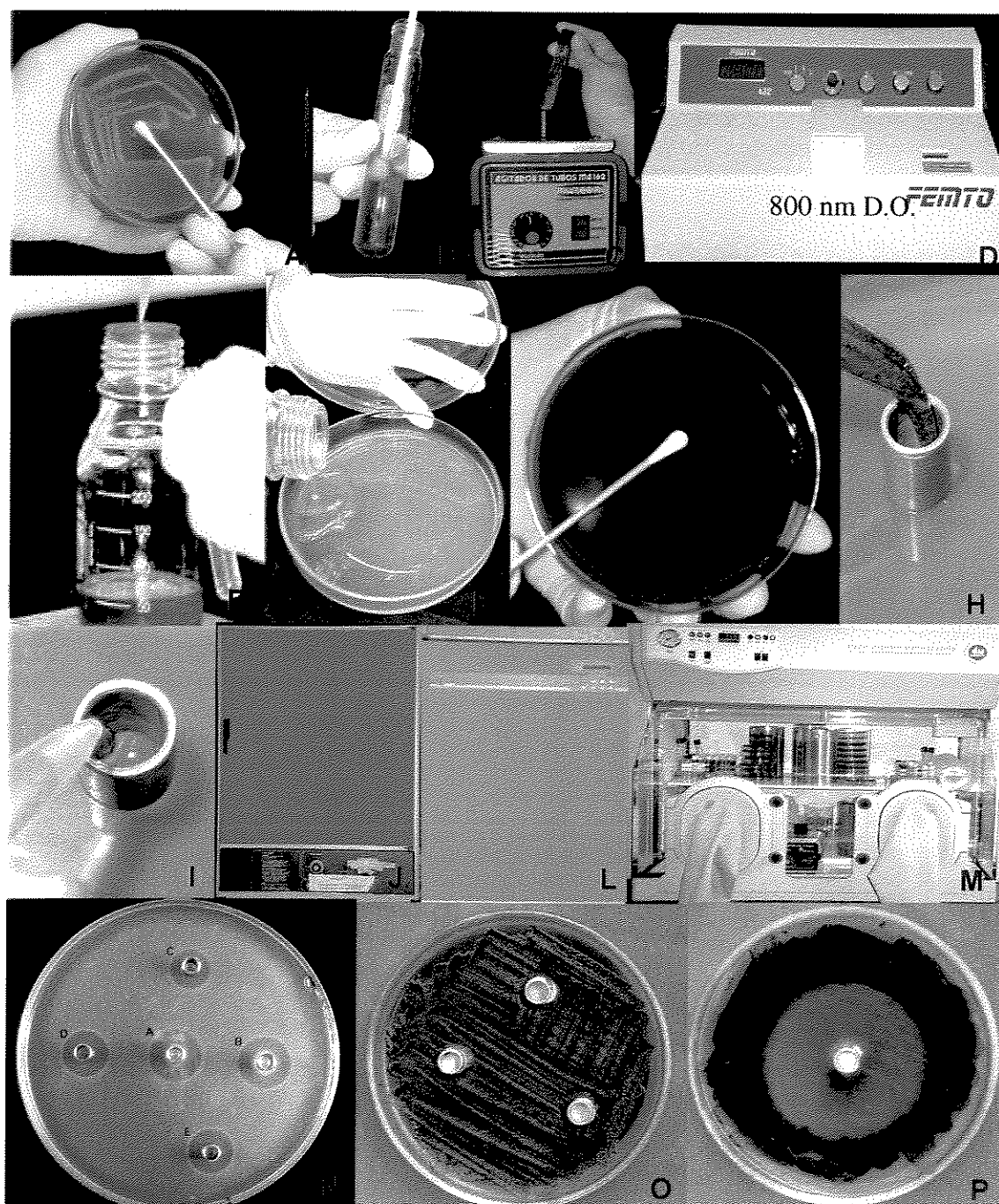
A primeira leitura para os organismos tais como *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* foi feita após 24 h de incubação a 37 °C. A primeira leitura dos organismos facultativos como *Streptococcus* e *Actinomyces* foi feita após 48 h de incubação a 10% de CO₂. Finalmente, a primeira leitura para as bactérias anaeróbias estritas (*Porphyromonas* e *Prevotella*) foi feita após 7 dias de incubação em atmosfera de 80% H₂, 10% CO₂, 10% N₂.

Após o período de incubação foi adicionado às placas (exceto as contendo FAA + sangue) 5 mL de gel de ágar a 1% acrescentado de cloreto de trifeniltetrazólico (TTC) a 0,5% com a finalidade de otimizar a leitura das placas. Após a solidificação do meio (5 min sobre toalha com gelo), as placas foram incubadas a 37°C por 15 min e realizadas as leituras das placas. A utilização do

TTC facilita a leitura dos halos de inibição por apresentar uma coloração avermelhada em contraste com área de crescimento microbiano.

Os raios das áreas de inibição microbiana corresponderam à menor distância entre a superfície externa do cilindro e o início da região de crescimento microbiano, os quais foram medidos com o auxílio de paquímetro milimetrado, em pelo menos dois sentidos.

A atividade antimicrobiana das soluções foi testada três vezes, em diferentes tempos, usando sempre triplicatas.



A. Colônias puras (24/48h); B. Diluição em meio de cultura líquido; C. Agitação; D. Padronização do inóculo; E. Colocação de 1 mL do inóculo em cada 100 mL de meio de cultura (BHI ágar) a 45 °C; F. Colocação da camada *seed* (meio + microrganismo) sobre a camada base (Miller Hinton) já solidificada; G. Semeadura diretamente sobre a placa de ágar sangue; H. Colocação dos cilindros sobre as placas já solidificadas; I. Colocação da substância (40 µL) a ser testada no interior do cilindro; J, L, M. Incubação em condições gasosas apropriadas (após espera de 2 horas); N, O, P. Halos de inibição de crescimento microbiano.

Fig 4.2.1. Etapas do método de difusão em ágar. E, F, J, L, N. somente para microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos. G, M, O, P. Somente para anaeróbios estritos.

6.1. CAPÍTULO 1

***In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*.**

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Caio Cezar Randi Ferraz

Morgana Eli Vianna

Vanessa Beloccio Berber

Fabício Batista Teixeira

Francisco José de Souza-Filho

Key words: antimicrobial activity, sodium hypochlorite, chlorhexidine, endodontics

International Endodontic Journal, 2001;34: 424-8

Abstract

Aim The aim of this study was to assess, *in vitro*, the effectiveness of several concentrations of NaOCl (0.5%, 1%, 2.5%, 4% and 5.25%) and two forms of chlorhexidine gluconate (gel and liquid) in three concentrations (0.2%, 1% and 2%) in the elimination of *Enterococcus faecalis*.

Methodology A broth dilution test using 24-well cell culture plates was performed and the time taken for the irrigants to kill bacterial cells was recorded. 24h- Isolated colonies of pure cultures of *E. faecalis* grown on 10% sheep blood + Brain Heart Infusion (BHI) agar plates were suspended in sterile 0.89% NaCl solution. The cell suspension was adjusted spectrophotometrically to match the turbidity of a McFarland 0.5 scale. One mL of each tested substance was placed at the bottom of wells of 24-well cell culture plates (Corning, NY), including the control group (sterile water). Six wells were used for each time period and irrigant concentration. Two mL of the bacterial suspension were ultrasonically mixed for 10 s with the irrigants and left to stand different periods of time, viz. for 10, 30, and 45 s; for 1, 3, 5, 10, 20, and 30 min; and for 1 and 2 h. After each period of time, 1 mL from each well was transferred to tubes containing 2 mL of freshly prepared BHI + neutralisers in order to prevent a residual action of the irrigants. All tubes were incubated at 37°C for 7 days. The tubes considered to have positive growth were those, which presented medium turbidity during the incubation period. Data were analysed statistically by the Kruskal-Wallis test, with the level of significance set at $p < 0.05$.

Results All irrigants were effective in killing *E. faecalis*, but at different times. Chlorhexidine in the liquid form at all concentrations tested (0.2%, 1% and 2%) and NaOCl (5.25%) were the most effective irrigants. However, the time required by 0.2% chlorhexidine liquid and 2% chlorhexidine gel to promote negative cultures was only 30 s and 1 min, respectively.

Conclusions In the conditions of this *in vitro* study all tested irrigants possessed antibacterial activity, the time required to eliminate *E. faecalis* depended on the concentration and type of irrigant used.

Introduction

Complete debridement and disinfection of the pulpal space are considered to be essential for predictable long-term success in endodontic treatment. Residual pulpal tissue, bacteria, and dentine debris may persist in the irregularities of root canal systems, even after meticulous mechanical preparation (Abou-Rass & Piccinino 1982). Therefore, several irrigant solutions have been recommended for use in combination with canal preparation. However, the efficacy of these procedures also depends upon the vulnerability of the involved species. Anaerobic bacteria, especially black-pigmented Gram-negatives, have been linked to the signs and symptoms of endodontic disease (Gomes *et al.* 1996a) but facultative bacteria, such as *Enterococcus faecalis*, have also been isolated from pathologically-involved root canals, being considered one of the most resistant species in the oral cavity and a possible cause of failure of root canal treatment (Gomes *et al.* 1996b).

An irrigant serves to flush out debris from within the instrumented root canals, dissolve organic tissue remnants, disinfect the root canal space and provide lubrication during instrumentation, without causing irritation to biological tissues (Cheung & Stock 1993, Ingle *et al.* 1994). Sodium hypochlorite (NaOCl) has become the most popular agent for endodontic irrigation, even though its optimum working concentration has not been universally agreed (Cheung & Stock 1993). Chlorhexidine gluconate, a less malodorous and toxic agent, has been suggested as an irrigant based on its antibacterial effects, substantivity and lower

cytotoxicity than NaOCl whilst demonstrating efficient clinical performance (Leonardo *et al.* 1999).

The purpose of this study was to assess *in vitro* the effectiveness of NaOCl and two forms of chlorhexidine gluconate (liquid and gel) at different concentrations in the elimination of *E. faecalis*.

Materials and methods

The irrigants tested in the elimination of *E. faecalis* were several concentrations (molecular weight) of NaOCl (0.5%, 1%, 2.5%, 4% and 5.25%) and two forms of chlorhexidine gluconate (gel and liquid) in three concentrations (0.2%, 1% and 2%). All irrigants were prepared by the same drugstore (Drogal Farmácia de Manipulação Ltda., Piracicaba, Brazil). NaOCl and chlorhexidine liquid at different concentrations were diluted with sterile water without preservatives, manipulated in small portions one day before the tests. Chlorhexidine gel consisted of gel base (1% natrosol - hydroxiethylcellulose) and chlorhexidine gluconate.

Isolated 24 h colonies of pure cultures of *E. faecalis* (ATCC 29212) grown on 10% sheep blood + Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK) agar plates were suspended in sterile 0.89% NaCl solution. The cell suspension was adjusted spectrophotometrically to match the turbidity of a McFarland 0.5 scale (1.5×10^8 cfu / mL).

One mL of each tested substance was placed at the bottom of wells of 24-well cell culture plates (Corning, New York, USA), including the control group

(sterile water). Six wells were used for each time period and irrigant concentration. Overall, 792 wells were used, comprising 726 for all the test irrigants and 66 for the control group. Two mL of the bacterial suspension were ultrasonically mixed for 10 s with the irrigants and left to stand different periods of time, viz. for 10, 30, 45 s; for 1, 3, 5, 10, 20, and 30 min; and for 1 and 2 h. After each period of time, 1 mL from each well was transferred to tubes containing 2 mL of freshly prepared BHI + neutralisers in order to prevent continued action of the irrigants. For eliminating the carrier over effect of NaOCl was used 0.6% sodium thiosulphate, and 0.5% Tween 80 + 0.07% lecithin was used for chlorhexidine (Siqueira *et al.* 1998b). All tubes were incubated at 37°C for 7 days. The tubes considered to have positive bacterial growth were those that presented medium turbidity matching the turbidity of a McFarland 4 scale (12×10^8 cfu/ mL) during the incubation period. The purity of the positive cultures was confirmed by Gram staining, by colony morphology on BHI agar + blood and by the use of a biochemical identification kit (API 20 Strep – BioMérieux SA, Marcy-l’Etoile, France). Data were analysed statistically by the Kruskal-Wallis test, with the level of significance set at $p < 0.05$.

Results

Table 1 shows the contact time required by each tested irrigant to produce 100% of inhibition growth of *E. faecalis*.

All irrigants were effective in killing the bacteria tested, but at different times. Chlorhexidine gluconate liquid (1% and 2%) and NaOCl (5.25%) took significantly

less time (>30 s) to eliminate *E. faecalis* than the other irrigants tested. However, the time required by chlorhexidine liquid (0.2%) and chlorhexidine gel (2%) to produce negative cultures was only 30 s and 1 min respectively.

When used at 0.2% concentration, chlorhexidine gel destroyed bacterial cells after 2 h of contact, as opposed to only 15 min when used at 1.0% concentration.

The antimicrobial activity of NaOCl was related to its concentration, i.e., higher concentrations took less time to inhibit bacterial growth than lower concentrations.

All specimens in the control group yielded positive cultures and *E. faecalis* was always recovered from all positive cultures.

Table 6.1.1. Contact time required by each tested irrigant to produce negative cultures (i.e. 100% inhibition growth) of *E. faecalis*.

Irrigants	Contact time	
0.2% chlorhexidine gel	2 h	a
1.0% chlorhexidine gel	15 min	ab
2.0% chlorhexidine gel	1 min	b
0.2% chlorhexidine liquid	30 s	b
1.0% chlorhexidine liquid	<30 s	b
2.0% chlorhexidine liquid	<30 s	b
0.5% sodium hypochlorite	30 min	ab
1.0% sodium hypochlorite	20 min	ab
2.5% sodium hypochlorite	10 min	b
4.0% sodium hypochlorite	5 min	b
5.25% sodium hypochlorite	<30 s	b

different letters mean significance differences ($p < 0,05\%$) – Kruskal-Wallis test

Number of tests performed using the irrigants: 726

Number of tests performed using sterile water (control group): 66

Discussion

Laboratory tests of any kind are only the first steps in a study of the effectiveness of irrigants. Antimicrobial activity of an *in vitro* environment depends upon the pH of the substrates in plates or tubes, sensitivity of the drug, bacterial source (wild strains or collection species), the number of bacteria inoculated, incubation time, and the metabolic activity of the microorganisms. On the other hand, the duration of effectiveness of the drug, temperature, contamination and possible leakage of the agent into the mouth must be considered while working *in vivo* (Updegraff & Chaug 1977, Ayan *et al.* 1999).

Enterococcus faecalis, a facultatively anaerobic Gram-positive coccus, has been implicated in persistent root canal infections (Engström 1964, Cavalleri *et al.* 1989, Gomes *et al.* 1996b, Molander *et al.* 1998) and has been used in several previous studies on the efficacy of endodontic irrigants (Shih *et al.* 1970, Parsons *et al.* 1980, Vahdaty *et al.* 1993, Siqueira *et al.* 1997, Heling & Chandler 1998, Siqueira *et al.* 1998a, Ayhan *et al.* 1999), especially for its high level of resistance to a wide range of antimicrobial agents (Heath *et al.* 1996). In the present study we used ATCC strain because it was also utilised in previous *in vitro* studies investigating the antibacterial effects of endodontic irrigants (Siqueira *et al.* 1997, 1998a, Gomes *et al.* 1999, Ferraz *et al.* *in press*).

Sodium hypochlorite solution is to-date, the most commonly employed root canal irrigant. However, no general agreement exists regarding its optimal concentration, which ranges from 0.5% to 5.25%. Kozol *et al.* (1988) evaluated the

toxic effects of NaOCl and observed that 0.025% was a safe concentration for clinical use, maintaining the antimicrobial action without harmful effects on the periapical tissues. Many studies (Spangberg *et al.* 1973, Byström *et al.* 1983) recommend its use at the concentration of 0.5% in order to obtain acceptable cytotoxic and bactericidal levels. According to a standard undergraduate text book (Harty 1990), 2.5% is the most favoured concentration.

NaOCl provides good tissue solvent action (Grossman & Meiman 1941, Senia *et al.* 1975, Moorer & Wesselink 1982), has a broad spectrum of antimicrobial activity (Spangberg *et al.* 1973, Bystrom *et al.* 1983, Jeansonne & White 1994, Barnard *et al.* 1996, Siqueira *et al.* 1998a, Ayhan *et al.* 1999), acts as a lubricant for instrumentation and can flush loose debris from root canals (Abou-Rass & Piccinino 1982, Baumgartner & Mader 1987, Baumgartner & Cuenin 1992). The major disadvantages of NaOCl are its cytotoxic effect if injected into the periapical tissues (Spangberg *et al.* 1973, Pashley *et al.* 1985, Spangberg *et al.* 1988), its foul smell and taste, its ability to bleach clothes, and its potential for causing corrosion (Neal *et al.* 1983, Busslinger *et al.* 1998). It is also known to produce allergic reactions (Kaufman & Keila 1989).

Exactly how NaOCl destroys microorganisms has never been demonstrated experimentally. The disinfecting efficiency of NaOCl depends on the concentration of undissociated hypochlorous acid (HClO) in solution. HClO exerts its germicidal effect by an oxidative action on sulphydryl groups of bacterial enzymes. As essential enzymes are inhibited, important metabolic reactions are disrupted, resulting in the killing of the bacterial cells (Dychdala 1991). However,

microorganisms such as *E. faecalis* are resistant to NaOCl, especially at low concentrations (Baumgartner & Cuenin 1992, Heling & Chandler 1998, Ayan *et al.* 1999). For instance, 0.5% NaOCl took 30 min to inhibit microbial growth, as demonstrated in the present work. On the other hand, the use of NaOCl at high concentrations is undesirable because it is an irritant to periapical tissues (Spangberg *et al.* 1973), even though its antimicrobial action is proportional to its concentration.

The present results showed that 5.25% was the most efficient concentration of NaOCl assessed, killing the bacterial cells in less than 30 s, in agreement with previous studies (Senia *et al.* 1975).

Chlorhexidine gluconate is a cationic bisguanide that seems to act by adsorbing onto the cell wall of the microorganism and causing leakage of intracellular components. At low chlorhexidine concentrations, small molecular weight substances will leak out, especially potassium and phosphorous, resulting in a bacteriostatic effect. At higher concentrations, chlorhexidine has a bactericidal effect due to precipitation and/or coagulation of the cytoplasm, probably caused by protein cross-linking (Fardal & Turnbull 1986).

Chlorhexidine gluconate has been used in endodontics as an irrigant solution, but always in a liquid presentation. Chlorhexidine gel was evaluated as an intracanal medication, demonstrating good performance (Siqueira & Uzeda 1997). The gel base for chlorhexidine gluconate, was the natrosol gel (hydroxyethyl cellulose, pH 5.5) used as a base for chlorhexidine gluconate, which is soluble in water and widely used to thicken shampoos, gels and soaps. The gel formulation

may keep the “active principle” of chlorhexidine gluconate in contact with the microorganisms for longer, inhibiting their growth

In a previous study (Gomes *et al.* 1999) that tested the antimicrobial activity of several irrigants, including chlorhexidine gluconate (in gel and solution) and different concentrations of NaOCl against selected endodontic microorganisms, by means of the agar diffusion method, chlorhexidine gel was more efficient than the liquid presentation at equivalent concentrations, although no significant difference was detected. In addition, the growth inhibition haloes produced by both forms of 2% chlorhexidine were significantly larger than those created by all concentrations of NaOCl, including 5.25%. All microbial species tested in that study were sensitive to chlorhexidine gluconate, either in gel or in solution, at both tested concentrations. Chlorhexidine demonstrated to be a powerful antimicrobial agent, in agreement with the results of previous studies (Delany *et al.* 1982, Ringel *et al.* 1982, Jeansonne & White 1994).

The results of the present study confirm those obtained by Ohara *et al.* (1993), although these investigators only used chlorhexidine in a liquid formulation. In both experiments, the antimicrobial activity of chlorhexidine gluconate was superior to that of NaOCl, except for 0.2% chlorhexidine gluconate gel, which took almost 2 hours to produce negative cultures. The present investigation tested the antimicrobial activity of chlorhexidine and NaOCl through direct contact with the *E. faecalis* suspension and showed that chlorhexidine liquid killed the bacterial cells more rapidly than chlorhexidine gel, specially the 0,2% chlorhexidine in liquid formulation and the gel formulation at the same concentration, which were

statistically different. Although there was not statistically differences, the 1,0 % and 2,0% chlorhexidine in liquid formulation eliminated *E. faecalis* in shorter length of time than the gel formulations. This fact could be explained owing to fact that the ultrasonic used in the present research mixed the microorganisms in a broth medium and the irrigants sheaking the the 24-well cell plates ultrasonically for 10 seconds, it could not be enough to mix equally the tested irrigants.

Our present work showed contrasted results with Gomes *et al.* (1999), when the gel formulation showed better results than the liquid formulation. This fact can be explained by the methodologies used; in this study, chlorhexidine liquid mixed very well with the bacterial suspension, immediately exerting its antimicrobial action, whereas the gel formulation, which is more difficult to mix, prevented direct contact between bacterial cells and chlorhexidine, thus requiring a longer time to act against the microorganisms. In the agar diffusion method, the gel formulation kept the active agent in contact with the inoculated media for a longer time, producing the largest inhibition zones. However, during root canal filing the antimicrobial irrigant used should also act as lubricant, remove the smear layer, be water-soluble and be biocompatible with periapical tissues. A gel formulation has all these advantages (Ferraz *et al. in press*).

The time required to eliminate *E. faecalis* depended on the concentration and type of irrigant used. The present study confirmed the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite, and also provided new data on the properties of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. Studies using chlorhexidine gel are indicated, especially with respect to its mechanical properties.

Further studies involving wild and collection strains, not only of *E. faecalis* but also of other endodontically-related bacteria, might be informative. It should be emphasised that, as with most *in vitro* studies, the present findings remain to be confirmed clinically.

In the conditions of this *in vitro* study, using plactonic cells of *E. faecalis*, it is possible to conclude that NaOCl, liquid/gel chlorhexidine gluconate in all tested concentrations could be used as irrigating solution, except the 0,2% chlorhexidine gluconate, which could exceed the necessary time of a root canal preparation.

References

- Abou-Rass M, Piccinino MV (1982) The effectiveness of four clinical irrigation methods on the removal of root canal debris. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 54, 323-8.
- Ayhan H, Sultan N, Çirak M, Ruhi MZ, Bodur H (1999) Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *International Endodontic Journal* 32, 99-102.
- Barnard D, Davies J, Figdor D (1996) Susceptibility of *Actinomyces israelii* to antibiotics, sodium hypochlorite and calcium hydroxide. *International Endodontic Journal* 29, 320-6.
- Baumgartner JC, Cuenin PR (1992) Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *Journal of Endodontics* 18, 605-12.

- Baumgartner JC, Mader CL (1987) A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. *Journal of Endodontics* 4, 147-57.
- Busslinger A, Sener B, Barbakow F (1998) Effects of sodium hypochlorite on nickel-titanium Lightspeed® instruments. *International Endodontic Journal* 31, 290-94.
- Byström A, Sundqvist G (1983) Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 55, 307-12.
- Cavalleri G, Cuzzolin L, Urbani G, Benoni G (1989) Root canal microflora: qualitative changes after endodontic instrumentation. *Journal of Chemotherapy* 1, 101-2.
- Cheung GSP, Stock CJR (1993) In vitro cleaning ability of root canal irrigants with and without endosonics. *International Endodontic Journal* 26, 334-43.
- Delany GM, Patterson SS, Miller MS, Newton CW (1982) The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 53, 518-23.
- Dychdala GR (1991) Chlorine and chlorine compounds. In: Block SS, ed. *Disinfection, sterilization, and preservation*, 4th edn. pp. 133-5. Philadelphia, USA: Lea & Febiger.
- Engström B (1964) The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontologisk Revy* 15, 87-105.

- Fardal O, Turnbull RS (1986) A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *Journal of the American Dental Association* 112, 863-9.
- Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *Journal of Endodontics* (in press).
- Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB (1996a) Clinical significance of dental root canal microflora. *Journal of Dentistry* 27, 47-55.
- Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB (1996b) Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *International Endodontic Journal* 29, 235-41.
- Gomes BPFA Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ (1999) Variations in the susceptibility of selected microorganisms to endodontic irrigants. *Journal of Endodontics* 25, 299 (BES Spring Meeting abstract).
- Grossman L, Meiman B (1941) Solution of pulp tissue by chemical agents. *Journal of the American Dental Association* 28, 233-5.
- Harty FJ (1990) Endodontics in clinical practice. 3rd edn. London, UK: Wright.
- Heat CH, Blackmore TK, Gordon DL (1996) Emerging resistance in *Enterococcus* spp. *Medical Journal of Australia* 164, 116-20.
- Heling I, Chandler NP (1998) Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *International Endodontic Journal* 31, 8-14.
- Ingle JI, Bakland LK, Peters DL, Buchanan S, Mullaney TP (1994) Endodontic cavity preparation. In: Ingle JI, Bakland LK, eds. *Endodontics*. 4th edn. pp. 92-227. Baltimore, USA: Williams & Wilkins.

- Jeansonne MJ, White RR (1994) A comparison of 2,0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *Journal of Endodontics* 20, 276-8.
- Kaufman AY, Keila S (1989) Hypersensitivity to sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics* 15, 224-6.
- Kozol RA, Gillies C, Elgebaly AS (1988) Effects of sodium hypochlorite (Dakin's solution) on cells of the wound module. *Archives of Surgery* 123, 420-3.
- Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LAB, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY (1999) *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *Journal of Endodontics* 25, 167-71.
- Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T (1998) Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal* 31, 1-7.
- Moorer WR, Wesselink PR (1982) Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *International Endodontic Journal* 15, 187-96.
- Neal RG, Craig RG, Powers JM (1983) Effect of sterilization and irrigants on the cutting abilities of stainless steel files. *Journal of Endodontics* 9, 93-6.
- Ohara PK, Torabinejad M, Kettering JD (1993) Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. *Endodontics and Dental Traumatology* 9, 95-100.
- Parsons GJ, Patterson SS, Miller CH, Katz S, Kafrawy AH, Newton CW (1980) Uptake and release of chlorhexidine by bovine pulp and dentin specimens and their subsequent acquisition of antibacterial properties. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 49, 455-9.

- Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH (1985) Cytotoxic effects of sodium hypochlorite on vital tissue. *Journal of Endodontics* 11, 525-8.
- Ringel AM, Patterson SS, Newton CW, Miller CH, Mulhern JM (1982) *In vivo* evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *Journal of Endodontics* 8, 200-4.
- Senia ES, Marraro RV, Mitchell JL, Lewis AG, Thomas L (1975) Rapid sterilization of gutta-percha with 5.25% sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics* 1, 136-40.
- Shih M, Marshall J, Rosen S (1970) The bactericidal efficiency of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 29, 613-9.
- Siqueira JF Jr, Batista MMD, Fraga RC, Uzeda M (1998a) Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *Journal of Endodontics* 24, 414-6.
- Siqueira Jr JF, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, Uzeda M (1997) Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from root canal, *in vitro*. *International Endodontic Journal* 30, 279-82.
- Siqueira Jr JF, Pereira da Silva CHF, Cerqueira MDO, Lopes HP, Uzeda M (1998b). Effectiveness of four chemical solutions in eliminating *Bacillus subtilis* spores on gutta-percha cones. *Endodontic and Dental Traumatology* 14, 124-6.

- Siqueira Jr JF, Uzeda M (1997) Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *Journal of Endodontics* 23, 167-9.
- Spangberg L, Engström B, Langeland K (1973) Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics *in vitro*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 36, 856-70.
- Spangberg L, Safavi KE, Kaufman A, Pascon EA (1988) Antimicrobial and toxic effect *in vitro* of a bisdequalinium acetate solution for endodontic use. *Journal of Endodontics* 14, 175-8.
- Updegraff DM, Chaug RW (1977) Antibacterial activity of dental restorative materials. *Journal of Dental Research* 50, 382-92.
- Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF (1993) Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules *in vitro*. *Endodontics and Dental Traumatology* 9, 243-8.
- Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M (1995) Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *Journal of Endodontics* 10, 513-5.

6.2. CAPÍTULO 2

***In vitro* evaluation of chlorhexidine and sodium hypochlorite antimicrobial activity against endodontic pathogens.**

Morgana Eli Vianna

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Vanessa Belloccio Berber

Caio Cezar Randi Ferraz

Alexandre Augusto Zaia

Francisco José de Souza-Filho

Key words: Irrigants, antimicrobial activity, bacteria, root canal treatment

Enviado para *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics.*

Abstract

The aim of this study was to investigate *in vitro* the antimicrobial activity of 0.2%, 1% and 2% chlorhexidine gluconate (gel and liquid), against endodontic pathogens and compare the results with the ones achieved by 0.5%, 1%, 2.5%, 4% and 5.25% NaOCl. A broth dilution test was performed; the timing for irrigants to kill microbial cells was recorded and statistically analysed. The 2.0% gel/liquid chlorhexidine eliminated *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* in 15 s, while the gel formulation killed *Enterococcus faecalis* in 1 min. All tested irrigants eliminated *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia/ nigrescens* in 15 s. The timing required for 1.0% and 2.0% chlorhexidine liquid to eliminate all microorganisms was the same necessary to 5.25% NaOCl. In the conditions of this *in vitro* study, it is possible to conclude that NaOCl, liquid/gel chlorhexidine gluconate in all tested concentrations could be used as irrigating solution, except the 0.2% chlorhexidine gel, which the required time to eliminate *E. faecalis* could exceed the timing of a root canal preparation.

Introduction

One of the primary objectives of the endodontic therapy is the microbial reduction, which, in turn, will promote the normal healing process into the periodontal tissues (6).

Anaerobic bacteria, especially black-pigmented Gram-negatives, have been linked to the signs and symptoms. However, facultative bacteria, such as *Enterococcus faecalis* have been considered one of the most resistant species in the oral cavity, and a possible cause of failure of root canal treatment (12).

Apart from the decrease in the number of microorganisms (24), it is also important to reduce the debris, which is higher in canals prepared without irrigating solutions (11). Therefore, an endodontic irrigant should exhibit powerful antimicrobial activity, dissolve organic tissue remnants, disinfect the root canal space, flush out debris from the instrumented root canals and provide lubrication (15).

Sodium hypochlorite (NaOCl) in several concentrations has been widely used as irrigant of choice (32, 10). NaOCl provides good tissue solvent action (26, 21), has a broad spectrum of antimicrobial activity (29, 7, 16, 2, 27), acts as a lubricant for instrumentation and can flush loose debris from root canals (1, 3, 4).

Chlorhexidine is widely used as a mouth rinse in the prevention and treatment of periodontal diseases and dental caries (8). Its use has been suggested in endodontics as irrigating solution (9) or intracanal dressing (28). The antimicrobial

effect of chlorhexidine is related to the cationic molecule binding to negatively charged bacterial cell walls, thereby altering bacterial osmotic equilibrium (14).

The purpose of this study was to investigate *in vitro* the antimicrobial activity of 0.2%, 1% and 2% chlorhexidine gluconate in gel and liquid formulations against several endodontic pathogens and compare the results with the ones achieved by 0.5%, 1%, 2.5%, 4% and 5.25% sodium hypochlorite.

Materials and Methods

The methodology used was adapted from Gomes *et al.* (13).

The intra-canal irrigants tested were two presentation forms of chlorhexidine gluconate (gel and liquid) in three concentrations (0.2%, 1.0%, 2.0%), and sodium hypochlorite (0.5%, 1%, 2.5%, 4% and 5.25%). The same manufacturer prepared all irrigants (Proderma Farmácia de Manipulação Ltda., Piracicaba, SP, Brazil). NaOCl and chlorhexidine liquid at different concentrations were diluted with sterile water without preservatives. Chlorhexidine gel consisted of gel base (1% natrosol) and chlorhexidine gluconate. The 0.89% sterile saline and the 1% natrosol were used as controls.

The species of microorganisms used in this experiment were *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Candida albicans* NTCC 3736, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 grown on Brain Heart Infusion (BHI, Lab M, Bury, UK) and *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* and *Prevotella*

intermedia/Prevotella nigrescens grown on Fastidious Anaerobe Agar (FAA, Lab M, Bury, UK), both added 5% sheep blood. All microorganisms were previously subcultured onto appropriate culture media and gaseous conditions for 48 h. Facultative strains were individually inoculated into tubes containing 5mL Brain Heart Infusion (BHI, Lab M, Bury, UK) sterile suspension, which were adjusted spectrophotometrically at 800 nm (O.D.₈₀₀) to match the turbidity of 1.5×10^8 cfu mL⁻¹ (equivalent to 0.5 McFarland standard). Strict anaerobic microorganisms were individually inoculated into tubes containing 5mL of Fastidious Anaerobe Broth (FAB, Lab M, Bury, UK) sterile suspension, which were suspended spectrophotometrically at 800 nm (O.D.₈₀₀) to match the turbidity of 3.0×10^8 cfu mL⁻¹ (equivalent to 1 McFarland standard), according to Koo *et al.* (1999).

Six wells were used for each time period, irrigant and microorganism respectively. Overall, 5616 wells were used, comprising 4752 for all the test irrigants (432 for each irrigant and each control group).

One mL of each tested irrigants was placed at the bottom of wells of 24-well cell culture plates (Corning, NY, USA, ref. No. 3524, well Vol. 3,2 mL), including the controls groups (sterile saline and natrosol). Two mL of the microbial suspension were ultrasonically mixed for 10 s with the irrigants and left to stand different periods of time, viz. for 15, 30, and 45 s; for 1,3,5, 10, 15, 20 and 30 min; and for 1 and 2 h. After each period of time, 1 mL from each well was transferred to tubes containing 3 mL of freshly broth medium plus neutralizers (Tween 80 plus 0.07% lecithin was used for chlorhexidine and 0.6% sodium thiosulphate for NaOCl) in order to avoid a residual action of the tested irrigants (13). All tubes

were left at 37°C for 7 days in appropriate gaseous condition for microbial growth. After this period, 10 µL of each tube was inoculated on agar plates and left at 37°C for 24–48 days in appropriate gaseous condition for investigate all possible bacterial growth. The purity of the positive cultures were confirmed by Gram staining, by colony morphology on blood agar plates and by the use of biochemical identification kits (API 20 Strep BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France; API C AUX BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France; API 20 Staph BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France; RapID ANA II System, Remel Inc., Lenexa, KS, USA). The time spent by each irrigant to produce total microbial inhibition growth was recorded, transformed in seconds, and analysed statistically by Kruskal-Wallis test, with significance level set at $p < 0.05$.

Results

Samples adherence and normality were tested using GMC program (USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil), demonstrating that the data were non-parametric. Then the samples were compared using Kruskal-Wallis test (BioEstat program, CNPQ, 2000, Brazil), with significance level at $p < 0.05$. The data were retransformed in seconds, minutes and hours in order to make the comparisons of results easier. The letters in tables show different values (statisticaly speaking). The capital letter shows the differences in the same the line and the lower case in the same column.

Table 1 shows the contact time required for chlorhexidine gluconate gel/liquid concentrations to produce negative cultures against all tested microorganisms. Chlorhexidine liquid in all concentrations and the 2.0% chlorhexidine gel eliminated the facultative microorganism (*E. faecalis*) and the aerobic- (*S. aureus* and *C.albicans*) microorganisms in 1 minute or less. It was necessary 15 s to all tested chlorhexidine kill the Gram-negative strict microorganisms (*Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* and *Prevotella intermedia/ nigrescens*).

Analysing the performance of chlorhexidine against *E. faecalis*, the 1.0% and 2.0%, in liquid formulations, spent a shorter length of time (15 s) than 0.2 % chlorhexidine gel, which showed the longest timing (2 h) to inhibit the microbial growth. However, analysing the columns of *S. aureus* and *C. albicans* there was not statistically different from the necessary timing to eliminate these microorganisms, except to 1,0% concentration, which eliminated the *S. aureus* in 30 s and *C. albicans* in 15 s.

Table 2, which shows the contact time required for sodium hypochlorite in different concentrations to produce negative cultures against all tested microorganisms. The 0.5% and 1.0% sodium hypochlorite showed statistically different a longer length of time than the other tested concentrations (30 min and 20 min respectively) to eliminate the Gram-positive facultative- and aerobic-microorganisms. The 5.25% sodium hypochlorite showed the best performance, statistically different, killing the same microorganisms in 15 s. The same timing, 15s, was observed to all sodium hypochlorite to kill the Gram-negative strict

anaerobic microorganisms, there was not statistically differences between the required time for all tested NaOCl concentrations eliminate these microorganisms.

Saline and natrosol, which were the control groups, did not produce inhibition growth against any of the microorganisms tested.

Table 6.2.1: Contact time required for chlorhexidine gluconate in different concentrations, in liquid and gel formulations to produce negative cultures (ie: 100% inhibition of growth) against all tested microorganisms

Microorganisms	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>P. endodontalis</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P.intermedia/ nigrescens</i>
0.2% chlorhexidine gel	5 — 10 min a A	1 — 2 h a A	5 — 10 min a A	15 s a B	15 s a B	15 s a B
1.0% chlorhexidine gel	15 — 30 s a A	10 — 15 min a b A	15 s b B	15 s a B	15 s a B	15 s a B
2.0% chlorhexidine gel	15 s b B	30s — 1 min b c A	15 s b B	15 s a B	15 s a B	15 s a B
0.2% chlorhexidine liquid	15 s b B	15 — 30 s c d A	15 s b B	15 s a B	15 s a B	15 s a B
1.0% chlorhexidine liquid	15 s b A	15 s d A	15 s b B	15 s a A	15 s a A	15 s a A
2.0% chlorhexidine liquid	15 s b A	15 s d A	15 s b B	15 s a A	15 s a A	15 s a A

s: second

min: minute

h: hour

Different letters (from a to d, and A to B) mean different values

Capital letter shows the line statistical analisys (Kruskal-Wallis $p < 0.05$)

Lower case shows the colum statistical analisys (Kruskal-Wallis $p < 0.05$)

Table 6.2.2: Contact time required for sodium hypochlorite in different concentrations to produce negative cultures (ie: 100% inhibition of growth) against all tested microorganisms

Microorganisms	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. endodontalis</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia/</i> <i>nigrescens</i>
0.5 % sodium hypochlorite	20 — 30 min a A	20 — 30 min a A	20 — 30 min a A	15 s a B	15 s a B	15 s a B
1.0 % sodium hypochlorite	15 — 20 min a b A	15 — 20 min a b A	15 — 20 min a b A	15 s a B	15 s a B	15 s a B
2.5 % sodium hypochlorite	5 — 10 min b c A	5 — 10 min b c A	5 — 10 min b c A	15 s a B	15 s a B	15 s a B
4.0 % sodium hypochlorite	3 — 5 min c d A	3 — 5 min c d A	3 — 5 min c d A	15 s a B	15 s a B	15 s a B
5.25 % sodium hypochlorite	15 s d A	15 s d A	15 s d A	15 s a A	15 s a A	15 s a A

s: second

min: minute

h: hour

Different letters (from a to d, and A to B) mean different values

Capital letter shows the line statistical analysis (Kruskal-Wallis $p < 0.05$)

Lower case shows the column statistical analysis (Kruskal-Wallis $p < 0.05$)

Discussion

Sodium hypochlorite solution is, to date, the most commonly employed root canal irrigant, but no general agreement exists regarding its optimal concentration, which ranges from 0.5 to 5.25%. Many studies recommend the use of 0.5% NaOCl in order to obtain acceptable cytotoxic and bactericidal levels (7). However, according to our *in vitro* results, it takes at least 30 min to eliminate the aerobic and the facultative microorganisms. The best performance was achieved by the 5.25% sodium hypochlorite, which killed microorganisms in seconds. Our results agreeing with those achieved by Gomes *et al.* (13), when reported the required time for irrigating solutions to eliminate *E. faecalis*. Senia *et al.* (26) also found similar results.

The antimicrobial action time of the 2.0% chlorhexidine gel was similar to the 1.0% and 2.0% liquid formulations (15 s), being statistically different only against *E. faecalis*, which spent a little longer (1 min). Chlorhexidine, either in gel or in solution formulations, demonstrated to be a powerful antimicrobial agent, in agreement with the results of previous studies (25, 16, 13).

The 2.0% chlorhexidine gluconate (in both presentation forms) and the 5.25% sodium hypochlorite showed similar performance, agreeing with the studies of Jeansonne & White (16) and Gomes *et al.* (13).

It cannot be forgotten that the major disadvantages of NaOCl are its cytotoxic effect if injected in the periapical tissues (29, 23, 30, 31), its foul smell and taste, the fact that it bleaches clothes, and its corrosive potential (22, 5). It is also known

to produce allergic reactions (17). Therefore, an equally effective, but safer irrigant is desirable (33).

Chlorhexidine does not dissolve organic tissue (19). On the other hand, such viscosity increases the mechanical removal of the organic tissues, which compensate the inability of the chlorhexidine gel to dissolve them. Moreover, it is a less malodorous and toxic agent than NaOCl and does not induce significant inflammatory responses (32). Hence, the chlorhexidine has a great potential to be used as a routine endodontic irrigant, based on its antimicrobial effects, and substantivity, demonstrating efficient clinical performance (20). Moreover, its use is probably more appropriated in cases of open apex and reported allergy to bleaching solutions.

Although the antimicrobial activity of chlorhexidine liquid is equal or superior to chlorhexidine gel, depending on the methodology used (13), it seems that the gel formulation brings more clinical advantages. Strictly speaking, it makes instrumentation easier, maintains the active principle in contact with the dentine walls for a long period of time, and decreases the smear layer formation, which does not happen with the liquid formulation (10).

As can be observed all tested irrigants showed antimicrobial activity, which is related to irrigant type, concentration and presentation form, as well as the microbial susceptibility. Regarding the chlorhexidine results the formulations (gel or liquid) had influence in the antimicrobial activity.

In the conditions of this *in vitro* study, it is possible to conclude that NaOCl, liquid/gel chlorhexidine gluconate in all tested concentrations could be used as

irrigating solution, except the 0,2% chlorexidine gel, which the required time to eliminate *E. faecalis* could exceed the timing of a root canal preparation.

Acknowledgements

I would like to thank Glaucia Maria Bovi Ambrosano for invaluable help in statistics analysis. This work was sponsored by Brazilian grants from FAPESP (no. 2000/13689-7), CNPq (520277/99-6) and CAPES.

References

1. Abou-Rass M, Piccinino MV. The effectiveness of four clinical irrigation methods on the removal of root canal debris. *Oral Surg.* 1982; 54: 323-8.
2. Barnard D, Davies J, Figdor D. Susceptibility of *Actinomyces israelii* to antibiotics, sodium hypochlorite and calcium hydroxide. *J. Endodon.* 1996; 29: 320-6.
3. Baumgartner JC, Mader CL. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. *J. Endodon.* 1987; 4: 147-57.
4. Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J. Endodon.* 1992; 18: 605-12.
5. Busslinger A, Sener B & Barbakow F. Effects of sodium hypochlorite on niqel-titanium Lightspeed ® instruments. *Int Endod J.* 1998; 31: 0290-4.

6. Byström A. & Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in the endodontic therapy. *Scand Dent Res.* 1981; 89: 321-8.
7. Bystrom A & Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg.* 1983; 55: 307-312.
8. Cervone F, Tronstad L & Hammond B. Antimicrobial effect of chlorhexidine in a controlled release delivery system. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 1: 33-6.
9. Delany GM, Patterson SS, Miller CH & Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surg.* 1982; 53: 518-22.
10. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB & Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endodon.* 2001; 27: 452-5.
11. Goldman M, Goldman LB, Kronman JH, Lin PS. The efficacy of several irrigating solutions for endodontics: a scanning electron microscopic study. *Oral Surg.* 1981, 52: 197-204.
12. Gomes BPFA, Drucker DB & Lilley JD. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J.* 1996; 29: 69-75.
13. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB & Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2001; 34: 424-8.

14. Greenstein G., Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol.* 1986; 57: 370-7.
15. Harrison JW. Irrigation of the root canal system. *Dent Clin North Am.* 1984; 4: 797-808.
16. Jeansonne MJ & White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endodon.* 1994; 20: 276-8.
17. Kaufman AY & Keila S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. *J Endodon.* 1989; 15: 224-6.
18. Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JÁ. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and arnica montana against oral pathogens. *Arch Oral Biol.* 1999; 45: 141-8.
19. Kuruvilla JR & Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endodon.* 1998; 24: 472-76.
20. Leonardo MR, TANOMARU Filho M. Silva LAB, Nelson Filho P, Bonifácio KC & Ito IY. *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endodon.* 1999; 25: 167-71.
21. Moorer WR, Wesselink PR Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J.* 1982; 15: 187-96.
22. Neal RG, Craig RG, Powers JM. Effect of sterilization and irrigants on the cutting abilities of stainless steel files. *J. Endodon.* 1983; 9: 93-6.

23. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of sodium hypochlorite on vital tissue. *J. Endodon.* 1985; 11: 525-8.
24. Peters LB, van Winkenholff A-J, Buijs JF, Wesselink PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J.* , 2002; 35: 13-21.
25. Ringel AM, Patterson SS, Newton CW, Miller CH & Mulhern JM. *In vivo* evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *J Endodon.* 1982; 11: 525-8.
26. Senia ES, Marraro RV, Mitchell JL, Lewis AG, Thomas L Rapid sterilization of gutta-percha with 5.25% sodium hypochlorite. *J. Endodon.* 1975; 1: 136-40.
27. Siqueira JF Jr, Batista MMD, Fraga RC, Uzeda M Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J. Endodon.* 1998; 24: 414-6.
28. Siqueira Jr JF & Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endodon.* 1997; 49: 167-9.
29. Spangberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics *in vitro*. *Oral Surg.* 1973; 36: 856-70.
30. Spangberg L & Pascon EA. The importance of material preparation for the expression of cytotoxicity during *in vitro* evaluation of biomaterials. *J Endod.* 1988; 14:247-50.

31. TANOMARU Filho M, Leonardo MR, Silva LAB, Anibal EF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J.* 2002; 35: 735-9.
32. Vivacqua-Gomes N, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings, *Int Endod J.* 2002; 35: 1-5.
33. White RR, Hays GL & Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endodon.* 1997; 23: 229-31.

6.3. CAPITULO 3

***In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms.**

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Caio Cezar Randi Ferraz

Morgana Eli Vianna

Pedro Luiz Rosalen

Alexandre Augusto Zaia

Fabricio Batista Teixeira

Francisco José de Souza-Filho

Key words: intracanal medication, calcium hydroxide, microorganisms

Brazilian Dental Journal, 2002; 13:155-61

Abstract

The aim of this study was to investigate *in vitro* the antimicrobial activity of calcium hydroxide in combination with several vehicles against some microorganisms commonly isolated from root canals. Antimicrobial activity was determined by the agar diffusion method. Stainless-steel cylinders were placed on each inoculated agar medium. The test medicaments and their controls were placed inside the cylinders. The zones of growth inhibition were measured and recorded after the incubation period for each plate and the results were analysed statistically. The *in vitro* antimicrobial effects of the medications was ranked from strongest to weakest as follows: Ca(OH)_2 + CMCP + glycerine, Ca(OH)_2 + CMCP, Ca(OH)_2 + Glycerine, Ca(OH)_2 + anaesthetic, Ca(OH)_2 + saline, Ca(OH)_2 + H_2O , Ca(OH)_2 + polyethyleneglycol. The pastes with CMCP showed significantly larger mean zones of inhibition when compared with the ones with aqueous or viscous vehicles. It was concluded that the type of vehicle utilised affects the diffusion ability and the antimicrobial activity of calcium hydroxide.

Introduction

The role of bacteria and their degradatory by-products in the initiation and perpetuation of pulpal and periapical disease has been well established. Most infecting bacteria, together with their principal substrate of necrotic pulp debris, may be removed by routine endodontic procedures such as instrumentation and irrigation of the pulp space, and the use of an intracanal medicament with antimicrobial activity. Nevertheless, this is not always fully achieved in clinical practice. The anatomical complexities of many root canals, and consequent limitations of access by instruments, irrigants and intracanal medications are well-recognised factors (1). Despite the antimicrobial proprieties of the Chemomechanical preparation and the intracanal dressings, the elimination of the microorganisms may not be uniform due to the vulnerability of the involved species (2).

Even though the anaerobic bacteria, especially black-pigmented Gram-negatives, have been linked to the signs and symptoms (3,4), facultative bacteria, such as *Enterococcus faecalis* have being considered one of the most resistant species in the oral cavity and a possible cause of failure of root canal treatment (2,5).

It has long been recognised that the antibacterial effects of biomechanical procedures can be enhanced by the subsequent placement of an antimicrobial intracanal medication such as calcium hydroxide (6). Calcium hydroxide (Ca(OH)_2) was first introduced as a pulp capping agent in 1930 by Hermann and since then its

use in endodontic therapy has increased. Today it occupies a position as one of the most versatile medications in dentistry, especially for its use as an intracanal dressing. Moreover, calcium hydroxide is considered to fulfil many of the properties of an ideal root canal dressing due to its moderate antibacterial action, its ability to induce hard tissue formation and to cause intracanal occlusion, and its tissue dissolving capability (7).

For calcium hydroxide to act effectively as an intracanal dressing it should ideally occupy all the pulp space thereby diffusing into areas inaccessible to instruments. Its effectiveness is linked to the diffusion of hydroxyl ions through the dentinal tubules and accessory canals into areas where bacteria and their by-products may be harboured. In addition to acting as a physical barrier, the calcium hydroxide dressing may both prevent root canal re-infection and interrupt the nutrient supply to the remaining bacteria. Its alkalising pH (around 12.5) promotes a destructive effect on cell membranes and protein structure (8).

Recent studies have reviewed the classification and clinical indications of various formulations of calcium hydroxide (9,10) and their mechanisms of antimicrobial activity (11), clearly indicating that even though this medication has been used for more than 80 years, there are still many questions to be answered regarding its antimicrobial action.

The agar diffusion method has been widely used to test antimicrobial activities of endodontic medicaments and sealers (12,13). It allows direct comparison of intracanal medicaments against the test microorganisms, indicating which medication has the potential to eliminate bacteria from the root canal system.

The purpose of this study was to assess *in vitro* the antimicrobial activity of calcium hydroxide associated with several formulations against aerobes and facultatively and strictly anaerobic microorganisms commonly isolated from the root canals. The antimicrobial activity of the vehicles was also examined.

Material and methods

The microorganisms used in this experiment were two aerobes, six facultative anaerobic bacteria, and four black-pigmented Gram-negative anaerobes commonly isolated from infected root canals, as follows: *Candida albicans* (NTCC 3736), *Bacillus subtilis* (ATCC 19659), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Streptococcus mutans* OMZ 175, *Actinomyces naeslundii* M104, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens* and *Prevotella denticola*. The last four microorganisms were isolated from clinical trials. The aerobes and facultative anaerobes were kindly donated by the Center of Oral Biology, University of Rochester, NY, USA.

Each microbial strain was evaluated against calcium hydroxide pastes prepared with the following vehicles: a) sterile distilled water (aqueous vehicle); b) sterile saline (aqueous vehicle); c) anaesthetic solution (aqueous vehicle, 3% carbocaine (mepivacaine) with no vasoconstrictor – Sterling Drug, New York, NY); d) glycerine (viscous vehicle); d) polyethyleneglycol (viscous vehicle, proprietary

brand: Calen™ - S.S.White Artigos Dentários, Rio de Janeiro, RJ, Brazil); e) camphorated parachlorophenol (CMCP, Frank's paste, 2:1); f) CMCP + glycerine (2:1:1). Distilled water, a physiologic solution of 0.89% sterile saline, anaesthetic solution, glycerine, polyethyleneglycol, CMCP and CMCP + glycerine (1:1) were used as controls.

The calcium hydroxide pastes were prepared using calcium hydroxide powder (Mallinckrodt Inc., Phillipsburg, NJ, USA). The consistency of the pastes was similar to that of toothpaste, with a viscosity of 3501 cP at 0.1 rpm (Brookfield Digital Reometer, model DV-III-IV, São Paulo, SP, Brazil) and pH 12.5 determined with a pH meter (Analion, pH digital PM 605, Ribeirão Preto, SP, Brazil). Calen is the proprietary brand of Leonardo & Leal's paste, with the following formulation: calcium hydroxide (2.5 g), zinc oxide (0.5 g), hydrogenised colophony (0.05 g) and polyethyleneglycol 400 (12.75 mL). This is the only proprietary brand of a calcium hydroxide paste containing this viscous vehicle (10).

All microorganisms were previously subcultured in appropriate culture media and under gaseous conditions to confirm their purity.

Aerobe and facultative strains were individually inoculated into tubes containing 5 mL of a sterile 0.89% saline solution. The suspension was adjusted spectrophotometrically to match the turbidity of a McFarland 0.5 scale. Five hundred μ L of each test microorganism suspension were inoculated into glass bottles containing 50 mL of BHI Agar at 46°C, vortexed, and poured onto 130 mm-plates containing a previously set layer of Mueller Hinton (MH) agar (Oxoid, Unipath

Ltd, Basingstoke, UK).

For the anaerobes, isolated colonies were suspended to reach 1.0 on the McFarland scale. Sterile swabs were dipped into the bacterial suspension and inoculated onto pre-reduced 70 mm-plates containing 5% sheep-blood-Fastidious Anaerobe Agar (FAA - Lab-M, Bury, UK). The inoculum procedures used were appropriate to provide a semi-confluent growth of the tested microorganisms.

Sterilised stainless-steel tubes of 8.0 x 1.0 x 10 mm (inner diameter, 6 mm) were added to the surfaces of the media and filled with 40 μ L of each test substance and its control. The plates were kept for 2 hours at room temperature to allow the diffusion of the agents through the agar and then incubated at 37°C under appropriate gaseous conditions and for an appropriate period of time: aerobes, 24 h; facultatives, 24-48 h in a CO₂ incubator (Jouan, Saint Herblain, France), in an atmosphere of 10% CO₂; and anaerobes in the anaerobic work station (Don Whitley Scientific, Bradford, UK) in an atmosphere of 5-10% H₂, 10% CO₂, 80-85% N₂ for 7 days. Zones of inhibition of microbial growth around the cylinder containing the tested substances were measured and recorded after the incubation period. The inhibitory zone was considered to be the shortest distance (mm) from the outer margin of the cylinder to the initial point of the microbial growth. When the pastes did not produce inhibition microbial zones the cylinder containing the pastes were removed and a sample each them was inoculated on agar plates to confirm the antimicrobial activity by direct contact. Six replicates were made for each microorganism. Analysis of variance was used to determine the differences in susceptibility to intracanal medication between microbial species.

Results

The letters in tables show different values (statistically speaking). The capital letter shows the differences in the same the line and the lower case in the same column. Table 1 shows the mean area of the zones of microbial growth inhibition (in mm) provided by calcium hydroxide associated with several vehicles. Zones of microbial inhibition equal zero mean that the medication had antimicrobial action by direct contact, however, without halo formation.

All calcium hydroxide pastes were inhibitory at least by direct contact against all microbial strains tested (Table 1).

Based on the averages of the diameters of the zones of microbial growth inhibition, the antimicrobial effects of the $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pastes could be ranked from the strongest to weakest according to the vehicle group, as follows: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + CMCP + glycerine, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + CMCP, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Glycerine, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + anaesthetic, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + saline, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + H_2O , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + polyethyleneglycol. The pastes with CMCP in formulation showed significantly larger mean zones of inhibition (8.42mm) when compared with the ones with aqueous (0.25 mm) or viscous vehicles (0.27 mm) ($p < 0.05$) (Figure 1).

The aqueous and viscous vehicles such as water, saline, anaesthetic, glycerine and polyethyleneglycol had no antimicrobial action by direct contact. On the other hand, the CMCP and CMCP plus glycerine showed average of inhibition zones of microbial growth of 6.19 mm and 8.75 mm respectively (Table 2).

The susceptibility of individual microorganism to the calcium hydroxide

pastes was varied. All microorganisms were more susceptible to calcium hydroxide prepared with CMCP. *E. faecalis* was the most resistant (3.95 mm), followed by *B. subtilis* (5.15 mm) and *A. naeslundii* M104 (5.6 mm), while the anaerobic *P. endodontalis* (15.6 mm), followed by *Porphyromonas gingivalis* (13.75 mm) and *Prevotella intermedia/nigrescens* (12 mm), was more susceptible to pastes with CMCP. However, *B. subtilis* and *C. albicans* showed some susceptibility to all calcium hydroxide pastes (Figure 2).

Table 6.3.1. Mean area of the zones of microbial growth inhibition (in mm) provided by calcium hydroxide associated with several vehicles (zero means inhibition by direct contact)

Ca(OH) ₂ +	<i>C.a</i>	<i>B. s.</i>	<i>S.a.</i>	<i>E. f.</i>	<i>S.sa.</i>	<i>S. s.</i>	<i>S.m.</i>	<i>A.n.</i>	<i>P.g.</i>	<i>P.e</i>	<i>P.i/P.n.</i>	<i>P. d.</i>
sterile water	2.3	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Saline	2.6	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anaesthetic solution	2.6	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glycerine	2.8	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Polyethyleneglycol	1.7	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CMCP	3.5	3.8	4.7	0.7	20.5	1.5	1.5	2.5	5.5	6.2	5.0	5.0
CMCP + glycerine	11.3	6.5	11.7	7.2	12.0	10.2	11.3	8.7	22.0	25.0	19.0	15.6

C. a.: *C.albicans*; *B. s.*: *B. subtilis*; *S. a.*: *S. aureus*; *E. f.*: *E. faecalis*; *S. sa.*: *S.sanguis*; *S. s.*: *S. sobrinus*; *S. m.*: *S. mutans*; *A.n.*: *A.naeslundii*; *P.g.*: *P.gingivalis*; *P.e*: *P. endodontalis*; *P.i/P.n.*: *P. intermedia/ nigrescens*; *P. d.*: *P. denticola*

Table 6.3.2. Mean area of the zones of microbial growth inhibition (in mm) provided by the substances used to manipulate the calcium hydroxide pastes.

Ca(OH) ₂ +	<i>C.a.</i>	<i>B. s.</i>	<i>S.a.</i>	<i>E. f.</i>	<i>S.sa.</i>	<i>S. s.</i>	<i>S.m.</i>	<i>A.n.</i>	<i>P.g.</i>	<i>P.e</i>	<i>P.i/P.n.</i>	<i>P. d.</i>
sterile water	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Saline	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
anaesthetic solution	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Glycerine	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
polyethyleneglycol	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CMCP	4.0	3.0	5.3	3.0	6.0	6.0	2.5	5.0	11.0	12.5	10.0	6.0
CMCP+ glycerine	4.5	3.5	7.0	5.0	13.5	13.5	5.0	5.0	13.0	15.0	12.0	8.0

* Without inhibition in direct contact

C. a.: *C.albicans*; *B. s.*: *B. subtilis*; *S. a.*: *S. aureus*; *E. f.*: *E. faecalis*; *S. sa.*: *S.sanguis*; *S. s.*: *S. sobrinus*; *S. m.*: *S. mutans*; *A.n.*: *A.naeslundii*; *P.g.*: *P.gingivalis*; *P.e.*: *P. endodontalis*; *P.i/ n.*: *P. intermedia/ nigrescens*; *P. d.*: *P. denticola*.

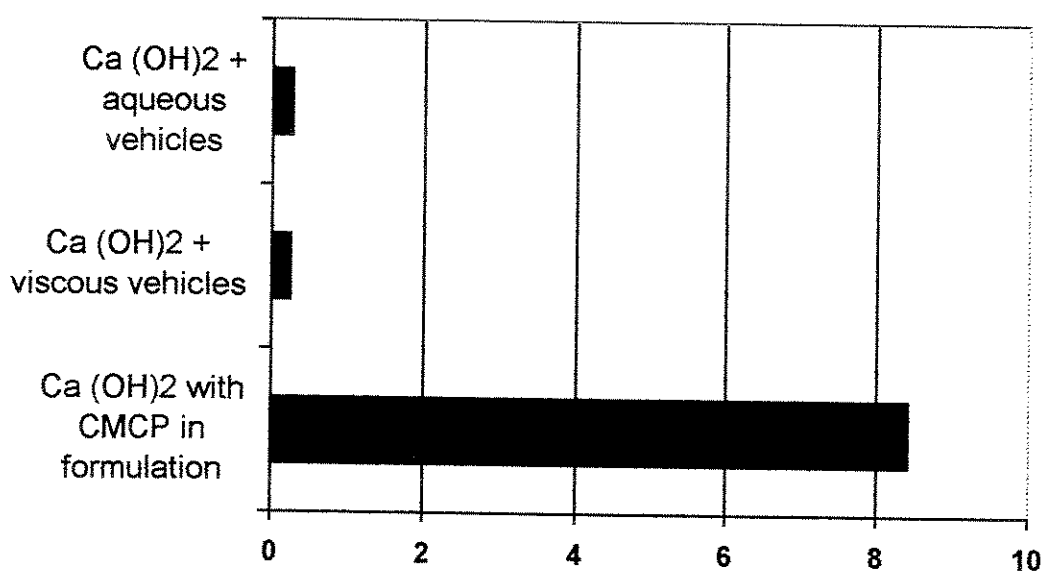


Figure 6.3.1. Average values of growth inhibition zones (in mm) by different formulations of Ca(OH)₂ paste against all microorganisms tested.

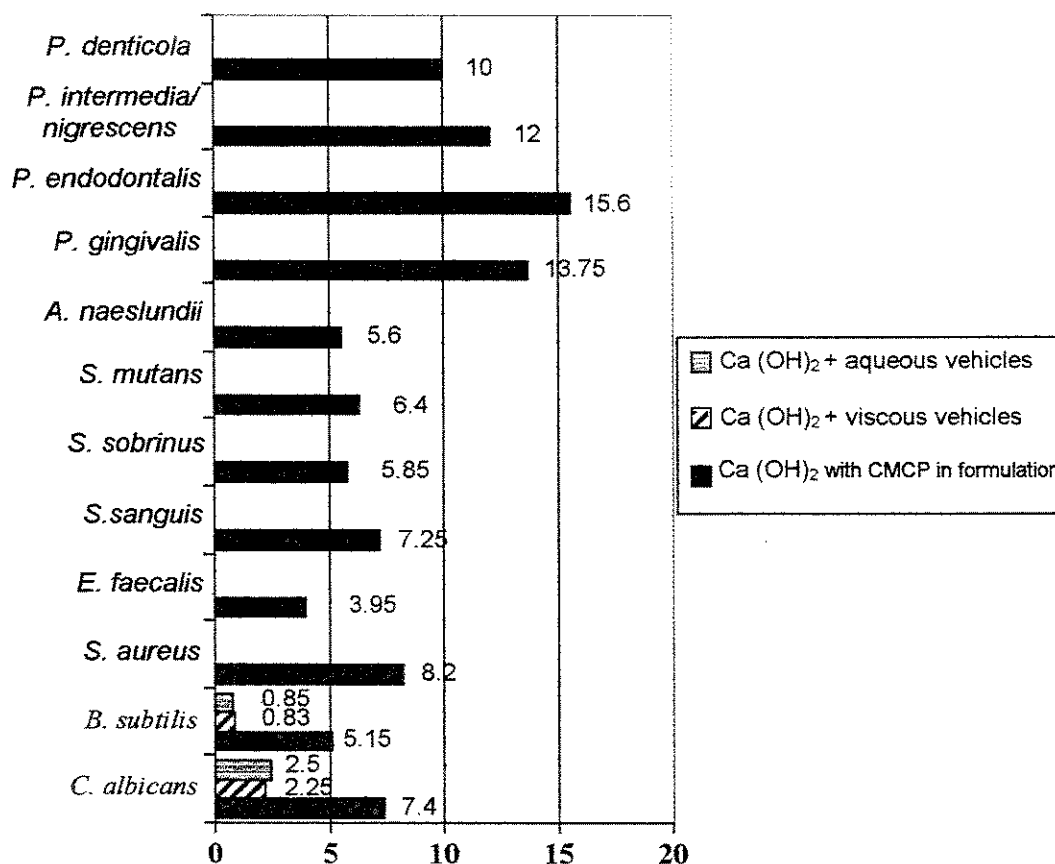


Figure 6.3.2. Average values of growth inhibition zones (in mm) by Ca(OH)₂ paste in combination with several vehicles against all microorganisms tested.

Discussion

Common clinical scenarios as exudation, haemorrhage, perforation, root resorption, trauma or incomplete root formation may indicate the use of intracanal medicaments. In these situations it is beneficial to clean and shape the canals and place the Ca(OH)₂ paste densely into the full length of the canal, in order to increase the efficacy of the antimicrobial effect (8).

The calcium hydroxide antimicrobial action is mainly related to the alkaline pH (OH^- ions). The change of dentinal pH caused by hydroxyl ions is slow and depends on several factors that can alter the rate of ionic dissociation and diffusion, such as the level of hydrosolubility of the vehicle employed, difference in viscosity, acid-base characteristics, dentinal permeability, and level of existing calcification (14). The lethal effects of hydroxyl ions on bacterial cells are probably due to the damage to the bacterial cytoplasmatic membrane, protein denaturation, and damage to the DNA (11). The time needed for calcium hydroxide to optimally disinfect the root canal system is still unknown and might be related to the type of microorganism involved, location of the microorganism in the root canal system, presence or absence of the smear layer and presence or absence of root canal exudation.

Moreover, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ should ideally be placed so that it occupies the apical regions in sufficient quantities to permit its biological effect to be exerted in close proximity to the appropriate tissues. In many clinical situations the correct placement of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ paste into the root canal system may be hindered due to anatomical irregularities. In most cases, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ should be combined with a liquid acting as a carrier mechanism since some researchers have found that techniques that deliver dry calcium hydroxide powder alone are difficult or impossible to use in smaller, curved canals (15). In general dental practice, sterile water or saline are among the most commonly used carrier agents and are also effective in delivering hydroxyl ions (8).

According to Fava and Saunders (10) the vehicles plays a most important role in the biological action of calcium hydroxide, which is determined by the velocity of ionic dissociation in Ca^{++} and OH^- ions. The aqueous vehicles are represented in this work by sterile water, sterile saline and anaesthetic solutions, although this category also includes Ringer's solution, methylcellulose and carboxymethylcellulose, and anionic detergent solutions such as sodium lauryl diethylenoglycol or sodium lauryl sulphate. Generally aqueous solutions promote a rapid ion liberation and should be used in clinical situations involving intense exudate, and dental replantation, among others, being the best vehicle for $\text{Ca}(\text{OH})_2$ powder (8). Although acidic, with a pH ranging from 4 to 5, local anaesthetics provide an adequate mixing agent, as the calcium hydroxide is a very strong base minimally affected by the acid (16).

Viscous vehicles (glycerine, polyethyleneglycol, propyleneglycol) are also water-soluble substances that release Ca^{++} and OH^- ions more slowly for extended periods. It should be used for redressing, because the paste may remain in the root canal for a longer period. Several investigators have claimed that calcium hydroxide pastes containing viscous vehicles such as glycerine incorporate more $\text{Ca}(\text{OH})_2$ than aqueous vehicles in order to achieve a toothpaste consistency, and their delivery into canals with a Lentulo spiral is a superior method of placement for length and density (15). Pastes containing oily vehicles (olive oil, camphor, metacresylacetate, eugenol) have restricted application, and their use has been reported in those clinical situations that require a very slow ion dissociation, for example, a permanent root filling for perforation defects after internal resorption (10). Although the slow ion dissociation

promoted by the camphorated parachlorophenol, it is a substance with strong antimicrobial activity, being considered a therapeutic adjuvant and not a vehicle.

In the present study all calcium hydroxide pastes mixed with inert vehicles had antimicrobial action, but just by direct contact, in agreement with previous studies (17). Other studies have also reported the failure of calcium hydroxide to eliminate enterococci effectively (6,2) as they tolerate very high pH values, varying from 9 to 11. In the present study, *Enterococcus faecalis* was the microorganism showing the smallest inhibition zone against all tested intracanal medications, while strict anaerobes such as *Porphyromonas endodontalis*, *P. gingivalis* and *Prevotella intermedia/nigrescens* showed the largest inhibition zones.

Pastes prepared with aqueous vehicles had a lower antimicrobial action. Glycerine (a viscous vehicle) mixed with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ produced larger zones of microbial growth inhibition compared to the aqueous vehicles. On the other hand, polyethyleneglycol (also a viscous vehicle) showed the weakest antimicrobial action, confirming a previous study (18). The *in vitro* ineffectiveness of calcium hydroxide mixed with inert vehicles may be related to the fact that culture media possess buffer substances in their formulations and due to the vehicle diffusion ability. Therefore, although calcium hydroxide could have diffused across the medium, the pH levels reached were not sufficient to present inhibitory activity (11).

Some *in vivo* studies have indicated that killing of microbes in the canal can be achieved more reliably with calcium hydroxide paste mixed with aqueous vehicle than with other medicaments tested (6). It may be explained by the filling ability of these pastes, which may be more relevant in preventing recontamination than the chemical

effect. Because calcium hydroxide has low water solubility, it is slowly dissolved in saliva, thus remaining in the canal for a long period of time and delaying the bacterial progression toward the apical foramen. The present study has showed that Ca(OH)_2 pastes kill bacteria by direct contact, that means that the remaining microorganisms in contact with this medication in the root canal will be eradicated if they were not tolerant to this medication .

As verified in the present study, using the diffusion agar method, the superior *in vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide associated with camphorated paramonochlorophenol (CMCP) has long been recognised. The addition of glycerine to Frank's paste seems to enhance its antimicrobial action since glycerine helps the diffusibility of Ca(OH)_2 + CMCP (17), what was also observed in the present study.

In conclusion, even though calcium hydroxide is widely used as intracanal medication for the treatment of apical periodontitis, it cannot be considered as a universal intracanal medicament, since it is not equally effective against all bacteria found in the root canal. The association of calcium hydroxide to CMCP aiming to improve its antimicrobial property should be avoided, as this vehicle can be irritating to periapical tissues (8). Another medication or association, such as 2% chlorhexidine gel should be considered, which is biocompatible with periapical tissues, has a wide spectrum of antimicrobial activity with prolonged action and diffuses through the dentinal tubules (12,19).

The first step in a study of the effectiveness of intracanal medicaments is the laboratory test. *In vitro* research to determine the antimicrobial activity

depends on the sensitivity of the drug, bacterial source (wild strains or collection species), the number of bacteria inoculated, pH of the substrates in plates or tubes, agar viscosity, storage conditions of the agar plates, incubation time and the metabolic activity of the microorganisms. On the other hand, the duration of effectiveness of the drug, temperature, contamination and possible leakage of the agent into the mouth must be considered while working *in vivo* (20).

The present study confirmed some published data on the *in vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide associated with several vehicles (9, 14, 17) and also provided new data on the susceptibility of endodontic related microorganisms to the intracanal medicaments tested.

On the basis of the results obtained and of the experimental conditions used in this study, we conclude that the type of vehicle utilised affects the diffusion ability and the antimicrobial activity of calcium hydroxide. However, *in vitro* results must be analysed carefully before its extrapolation to the clinical conditions. Research is in progress to evaluate the antibacterial effectiveness of these pastes as intracanal medications using other *in vitro* tests and also *in vivo* models.

Resumo

Atividade antimicrobiana *in vitro* das pastas de hidróxido de cálcio e seus veículos sobre microrganismos específicos

O objetivo deste trabalho foi investigar *in vitro* a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio em combinação com vários veículos contra alguns microrganismos freqüentemente isolados dos canais radiculares. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão no ágar. Cilindros de aço inoxidável foram colocados sobre as placas de ágar já inoculadas, dentro dos quais os medicamentos testados e seus controles foram introduzidos. As zonas de inibição do crescimento microbiano foram medidas e anotadas após o período de incubação de cada placa e os resultados foram analisados estatisticamente. A atividade antimicrobiana *in vitro* dos medicamentos testados, em ordem decrescente, foi: Ca(OH)_2 + PMCF + glicerina, Ca(OH)_2 + PMCF, Ca(OH)_2 + glicerina, Ca(OH)_2 + anestésico, Ca(OH)_2 + salina, Ca(OH)_2 + H_2O , Ca(OH)_2 + polietilenoglicol. Pastas com veículos oleosos produziram as maiores zonas de inibição, quando comparadas com as com veículos aquosos ou viscosos. Concluímos que a habilidade de difusão e a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio estão relacionadas com os tipos de veículos utilizados.

UNITERMOS: medicação intracanal, hidróxido de cálcio, microrganismos

References

1. Biffi JC, Rodrigues HH: Ultrasound in endodontics: a quantitative and histological assessment using human teeth. *Endod Dental Traumatol* 1989; 5: 55-62.
2. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB: Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J* 1996; 29:235-241.
3. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD: Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J* , 1994; 27: 291-298.
4. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB: Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent* 1996; 29: 47-55.
5. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T: Microbiological status of root-filled teeth with periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31: 1-7.
6. Byström A, Claesson R, Sundqvist G: The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dental Traumatol* 1985; 1: 170-175.
7. Nerwich A, Figdor D, Messer HH: pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide *J Endod* 1993; 19: 302-306.
8. Spangberg LSW: Intracanal medication. In: *Endodontics*. Ingle JI, Bakland L. eds. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. Pp 627-640.

- 9 .Estrela C, Pécora JD, Souza-Neto MD, Estrela CR, Baumann LL: Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide. *Braz Dent J* 1999; 10: 63-72.
10. Fava LRG, Saunders WP: Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J* 1999; 32: 267-282.
11. Siqueira JF Jr, Lopes HP: Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999; 32: 361-369.
12. Siqueira JF Jr, Uzeda M: Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod* 1997; 23: 167-169.
13. Mickel AK, Wright R: Growth inhibition of *Streptococcus anginosus* (milleri) by three calcium hydroxide sealers and one zinc oxide-eugenol sealer. *J Endod* 1999; 25: 34-37.
14. Estrela C, Pimenta FC, Ito II, Baumann LL: In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. *J Endod* 1998; 24: 15-17.
15. Rivera EM, Williams K: Placement of calcium hydroxide in simulated canals: comparison of glycerin versus water. *J Endod* 1994; 20: 445-448.
16. Statmos DG, Haasch GG, Gerstein H: The pH of local anesthetic/calcium hydroxide solutions. *J Endod* 1985; 11: 264.-265.
17. Siqueira JF Jr, Uzeda M: Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *J Endod* 1998; 6: 63-65.

18. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ, Rosalen PL, Lilley JD: Susceptibility of selected microorganisms to intracanal medicaments. *Int Endod J* 2000; 33: 72. (abstr).
19. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ: In vitro assessment of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod* 2001, 27:452-455.
20. Weiss EI, Shalhav M, Fuzz Z: Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact. *Endod Dent Traumatol* 1986; 12: 179-184.

6.4. CAPÍTULO 4

***In vitro* evaluation of the susceptibility of some endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with several vehicles.**

Morgana Eli Vianna

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Neylla Teixeira Senna

Alexandre Augusto Zaia

Caio Cezar Randi Ferraz

Francisco José de Souza-Filho

Keywords: intracanal medication, calcium hydroxide, bacteria

Enviado para o *International Endodontic Journal*

Abstract

Aim The aim of this study was to investigate the contact time and susceptibility of some microorganisms commonly isolated from root canals to calcium hydroxide combined with several vehicles by the direct contact method.

Methodology A broth dilution test was performed. The calcium hydroxide combined with: i) sterile water, ii) glycerine, iii) camphored monochlorophenol (CMCP) + glycerine, iv) polyethyleneglycol, and v) CMCP + polyethyleneglycol. The microbial suspensions were mixed with the pastes and left to stand different periods of time, viz. For 15 s, 30 s; for 1, 3, 5, 10, 15 and 30 min; for 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 and 48 h; and for 7 days. After each period of time, 1 mL from each well was transferred to tubes containing broth medium plus calcium hydroxide neutralisers, which were left at 37°C for 7 days. 10 µL of each tube was inoculated in agar plates for investigation of possible microbial growth. The timing for each medicament to produce total microbial growth was recorded and statistically analysed.

Results The timing for pastes to eliminate the aerobic and facultative anaerobic microorganisms ranged from 6 to 24 hours, and strict anaerobic microorganisms were inhibited from 30 seconds to 5 minutes. The microbial susceptibility could be ranked from the strongest to the weakest as follows: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Porphyromonas endodontalis* and *Prevotella intermedia* (in the same level).

Conclusions The timing for pastes to eliminate the endodontic pathogens depends on paste formulation.

Introduction

Control and elimination of endodontic infections are achieved by the combined action of several hosts and treatment factors. The spreading of the infection is limited by the host's defence system or systemic antibiotic therapy. Chemomechanical preparation and local medicaments kill microorganisms in root canal system (Haapasalo *et al.* 2000).

Although irrigating solutions with strong antimicrobial activity decrease the number of microorganisms during the instrumentation, it has been shown that a small part of the microorganisms may still survive (Byström & Sundqvist 1981, 1983, Gomes *et al.* 1996). Moreover, the complex anatomy of root canals provides opportunity and a good environment for growth, multiplication of these microorganisms (Biffi & Rodrigues 1989, Gomes *et al.* *in press*). Then when it is necessary more than one clinical visit, it is beneficial to clean and shape the canals and place the $\text{Ca}(\text{OH})_2$ paste densely into the full length of the canal, in order to avoid microbial growth (Spangberg 1994).

Calcium hydroxide is considered to possess many of the properties of an ideal root canal dressing (Beltes *et al.* 1997). It acts as a physical barrier, also preventing root canal re-infection and interrupting the nutrient supply to the remaining bacteria (Siqueira & Lopes 1999). Calcium hydroxide also activates the hydrolytic enzyme alkaline phosphatase, which is closely related to the process of tissue mineralization (Seltzer & Bender, 1979). Its high pH promotes the antimicrobial properties, which is related to the release of hydroxyl ions in aqueous environment.

However, ideal timing is required for effective destruction of microorganisms, acting in direct or indirect contact in dentinal tubules (Estrela *et al.* 1998). The hydroxyl ions probably cause damage to the bacterial cytoplasmic membrane, in protein denaturation, and DNA of bacterial cells. (Siqueira & Lopes, 1999). The calcium hydroxide can absorb carbon dioxide in the root canal (Kontakotis *et al.*, 1995), and thus some CO₂ – dependent bacteria will not survive in this environment. Therefore, the use of an intracanal medication will disturb established nutritional interrelationships, eliminating some bacteria that might be essential to the growth of others or leaving some bacteria whose presence will prevent the growth of others (Gomes *et al.*, *in press*).

Recent studies have reviewed the classification and clinical indications of various formulations of calcium hydroxide (Fava & Saunders 1999) and their mechanisms of antimicrobial activity (Siqueira & Lopes 1999), clearly indicating that even though this medication has been used for more than 80 years, there are still many questions to be answered regarding its antimicrobial action.

The purpose of this study was to evaluate *in vitro* the susceptibility of some microorganisms commonly isolated from root canals, and the time required for them to be eliminated by calcium hydroxide combined with several vehicles using the direct contact method.

Materials and Methods

The methodology was adapted from Gomes *et al.* (2001).

The species of microorganisms used in this experiment were *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Candida albicans* NTCC 3736, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, grown on Brain Heart Infusion (BHI, Lab M, Bury, UK) and *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* and *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens*, grown on Fastidious Anaerobe Agar (FAA, Lab M, Bury, UK), both added 5% sheep blood. All microorganisms were previously subcultured onto appropriate culture media and gaseous conditions for 48 h. Aerobes and facultative strains were individually inoculated into tubes containing 5mL Brain Heart Infusion (BHI, Lab M, Bury, UK) sterile suspension, which were adjusted spectrophotometrically at 800 nm - O.D.₈₀₀ to match the turbidity of $1.5 \times 10^8 \text{ cfu mL}^{-1}$ (equivalent to 0.5 McFarland standard). Strict anaerobic microorganisms were individually inoculated into tubes containing 5mL of Fastidious Anaerobe Broth (FAB, Lab M, Bury, UK) sterile suspension, which were suspended spectrophotometrically at 800 nm - O.D.₈₀₀ to match the turbidity of $3.0 \times 10^8 \text{ cfu mL}^{-1}$ (equivalent to 1 McFarland standard), according to Koo *et al.* (1998).

The microbial strain were evaluated against calcium hydroxide pastes prepared using calcium hydroxide powder (Labsynth, Produtos para laboratórios Ltda, São Paulo Brasil) mixed with:

1. sterile water

2. glycerine (Chemco, Indústria e comércio Ltda, Campinas ,SP, Brazil)
3. polyethyleneglycol (proprietary brand: Calen™, S.S. White Artigos Dentários, Rio de Janeiro, Brazil);
4. camphorated monochlorophenol plus glycerine - Frank's paste (CMCP – Biodinâmica, Química e Farmacêutica Ltda., Ibiporã, PR, Brazil; Glicerine – Chenco, Industria e Comércio Ltda. Campinas, SP, Brazil)
5. polyethyleneglycol plus camphorated monochlorophenol (proprietary brand: Calen PMCC™, S.S. White Artigos Dentários, Rio de Janeiro, Brazil).

The pastes were mixed to be similar to toothpaste, using the ratio of 9 parts of powder for 7 parts of liquid, as the ones used by Gomes *et al* (2002). Calen™ and Calen PMCC™ are the proprietary brand of Leonardo and Leal's paste, with the following formulation: calcium hydroxide (2.5g), zinc oxide (0.5 g), hydrogenizedcolophony (0.05 g) and polyethyleneglycol 400 (12.75) (Fava & Sauders, 1999).

Sterile water, physiologic solution of 0.89% sterile saline, glycerine, polyethyleneglycol, CMCP, CMCP plus polyethyleneglycol, CMCP plus Glycerine were used as controls.

Six wells were used for each time period, microorganism, and calcium hydroxide paste respectively. Overall, 6912 wells were used, comprising 2880 for all the tested pastes, and 4032 for control groups (576 for each medicament or each control group).

One mL of each medicament was placed at the bottom of 24-well cell culture plates (Corning, NY, USA, ref. No. 3524, well Vol. 3,2 mL), including the control groups. Two mL of the microbial suspension were ultrasonically mixed for 10 s with the $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pastes and left to stand different periods of time, viz. for 15 s, 30 s; for 1,3 ,5 ,10 ,15 and 30 min; for 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 and 48 h; and for 7 days. After each period of time, 1 mL from each well was transferred to tubes containing 3 mL of freshly broth medium to which 0.5% citric acid was added in order to avoid a carrier over effect of the $\text{Ca}(\text{OH})_2$. All tubes were left at 37°C for 7 days in appropriate gaseous condition. 10 μL of each tube was inoculated on agar plates and left at 24-48 h in appropriate gaseous condition. The purity of the positive cultures was confirmed by Gram staining, by colony morphology on blood agar plates and by the use of biochemical identification kits (API 20 Strep BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France; API C AUX BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France; API 20 Staph BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France; Rapid ANA II System, Remel INC., Lenexa, KS). The time required for each medicament to produce total microbial inhibition growth was recorded, transformed in seconds, and analysed statistically using Kruskal-Wallis test, with significance level set at $p < 0.05$.

Results

Samples adherence and normality were tested using GMC program (USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil), demonstrating that the data were non-parametric. Then the samples were compared using Kruskal-Wallis test (Biostat program, CNPQ, 2000, Brazil), with significance level at $p < 0.05$. The data were retransformed in seconds, minutes and hours in order to make the comparisons of results easier. The letters in tables show different values (statistically speaking). The capital letter shows the differences in the same the line and the lower case in the same column.

Table 1 shows the contact time required for calcium hydroxide combined with several vehicles to produce negative cultures (i.e.: 100% inhibition of growth) against the tested microorganisms.

All calcium hydroxide pastes were able to eliminate *Porphyromonas endodontalis* and *Prevotella intermedia/nigrescens* in 30 s, without statistics differences between thr tested pastes. *Porphyromonas gingivalis* was a little more resistant, being killed between 30 s and 5 min.

Pastes associated with camphorated monochlorophenol (CMCP) plus glycerine showed the shortest time to eliminate *Candida albicans*, taking on average 6 h.

Calcium hydroxide pastes combined with CMCP plus glicerine exhibited the best performance to eliminate *E. faecalis*, spending 12 h to produce negative cultures, while the other tested pastes needed 24h.

The pastes that used viscous vehicles, such as glycerine and polyethyleneglycol, showed the same performance against *Staphylococcus aureus*, needing 12 h, while the others spent a slightly shorter length time (8 h).

As a whole, pastes made with CMCP took less time to kill the tested microorganisms than the ones prepared with viscous (glycerine and polyethyleneglycol) and aqueous vehicles (sterile water).

Gram -positive aerobic and facultative anaerobic microorganisms were more resistant to calcium hydroxide pastes, and the necessary time for their elimination ranged from 6 to 24 h. On the other hand, Gram-negative strict anaerobic microorganisms were eliminated in 5 minutes or less.

The microorganisms susceptibility could be ranked from the weakest to the strongest as follows: *Porphyromonas endodontalis* and *Prevotella intermedia/nigrescens* (both showing the same susceptibility), *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*.

Table 2 shows the contact time required for the control groups (vehicles) to produce negative cultures against all tested microorganisms. Sterile water, saline solution, glycerine and polyethyleneglycol were inert, allowing free microbial growth in the medium. CMCP+glycerine and CMCP+polyethyleneglycol were effective against all tested microorganisms, needing only 30 s to kill all of them.

Table 6.4.1. The contact time required by several calcium hydroxides combined with several vehicles to produce negative cultures (i.e.: 100% inhibition growth) against the tested microorganisms.

Microorganisms	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
Ca(OH) ₂ +						
Sterile water	6 — 8 h b A	12 — 24 h a A	12 — 24 h a A	30 s a B	30 s c B	30 s a B
Glycerin	8 — 12 h a AB	12 — 24 h a A	12 — 24 h a A	30 s a C	3 — 5 min a BC	30 s a C
CMCP + Glycerin	6 — 8 h b AB	8 — 12 h b A	4 — 6 h b BC	30 s a D	30 s — 1 min bc CD	30 s a D
CMCP + polyethyleneglycol	6 — 8 h b AB	12 — 24 h a A	6 — 8 h b AB	30 s a C	3 — 3 min ab BC	30 s a C
polyethyleneglycol	8 — 12 h a AB	12 — 24 h a A	12 — 24 h a A	30 s a C	5 min a BC	30 s a C

s: second

min: minute

h: hour

Different letters (from a to c, and A to D) mean different values

Capital letter shows the line statistical analysis (Kruskal-Wallis p<0.05)

Lower case shows the column statistical analysis (Kruskal-Wallis p<0.05)

Table 6.4.2. The contact time required by the control groups to produce negative cultures (i.e.: 100% inhibition growth) against all tested microorganisms.

Microorganisms	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
Controls						
Sterile water	-	-	-	-	-	-
0.85% saline solution	-	-	-	-	-	-
Glycerin						
CMCP + Glycerin	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s
polyethyleneglycol	-	-	-	-	-	-
CMCP + polyethyleneglycol	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s
CMCP	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s	30 s

s: second

Discussion

The type of vehicle used to prepare calcium hydroxide pastes has a direct relationship with the concentration and the speed of ionic liberation as well as with the antimicrobial effect. Differences in the velocity of ionic dissociation are directly related to these vehicles. Furthermore, it is important to consider that viscosity is a measurement of the inner friction of a fluid, so that a solution flows easily when it has low viscosity. Paste is considered chemically to be a colloid (a solid dispersed into a liquid). Therefore, the kind of vehicle used may facilitate or inhibit the ionic dispersion from the paste. The lower the viscosity, the higher the ionic dissociation (Fava & Saunders, 1999).

Calcium hydroxide has been associated with several substances, such as saline solution, camphored monochlorophenol, Otosporin™ (hydrocortisone, neomycin polymyxin B), chlorhexidine, sodium lauryl sulfate, among others (Estrela *et al.* 2001). Vehicles commonly used are aqueous, viscous or oily.

Aqueous vehicle rapidly dissociates calcium hydroxide in Ca^{++} and OH^- , promoting a high degree of solubility when in contact with tissue and fluids, being easily reabsorbed by macrophages. Some viscous vehicles are also water soluble, but more slowly, probably because of their molecular weight. Oily vehicles are non-water-soluble substances that promote the lowest solubility and diffusion of the paste within the tissues (Fava & Saunders 1999).

The pastes made with the vehicles (sterile water, glycerine, polyethyleneglycol) and the therapeutic adjuvant (CMCP) used in the present study were effective against all tested microorganisms, though this action happened in different timings. Pastes manipulated with glycerine and propyleneglycol (the proprietary brand: Calen™) needed more time to eliminate all microorganisms than the others tested pastes, agreeing with the findings of Safavi *et al.* (2000). They reported that high concentrations of glycerine and propyleneglycol used as vehicles might decrease the effectiveness of calcium hydroxide, making slowly the delivery of hydroxyl ions.

The pastes with CMCP in formulation showed the best antimicrobial action, especially due to its strong antimicrobial properties. The camphor, which is in CMCP formulation is considered an essential oil with low solubility in water, allowing a slow release of calcium hydroxide paste ions (Fava & Saunders, 1999).

Siqueira & Uzeda (1998) had used a similar methodology and reported the superior *in vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide associated with CMCP and glycerine. Gomes *et al.* (in press) also advocated this fact, even though they had used another methodology. Our results showed that CMCP is an effective antimicrobial agent, killing the microorganisms in less than 1 min. However it has cytotoxic action when in contact with periapical tissues (Holland *et al.* 1999, Chang *et al.* 1999). Moreover, Block *et al.* (1981) verified that the CMCP altered dog pulp tissue and rendered it antigenically active, and a specific humoral response was produced. The association of Ca(OH)_2 plus CMCP also was evaluated, showing the worst inflammatory response (Fujii & Machida, 1991).

The microorganisms used in our work were those most associated with endodontic symptomatology, such as the Gram-negative anaerobes, and the ones associated with endodontic failures, such as *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* (Gomes *et al.* 1996). Our results agree with the clinical findings, regarding the great resistance of the Gram-positive microorganisms to the endodontic procedures, especially to the calcium hydroxide-based intracanal medicaments.

The time required for calcium hydroxide pastes to inhibit the microorganisms commonly isolated from the root canal system was established in the present research. However, it is necessary to remember that this is an *in vitro* study and the necessary time to produce the same result *in vivo* might be related to the presence or absence of root canal exudation, the type of microorganisms involved, the location of the microorganisms in the root canal system, and the presence or absence of smear layer (Gomes *et al. in press*).

Another important fact is that the dentin may interfere in the effectiveness of calcium hydroxide (Haapasalo *et al.* 2000; Han *et al.*, 2001). The hydroxyl ions must diffuse into dentin and promote levels higher than the strong buffering capacity of dentine to be lethal to bacteria. Moreover, the dentinal tubules can act as a reservoir for bacteria that can result in re-infection (Behnen *et al.* 2001).

The majority of the works on calcium hydroxide antimicrobial activity used the agar diffusion method, which only indicate the medicaments' potential to eliminate the bacteria in the local environment of the root canal system (Gomes *et al. in press*), but not their action timing. The method used in present research is the direct contact test, which relies on direct and close contact between the test

microorganism and the tested material (Weiss *et al.* 1996). According to Estrela *et al.* (1999) such a method is more precise to analyse medications than the agar diffusion. In the latter, the medicaments dissociate and diffuse differently through the media. Strictly speaking, the direct contact test method, which uses a liquid culture medium, allows all medicaments to have the similar diffusion conditions.

In the present study, *in vitro*, all tested calcium hydroxide pastes showed antimicrobial action. However, it cannot be forgotten that, *in vivo*, the success of such medicament depends on the presence or absence of the smear layer, the buffering effect of the dentine, the type and location of the microorganism involved, and finally on their direct contact with the medicament, so that it can exert the antimicrobial action.

Conclusion

Under the experimental conditions of this study it is possible to conclude that the timing for calcium hydroxide pastes eliminate the endodontic pathogens depend on the paste formulation. The strict anaerobic microorganisms were the most susceptible microorganisms and the facultative anaerobic microorganism was the most resistant.

Acknowledgements

This work was supported by Brazilian grants from FAPESP (n 2000/ 13.689-7), CNPq (520277/99-6) and CAPES.

References

1. Beltes P.G., Pissiotis E., Kortsaris A.H. (1997). *In vitro* release of hydroxyl ions from six types of calcium hydroxide nonsetting pastes. *Journal of Endodontics*. **23**; 413-5.
2. Biffi J.C., Rodrigues H.H. (1989). Ultrasound in endodontic: a quantitative and histological assessment using human teeth. *Endodontics and Dental Traumatology*. **5**:55-62.
3. Block R.M., Lewis R.D., Sheats J.B., Burke S.H. (1981) Antibody formation to dog pulp tissue altered by camphor paramonochlorphenol via the root canal. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. **51**: 637-42
4. Byström A. & Sundqvist G. (1981) Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Escandinavia Jouranal Dental Research*. **89**:321-8.
5. Byström A. & Sundqvist G. (1983). Bacteriologic evaluation of the effect of 0,5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. **55**; 307-12.
6. Chang Y.C., Tai K.W., Chou L.S., Chou M.Y. (1999) Effects of camphored parachlorophenol on human periodontal ligament cells *in vitro*. **25**: 779-81.
7. Estrela C., Pimenta F.C., Ito I.Y., Bammann L.L. (1998). *In vitro* determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. *Journal of Endodontics*. **24**; 15-7.

8. Estrela C., Pimenta F.C., Ito I.Y., Bammann L.L. (1999). Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *Journal of Endodontics*. **25**; 416-8.
9. Estrela C., Bammann L.L., Pimenta F.C., Pécora J.D. (2001). Control of microorganisms *in vitro* by calcium hydroxide pastes. *International Endodontic Journal*. **34**; 341-345.
10. Fava L.R. & Saunders W.P. (1999). Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *International Endodontic Journal*. **32**; 257-82.
11. Fujii H., Machida Y. (1991) Histological study of therapy for infected nonvital permanent teeth with incompletely formed apices. *Bull Tokio Dental College*. **32**: 35-45.
12. Gomes P.B.F.A., Lilley J.D., Drucker D.B. (1996). Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *International Endodontic Journal*. **29**; 235-41.
13. Gomes P.B.F.A., Carvalho S.S., Ferraz C.C.R., Teixeira F.B., Souza-Filho F.J. *In vitro* antibacterial activity of chlorhexidine gel and calcium hydroxide separately and combined on infected bovine root dentin. *International Endodontic Journal (in press)*.
14. Gomes P.B.F.A., Ferraz C.C.R., Garrido F.D., Rosalen P.L., Teixeira F.B., Souza-Filho F.J. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *Journal of Endodontics (in press)*.

15. Gomes P.B.F.A., Ferraz C.C.R., Vianna M.E. *et al.* (2002) *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. *Brazilian Dental Journal*. **13**; 155-61.
16. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB & Souza-Filho FJ. (2001) *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontics Journal*. **34**: 424-8.
17. Haapasalo H.K., Siren E.K., Waltimo T.M., Orstavik D., Haapasalo M.P. (2000). Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an *in vitro* study. *International Endodontic Journal*. **33**; 126-31.
18. Holland R., Souza V., Nery M.J., Otoboni Filho J.Á., Bernabe P.F.E.(1999). Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *Journal of Endodontics*. **25**; 161-166.
19. Kontakiotis E., Nakou M., Georgopoulou M. (1995). *In vitro* study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *International Endodontic Journal*. **28**; 285-9.
20. Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JÁ. (1999) *In vitro* antimicrobial activity of propolis and arnica montana against oral pathogens. *Archives of Oral Biology*. **45**; 141-8.
21. Safavi K. & Nakayama T.A. (2000). Influence of mixing vehicle on dissociation of calcium hydroxide in solution. *Journal of Endodontics*. **26**; 649-651.
22. Seltzer S. & Bender I.B. (1979). A polpa dental. 2nd ed. Labor, Rio de Janeiro.

23. Siqueira J.F. Jr & de Uzeda M. (1998). Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *Journal of Endodontics*. **24**; 663-665.
24. Siqueira J.F. Jr & Lopes H.P. (1999). Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *International Endodontic Journal*. **32**; 361-369.
25. Spangberg L.S.W. (1994). Intracanal medication. In: Ingle JI and Bakland LK, eds. *Endodontics*. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins.p.627-40.
26. Weis E.I., Shalhav M., Fuss Z. (1996). Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endodontics and Traumatology*. **12**; 179-84.

6.5. CAPÍTULO 5

***In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine gel, calcium hydroxide paste and both intracanal medicaments combined.**

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Morgana Eli Vianna

Neylla Teixeira Sena

Alexandre Augusto Zaia

Caio Cezar Randi Ferraz

Francisco José de Souza-Filho

Key words: calcium hydroxide, chlorhexidine, intracanal medicament

Enviado para o *International Endodontic Journal*

Abstract

Aim: The aim of this study was to investigate the antimicrobial activity of calcium hydroxide paste, 2% chlorhexidine gluconate gel and of these medicaments combined against endodontic pathogens.

Methodology: Two methods were used: a) agar diffusion test: the zones of growth inhibition were measured, recorded after the incubation period; and b) the direct contact test: the microbial suspension were mixed with the medicaments in broth media and left to stand different periods of time, viz. For 15 s, 30 s; for 1,3 ,5 ,10 ,15 and 30 min; for 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 and 48 h; and for 7 days. After each period of time, 1 ml from each well was transferred to 3 ml of the specific broth medium plus medicaments' neutralisers. All tubes were left at 37°C for 7 days. 10 µL of each tube were inoculated in agar plates for investigation of possible microbial growth. The time required for each medicament to produce microbial growth was recorded, transformed in seconds and analysed statistically.

Results: 2% gel chlorhexidine showed inhibitory microbial growth zones from 4.33 to 21.67 mm, and needed 1 minute or less to inhibit all tested microorganisms. Ca(OH)₂ pastes inhibited the microorganisms only in direct contact and needed from 30 s to 24 hours to kill the tested microorganisms. The 2% chlorhexidine gel + calcium hydroxide produced inhibitory zones from 2.84 to 6.5 mm, and needed from 30 s to 6 hours to eliminate the microorganisms.

Conclusion: The 2% chlorhexidine gel + calcium hydroxide combined decreased the antimicrobial activity of the 2% chlorhexidine gel and increased the antimicrobial activity of the calcium hydroxide.

Introduction

One of the major factors associated with endodontic failure is the persistence of microbial infection in the root canal system and periradicular area (Nair *et al.* 1990).

The chances of a favourable outcome with root canal treatment are significantly higher eradicating the microorganisms effectively before sealing the root canal system. However, microorganisms may persist in the root canal after root filling, increasing the risk of treatment fail (Byström *et al.* 1987; Sjögren *et al.* 1991).

The intracanal dressing tend to be effective against microorganisms which may have resisted the root canal preparation. Besides, medicaments control persistent exudate and destructive action of osteoclasts present in external dental resorption (Estrela *et al.* 1995).

Calcium hydroxide is regarded to have many of the properties of an ideal root canal dressing, mainly due to its alkaline pH (Tronstad *et al.* 1981, Torneck *et al.* 1983). It is bactericidal (Safavi *et al.*, 1985), and neutralises the remaining tissue debris in the root canal system (Hasselgren *et al.* 1988). Calcium hydroxide also promotes alkalinising osteogenic environment on the surrounding tissues through the continuous release of OH⁻ ions (Beltes *et al.* 1997).

Estrela *et al.* (1995) advocated that calcium hydroxide inhibit bacterial enzymes by means of hydroxyl ions of the bacteria's cytoplasmic membrane, generating the antibacterial effect. It activates tissue enzymes, such as alkaline phosphatase, which leads to the mineralising effect. The chemical and biological dynamics that occur in

the ionic dissociation of calcium hydroxide and its effect through tissue and bacterial cellular alterations deserve careful discussion and investigation.

Chlorhexidine has been widely used in periodontics (Greenstein *et al.* 1986). It has antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive microorganisms. The antimicrobial effect of chlorhexidine is related to the cationic molecule binding to negatively charged bacterial cell walls, thereby altering the cell's osmotic equilibrium (Greenstein *et al.* 1986). Its use in endodontics has been proposed as an irrigant (Delany *et al.* 1982, Ringel *et al.* 1982, Jeansone & White 1994, Ferraz *et al.* 2001) as well as an intracanal medicament (Siqueira & Uzeda 1997, Sukawat & Srisuran 2002, Gomes *et al. in press*). Ohara *et al.* (1993) evaluated the antibacterial effects of six irrigants against anaerobic bacteria and reported that chlorhexidine was the most effective. Ferraz *et al.* (2001) also advocated the antimicrobial property of 2% chlorhexidine gluconate gel. When used as an intracanal medicament, chlorhexidine was more effective than calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* infection in dentinal tubules (Heling *et al.* 1992, Almyroud *et al.* 2002, Gomes *et al. in press*).

The objective of this study was to investigate the antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes, 2% chlorhexidine gluconate gel and both intracanal medicaments combined against the selected microorganisms: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia /nigrescens*.

Materials and Methods

The substances tested were:

- Calcium hydroxide plus sterile water (9:7);
- 2.0% chlorhexidine gluconate gel;
- Calcium hydroxide plus 2.0% chlorhexidine gluconate gel (1:1).

The calcium hydroxide pastes were prepared using calcium hydroxide P.A. (Labsynth Produtos para Laboratório LTDA, Diadema, SP, Brazil). The consistency of the pastes was similar to that of toothpaste, with a viscosity of 3501 cp. at 0.1 rpm (Brookfield Digital Reometer, model DV-III-IV, São Paulo-SP, Brazil). The 2.0% chlorhexidine gluconate gel was manufactured (Proderma Farmácia de Manipulação Ltda., Piracicaba, SP, Brazil). Chlorhexidine gel consisted of chlorhexidine gluconate and a gel base, the 1% natrosol, which is a hydroxyethylcellulose (water soluble). The 0.89% sterile saline and natrosol (1.0%) were used as controls.

The species of microorganisms used in this experiment were two aerobes, one facultative and three strict anaerobic microorganisms commonly isolated from infected root canals, as follows: *Candida albicans* (NTCC 3736), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) grown on Brain Heart Infusion (BHI, Lab M, Bury, UK) and *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia/nigrescens* grown on Fastidious Anaerobe Agar (FAA, Lab M, Bury, UK). In both media 5% defibrinate sheep blood were added.

Agar diffusion method

The methodology used was the same used from Gomes *et al.* (2002). All microorganisms were previously subcultured in appropriate culture media and under gaseous conditions to confirm their purity.

The aerobes and the facultative anaerobic strains were individually inoculated into tubes containing 5 mL of sterile 0.89% saline solution. The suspension was adjusted spectrophotometrically at 800 nm ($O.D._{800}$) to match the turbidity of 1.5×10^8 cfu mL⁻¹ (equivalent to 0.5 McFarland standard). Five hundred μ L of each test microorganism suspension was inoculated in glass bottles containing 50 ml of BHI Agar (Lab M, Bury, UK) at 46°C, mixed and poured onto 130 mm-plates containing a previously set layer of Mueller Hinton agar (Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK).

The isolated anaerobic microorganisms were suspended spectrophotometrically at 800 nm - $O.D._{800}$ to match the turbidity of 3.0×10^8 cfu mL⁻¹ (equivalent to 1 McFarland standard). Sterile swabs were dipped into the bacterial suspension and inoculated on pre-reduced 70 mm-plates containing 5% sheep-blood-Fastidious Anaerobe Agar (FAA - Lab-M, Bury, UK). The inoculum procedures used were appropriate to provide a semi-confluent growth of the tested microorganisms.

Sterilized stainless-steel tubes of 8.0 x 1.0 x 10 mm (inner diameter, 6 mm) were added to the surfaces of the media and filled with 40 μ L of each test substance and controls. The plates were maintained for 2 h at room temperature in appropriated gaseous conditions to allow the diffusion of the agents through the

agar and then incubated at 37°C again under appropriate gaseous conditions for an appropriate period of time: aerobes, 24 h; facultative, 24–48 h in a CO₂ incubator (Jouan, Saint Herblain, France), in an atmosphere of 10% CO₂ and anaerobes in the anaerobic workstation (Don Whitley Scientific, Bradford, UK) in an atmosphere of 10% H₂, 10% CO₂, 80% N₂ for 7 days.

Zones of inhibition of microbial growth around the cylinder containing the tested substances were measured and recorded after the incubation period. The inhibitory zone was considered to be the shortest distance (mm) between the outer margin of the cylinder and the initial point of the microbial growth. Six replicates were made for each microorganism. Kruskal-Wallis test was used to determine the differences in susceptibility to intracanal medication between microbial species.

Direct contact method

All microorganisms were subcultured onto appropriate culture media and gaseous conditions for 48 h. Facultative strains were individually inoculated into tubes containing 5mL Brain Heart Infusion sterile suspension (Lab M, Bury, UK), which were adjusted spectrophotometrically at 800 nm (O.D.₈₀₀) to match the turbidity of 1.5×10^8 cfu mL⁻¹ (equivalent to 0.5 McFarland standard). Strict anaerobic microorganisms were individually inoculated in tubes containing 5mL Fastidious Anaerobe Broth (FAB, LabM, Bury, UK) sterile suspension, which was adjusted spectrophotometrically at 800 nm - (O.D.₈₀₀) to match the turbidity of 3.0×10^8 cfu mL⁻¹ (equivalent to 1 McFarland standard).

Six wells were used for each time period, microorganism, and calcium hydroxide paste respectively. Overall, 2880 wells were used, comprising 1728 for all the tested pastes, and 1152 for control groups (i.e. 576 for each medicament or each control group).

One mL of each tested substance was placed at the bottom of 24-well cell culture plates (Corning, NY, USA, ref. No. 3524, well Vol. 3,2 ml), including the control groups (sterile saline and natrosol). Two mL of the microbial suspension were ultrasonically mixed for 10 s with the medicaments and left to stand different periods of time, viz. for 15 s, 30 s; for 1,3 ,5 ,10 ,15 and 30 min; for 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 and 48 h; and for 7 days. After each period of time, 1 mL from each well was transferred to tubes containing 3 mL of freshly broth medium to which the neutraliser was added in order to avoid medicaments' residual action. The 0.5% citric acid was used to neutralise calcium hydroxide, 0.5% Tween 80 plus 0.07% lecithin was used to neutralise chlorhexidine and both medicaments combined (Almyroud *et al.* 2002, Gomes *et al.* 2001). All tubes were left at 37°C for 7 days in appropriate gaseous condition. 10 µL of each tube was inoculated on agar plates and left at 24-48 h in appropriate gaseous condition. The purity of the positive cultures was confirmed by Gram staining, by colony morphology on blood agar plates and by the use of biochemical identification kits (API 20 Strep BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France; API C AUX BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France; API 20 Staph BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France; Rapid ANA II System, Remel INC., Lenexa, KS, USA). The time required for each medicament to produce total

microbial inhibition growth was recorded, transformed in seconds, and analysed statistically using Kruskal-Wallis test, with significance level set at $p < 0.05$.

Results

The letters in tables show different values (statistically speaking). The capital letter shows the differences between the line and the lower case between the column.

Agar diffusion method

Means of microbial inhibition growth (in mm) produced by 2.0% chlorhexidine gel, calcium hydroxide paste and both intracanal medicament combined against all microorganisms tested are shown in Table 1. Calcium hydroxide pastes did not produce inhibitory zones (0 mm) against any of the tested microorganisms, inhibiting the microorganisms only in direct contact. However, 2% gel chlorhexidine demonstrated the strongest antimicrobial action, showing the largest inhibitory growth zones, which ranged from 4.33 to 21.67 mm. It is important to mention that the association of 2% chlorhexidine gel + calcium hydroxide also affected the microbial growth, producing inhibitory zones ranging from 2.84 to 6.5 mm against all the microorganisms tested.

The strict anaerobes (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens* and *Porphyromonas endodontalis*) were the most susceptible microorganisms, showing the largest inhibition zones, which ranged from 0 to 21.67 mm. On the other hand, the aerobes and facultative (*Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) microorganisms were

more resistant to all medicaments used, producing inhibition zones ranging from 0 to 9.67mm.

Direct contact method

Table 2 shows the mean contact time required for 2.0% chlorhexidine gel, calcium hydroxide paste and their association to produce 100% of microbial inhibition of growth.

The 2.0 % chlorhexidine gel took 1 min or less to eliminate all tested microorganisms. The calcium hydroxide pastes needed from 30 s to 24 hours to kill the tested microorganisms, while the association of both these medicaments took from 30 s to 6 hours to eliminate the same microorganisms.

The strict microorganisms were more susceptible than the aerobes or the facultative anaerobic microorganisms. *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens* and *Porphyromonas endodontalis* were eliminated in less than 1 min.

Candida albicans (an aerobe microorganism) and *Enterococcus faecalis* (a facultative microorganism) showed similar susceptibility, being killed in 24 h by calcium hydroxide pastes, in 1 h by the combined medicaments (2.0 % chlorhexidine gel + calcium hydroxide) and 15 s by 2.0 % chlorhexidine gel.

Staphylococcus aureus were eliminated in 8 h by calcium hydroxide pastes and in 6 hours by the combined medicaments mentioned above.

Table 6.5.1. Means of microbial inhibition of growth (in mm) produced by 2.0% chlorhexidine gel, calcium hydroxide paste and both as intracanal medicament combined against all microorganisms tested.

Microorganisms	<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
2.0% clorhexidine gel	5.00 a C	9.67 a BC	4.33 a C	17.83 a AB	21.67 a A	20.33 a A
Calcium hydroxide	0 * b A	0 * b A	0 * b A	0 * b A	0 * b A	0 * b A
2.0% clorhexidine gel + Ca(OH) ₂	3.83 ab B	4.00 a B	2.83 ab B	6.00 ab B	6.00 a A	6.50 a A

* Inhibition only by direct contact

Different letters (from a to b, and A to C) mean different values

Capital letter shows the line statistical analysis (Kruskal-Wallis $p < 0.05$)

Lower case shows the column statistical analysis (Kruskal-Wallis $p < 0.05$)

Table 6.5.2. Means of contact time required by 2.0% chlorhexidine gel, calcium hydroxide paste and both intracanal medicaments combined to produce 100% of microbial inhibition growth.

Microorganisms	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. endodontalis</i>	<i>P. intermedia/</i> <i>nigrescens</i>	<i>P. gingivalis</i>
2.0% clorhexidine gel	15 s b A	15 s b A	15 s b A	15 s b A	15 s b A	15 s b A
Calcium hydroxide / <i>7</i>	12 — 24 h a A	6 — 8 a A	12 — 24 a A	15 — 30s a B	15 — 30s a B	15 — 30s a B
2.0% clorhexidine gel + Ca(OH) ₂	30 min — 1 h ab A	4 — 6 a A	30 min — 1 h ab A	15 — 30s a B	15 — 30 s a B	15 — 30s a B

s: second

min: minute

h: hour

Different letters (from a to b, and A to B) mean different values

Capital letter shows the line statistical analysis (Kruskal-Wallis $p < 0.05$)

Lower case shows the column statistical analysis (Kruskal-Wallis $p < 0.05$)

Discussion

Agar diffusion method

The agar diffusion method has been widely used to test the antimicrobial activity of dental materials and medicaments (Al-Khatib *et al.* 1990). The advantage of this method is that it allows direct comparisons of medicaments, and the test microorganisms, indicating which medicament has the potential to eliminate bacteria in the local microenvironment of the root canal system.

A disadvantage of the agar diffusion test is that the result of this method does not depend only on the toxicity of the material for the particular microorganism, but it is highly influenced by the diffusibility of the material across the medium. A material that diffuses more easily will probably provide larger zones of microbial growth inhibition (al-Khatib *et al.* 1990, Abdulkader *et al.* 1996). However, great care was taken to keep the plates for 2 h at room temperature under appropriate gaseous conditions to allow the diffusion of the agents through the agar and then incubated at 37⁰ C again under appropriate gaseous condition (Gomes *et al.* 2002).

The antimicrobial activity of chlorhexidine has already been tested using the agar diffusion method, showing that this substance is a powerful antimicrobial agent (White *et al.* 1997, Siqueira & Uzeda 1997). However, these previous studies tested chlorhexidine in different formulations and concentrations from the one used in the present work. Ferraz *et al.* (2001) tested 2% chlorhexidine gluconate gel and reported that it has antimicrobial activity to be used as intracanal irrigant. Our

results also verified that chlorhexidine, in gel formulation at 2%, is a powerful antimicrobial agent, showing the largest inhibition zones, which ranged from 4.33 to 21.67 mm.

Regarding our study, calcium hydroxide pastes showed inhibition in direct contact against all microorganisms tested. Other works have also reported similar results (Siqueira & Uzeda. 1997, Gomes *et al* 2002). Owing to the fact that calcium hydroxide pastes have a low solubility, they do not diffuse well through the medium.

The aim of the combined medicaments (calcium hydroxide plus 2% chlorhexidine gel) is to add antimicrobial properties to calcium hydroxide. The calcium hydroxide mediates the neutralisation of lipopolissacharides (Safavi & Nichols 1994), has antiresorptive action (Tronstand *et al.* 1981), and thus helps in cleansing the root canal (Hasselgren *et al.* 1988). Increasing its antimicrobial activity, the medicament could act more effectively against resistant microorganisms, such as *Enterococcus faecalis*. In our research, the pastes manipulated with calcium hydroxide plus 2% chlorhexidine gel were effective against *Enterococcus faecalis*, showing larger inhibition zones than the those made with sterile water as a vehicle.

The kind of vehicle used to prepare the calcium hydroxide pastes has a direct relationship with the concentration, velocity of ionic liberation and antimicrobial effect. Furthermore, it is important to consider that viscosity is the measurement of the inner friction fluid. Solutions that flow easily have low viscosity (Fava & Saunders 1999). The gel base used in the tested chlorhexidine was the

natrosol, which is a hydroxyethylcellulose, being a water soluble vehicle (Fava & Saunders, 1999). It is a thickener non-ionic agent highly efficient, inert, largely used to thicken shampoos, gels and soaps (Ferraz *et al.*, 2001). In the present study, the medicaments that had this base showed a good diffusion in the agar medium, producing the largest means of inhibition zones.

Direct contact method

The direct contact test relies on direct and close contact between the microorganism and material tested, and it is independent from diffusion properties of the tested material and the media, which is an advantage over other tests like the agar diffusion method (Weiss *et al.* 1996).

Chlorhexidine demonstrated a powerful antimicrobial agent, in agreement with the results of previous studies (Ringel *et al.* 1982, Jeansonne & White 1994, Gomes *et al.* 2001). Chlorhexidine gel killed all microorganisms tested quickly, in 1 minute or less. *Enterococcus faecalis* was eliminated in only one minute, agreeing with another previous work (Gomes *et al.* 2001).

Some authors using different experimental methods reported that calcium hydroxide pastes had a good antibacterial effect as a root canal dressing (Byström *et al.*, 1985). Using the direct contact method, calcium hydroxide pastes were effective against all tested microorganisms. However, it required different timings to eliminate the same microorganisms.

In the contact test, the required time for calcium hydroxide + sterile water paste to kill all microorganisms was dramatically longer (it ranged from 30 s to 24

h) than the timing for pastes made with chlorhexidine gel to produce the same antimicrobial activity (it ranged from 30 s to 6 h). The association of 2% chlorhexidine plus calcium hydroxide has already been tested against *Enterococcus faecalis* in infected bovine root dentine, demonstrating that the combined medicaments were effective (Almyroud *et al.* 2002, Gomes *et al. in press*).

Researches *in vitro* advocated that some associations, such as calcium, urea, and sulfate lauryl sodium reduce the antimicrobial activity of chlorhexidine (Rolla & Melson 1975, Bonsvoll 1977). In the present study, it was possible to observe that the antimicrobial property of chlorhexidine was also reduced when associated with calcium hydroxide. This association brings more antimicrobial activity to calcium hydroxide pastes, which is questionable, specially in persistent periapical lesions cases. However, it possesses important properties to be used as intracanal medicament, such as biological properties and physical barrier.

This research emphasizes the importance of the contact between medicament and the infecting microorganisms, in order to achieve a substantial antimicrobial effect. Further research *in vivo* is required to determine the effectiveness of the antimicrobial activity of chlorhexidine gel, calcium hydroxide paste and both these intracanal medicaments combined.

Conclusion

Under experimental conditions the 2% chlorhexidine gel + calcium hydroxide combined decreased the antimicrobial activity from the 2% chlorhexidine gel and increased the antimicrobial property of the calcium hydroxide.

Acknowledgements

This work was supported by Brazilian grants from FAPESP (no. 2000/13689-7), CNPq (520277/99-6 & 104238/99-2).

References

1. Al-Kathib ZZ, Baum RH, Morse DR, Yesilsoy C, Bhambhani S, Furst ML (1990). The antimicrobial effect of various endodontic sealers. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. **70**; 784-90.
2. Almyroud A, Manckenzie D, McHugh S, Saunders WP (2002). The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an *in vitro* study. *Journal of Endodontics*. **28**; 163-7.
3. Abdulkader A, Deguid R, Saunders EM (1996). The antimicrobial activity of endodontic sealers to anaerobic bacteria. *International Endodontic Journal* **29**; 280-3.

4. Beltes PG, Pissiotis E, Koulaouzidou E, Kortsaris AH (1997). In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *Journal of endodontics*. **8**; 200-4.
5. Bonesvoll P (1977). Oral pharmacology of chlorhexidine. *Journal Clinical Periodontology* **12**; 49-65.
6. Byström A, Happonen R-p, Sjögren U, Sundqvist G (1987). Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Endodontics and Dental Traumatology* **3**; 58-63.
7. Byström A, Sundqvist G (1985). The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *International Endodontic Journal* **18**; 35-40.
8. Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW (1982). The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*. **53**; 518-23.
9. Estrela C, Sydney GB, Pesce HF, Felipe Jr O (1995). Dentinal diffusion of hydroxyl ions of various calcium hydroxide pastes. *Brazilian Dental Journal*. **6**; 5-9.
10. Fava LR, Saunders WP (1999) Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *International Endodontic Journal*. **32**; 257-82.
11. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2001). *In vitro* assessment of chlorhexidine gel as na endodontic irrigant. *Journal of endodontics*. **7**; 452-5.

12. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Garrido FD, Rosalen PL. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *Journal of Endodontics (in press)*.
13. Gomes P.B.F.A., Souza S.F.C., Ferraz C.C.R., Teixeira F.B., Souza-Filho F.J. *In vitro* antibacterial activity of chlorhexidine gel and calcium hydroxide separately and combined on infected bovine root dentin. *International Endodontic Journal (in press)*.
14. Gomes P.B.F.A., Ferraz C.C.R., Vianna M.E. *et al.*(2002). *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. *Brazilian Dental Journal*. **13**; 155-161.
15. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2001). *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*. **34**; 424-8.
16. Greenstein G, Berman C, Jaffen R. (1986). Chlorhexidine an adjunct to periodontal therapy. *Journal of Periodontology*. **57**; 370-6.
17. Hasselgren G, Olsson B, Cvek M (1988). Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue *Journal of Endodontics*. **14**; 125-7.
18. Heling J, Steinberg D, Keniny S, Gavrilavich J, Sela MN, Friedman M (1992). Efficacy of a sustained- release device containing chlorhexidine and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in avoiding secondary infection of dentinal tubules. *International Endodontic Journal*. **35**; 20-4.

19. Jeansonne MJ & White RR. (1994). A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *Journal of Endodontics*. **20**; 276-8.
20. Nair PNR, Sjögren U, Key G, Kahnberg K-E, Sundqvist G (1990). Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, a symptomatic human teeth with therapy- resistant periapical lesions: a longterm light and electron microscopic follow-up study. *Journal of endodontics*. **16**; 580-8.
21. Ohara PK, Torabinejad M, Ketting JD (1993). Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. *Endodontic Dental Traumatology*. **9**; 95-100.
22. Ringel AM, Patterson SS, Newton CW, Miller CH, Mulhern (1992). *In vivo* evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *Journal of Endodontics*. **8**; 200-4.
23. Rolla G & Melsen B (1975). On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *Journal of Dental Research*. **6**; 57-60.
24. Safavi KE, Nichols FC. (1994). Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *Journal of Endodontics*. **20**; 127-9.
25. Safavi KE, Dowden WE, Introcaso JH, Langeland H (1985). A comparison of the antimicrobial effects of calcium hydroxide and iodine-potassium iodide. *Journal of Endodontics*. **11**; 454-6.

26. Siqueira Junior JF, de Uzeda M (1997). Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *Journal of Endodontics*. **23**; 167-9.
27. Sjögren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. (1991). The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *International Endodontic Journal*. **24**; 119-25.
28. Sukawat C, Srisuwan T (2002). A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with *Enterococcus Faecalis*. *Journal of Endodontics*. **28**; 102-4.
29. Torneck CD, Moe H, Howley TP (1983). The effect of calcium hydroxide solution on porcine pulp fibroblasts in vitro. *Journal of Endodontics*. **9**; 131-6.
30. Tronstad L, Andreassen JO, Haselgreen G, Kristerson L, and Riis I (1981) Ph change in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *Journal of Endodontics*. **7**; 17-21.
31. Weiss EI, Shalhav M, Fuss Z (1996). Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endodontics and Dental Traumatology*. **12**; 179-84.
32. White RR, Hays GL & Janer LR. (1997). Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *Journal of Endodontics*. **23**; 229-231.

8. DISCUSSÃO

Um medicamento é uma droga ou uma preparação com drogas de ação farmacológica benéfica, quando utilizada de acordo com suas indicações e propriedades. São exemplos: pós, comprimidos, xaropes, pomadas, colírios, supositórios, entre outros. Os medicamentos podem ser Simples (preparados a partir de 1 único fármaco) ou Compostos (preparados a partir de vários fármacos). Quanto ao seu uso podem ser classificados como: medicamentos de uso externo (aplicáveis na superfície do corpo ou nas mucosas facilmente acessíveis ao exterior) ou medicamentos de Uso Interno (destinam à administração no interior do organismo por via bucal e pelas cavidades naturais) (Ansel *et al.*, 2000).

De acordo com Ansel *et al.* (2000) os medicamentos podem ser divididos em: Oficiais (presentes nas Farmacopéias), Oficiais (preparados na própria farmácia), Especialidades Farmacêuticas (Industrializados e sua fabricação obedece a regulamento de natureza governamental), Magistrais (prescritos para cada caso), Placebo (substâncias ou preparações inativas), Alopáticos (tratam as doenças produzindo uma condição de antagonistas) e Homeopáticos (tratam produzindo uma condição semelhante com o estado patológico a ser tratado)

As fórmulas ou formulações representam o conjunto dos componentes de uma prescrição ou composição de uma especialidade farmacêutica. Os componentes de uma formulação são: a) Adjuvantes: fármacos auxiliares, que podem exercer efeito solubilizante, conservante, edulcorante e aromatizante. Em regra geral, não

modificam o efeito farmacológico dos princípios ativos; b) Veículo ou Excipiente: são destituídos de atividade e têm como função dar corpo aos fármacos, diluindo-os à concentração conveniente ou proporcionando maior facilidade de administração. Quando fazem parte de uma formulação líquida são chamados de veículos e quando fazem parte de uma fórmula sólida são chamados de excipiente (Ansel *et al.*, 2000).

O efeito de um medicamento depende da quantidade de substância que penetra no organismo, podendo atuar diretamente no local de sua aplicação ou ser absorvido de modo que atinja os órgãos e tecidos, cuja resposta é pretendida. Os medicamentos de uso tópico são aqueles que se aplicam externamente, sobre uma região limitada do corpo, não proporcionando absorção sistêmica dos seus constituintes. Os medicamentos de uso local são aqueles que desempenham sua ação em uma zona específica do organismo (Ansel *et al.*, 2000).

No presente trabalho utilizamos medicamentos na forma líquida, gel e pastas, os quais possuem ação local (no interior dos canais radiculares) com a finalidade de combater a infecção endodôntica.

Bactérias ou seus produtos induzindo respostas inflamatórias e imunológicas são considerados os principais agentes etiológicos que levam à formação de quadros de necroses pulpare e lesões periapicais por fatores bacterianos de virulência e estímulo da resposta do hospedeiro (Kakehashi *et al.*, 1965). A eliminação das bactérias infectantes e dos restos necróticos pulpare pode ser realizada pelos procedimentos endodônticos de rotina, tais como a instrumentação

e irrigação do espaço pulpar com agente antimicrobiano, e a aplicação de medicamentos tópicos intracanaís em casos de polpas infectadas (Byström *et al.* 1985).

Os critérios necessários para a utilização de quaisquer agentes antimicrobianos são: a suscetibilidade do microrganismo patogênico ao agente antimicrobiano; a penetração deste agente no sítio de infecção; o alcance e manutenção de concentrações adequadas do agente no sítio de infecção e sua baixa toxicidade às células do hospedeiro. Porém deve haver inibição do crescimento ou morte dos microrganismos e não desenvolvimento de resistência rápida ao agente antimicrobiano. Esses critérios requerem o conhecimento dos microrganismos envolvidos na infecção e sua suscetibilidade aos diferentes agentes antimicrobianos, assim como a farmacocinética deste agente (Walker, 1992; Gomes *et al.* 1996).

O combate aos microrganismos não se restringe a luz do canal principal, mas, também aos residentes no interior dos túbulos e ramificações dentinárias. Deve-se considerar que a anatomia interna é extremamente complexa, muitas vezes inacessível à ação mecânica do instrumento endodôntico, o que impõe, nestas ocasiões, uma efetiva ação antimicrobiana e neutralizante de produtos microbianos, acompanhada pela dissolução tecidual, proporcionada pela substância química em associação com a medicação intracanal (Holland *et al.*, 1979; Harrison & Madonia, 1971; Harrison & Hand, 1981; Akpta & Bechman, 1982; Costa *et al.*, 1986; Paiva & Antoniazzi, 1988; Souza *et al.*, 1992; Pécora *et al.*, 1993; Tanomaru Filho, 1996; Estrela *et al.*, 1997). A medicação intracanal constitui está indicada em diferentes

situações como manutenção do saneamento conquistado durante o preparo químico-mecânico (controle de microrganismos que resistiram à fase do preparo de canais infectados), retratamentos, controle de reabsorções radiculares, traumatismos, apicificações e perfurações (Tronstad, 1991).

Em relação à análise da metodologia experimental empregada neste estudo alguns fatores merecem ser abordados.

Os microrganismos utilizados nesta pesquisa constituíram-se daqueles presentes em canais radiculares infectados, com distintas características morfofinto-respiratórias (cocos e bacilos; Gram positivos e negativos; aeróbios, facultativos e anaeróbios estritos; além de uma levedura). A escolha procedeu-se também com base em microrganismos estudados em outros experimentos, sendo estes constituídos *Staphylococcus aureus* (Zerloti, 1959; Pupo *et al.*, 1994; Marques, 1997; Ayhan *et al.*, 1999; Estrela *et al.*, 1998, 1999, 2000, 2001), *Enterococcus faecalis* (Winkler, 1959; Ferreira *et al.*, 1978; Harrison & Hand, 1981; Bystrom & Sundqvist, 1985; Orstavik & Haapasalo, 1990; Harrison *et al.*, 1990; Helling *et al.*, 1992; Vahdty *et al.*, 1993; Pupo *et al.*, 1994; Ayhan *et al.*, 1999; Haapasalo *et al.*, 2000; Estrela *et al.*, 1998, 1999, 2001), *Bacillus subtilis* (Barbosa & Almeida, 1987; D'Arcangelo *et al.*, 1999; Estrela *et al.*, 1998, 1999, 2001), *Candida albicans* (Zerlotti, 1959; Barbosa & Almeida, 1987; Harrison *et al.*, 1990; Marques, 1997; Ayhan *et al.*, 1999; D'Arcangelo *et al.*, 1999; Sen *et al.*, 1999; Estrela *et al.*, 1998, 1999, 2000, 2001) e anaeróbios estritos: *Porphyromonas* spp. e *Prevotella* spp. (Dahlén & Hofstad, 1977; Sundqvist, 1976; Sundqvist *et al.*, 1979; Dahlén & Bergenholtz, 1980; Sundqvist & Johansson, 1980; Griffie *et al.*,

1980; Moller *et al.*, 1981; Yoshida *et al.*, 1987; Brook *et al.*, 1991; Horiba *et al.*, 1991; Baumgartner, 1992).

Os meios de cultura, utilizados no experimento possuem as exigências nutritivas de microrganismos exigentes e, portanto foram empregados para estas avaliações (Gomes *et al.* 1995, 1996).

O estabelecimento dos períodos de estudo de 15 , 30 e 45 s, 1 ,3, 5, 10, 20 e 30 min, 1 e 2 horas para avaliar ao irrigantes deve-se ao fato de que, geralmente, uma sessão de tratamento endodôntico demanda um intervalo de tempo em torno de 1 hora. Deve-se ressaltar que durante esse período a substância deverá ser renovada várias vezes. Outras pesquisas investigaram intervalos de tempo que variaram até 1 hora (Foley *et al.*, 1983; Barbosa *et al.*, 1987; Nikolaus *et al.*, 1988; Harrison *et al.*, 1981, 1990; Orstavik & Haapassalo, 1990; Souza *et al.*, 1992; Brisenõ *et al.*, 1992; Heling *et al.*, 1992a; Ohara *et al.*, 1993; Georgopoulou *et al.*, 1994; Pupo *et al.*, 1994; Sen *et al.*, 1999; Haapasalo *et al.*, 2000).

Os períodos de 15 , 30 e 45 s, 1 ,3, 5, 10, 20 e 30 min, 1 e 2 horas, 24 e 48 horas e 7 dias foram empregados para avaliar os medicamentos intracanaais. Estudou-se até 7 dias, pois esse é o período que normalmente a utilização de uma medicação intracanal permanece entre sessões de atendimento. (Ferreira *et al.*, 1978; Bystrom *et al.*, 1985; Sjogreen *et al.*, 1991; Georgopoulou *et al.*, 1993; Estrela *et al.*, 1997). Entretanto, foram empregados também intervalos de tempo menores que esse período, pois a intenção foi verificar o período mínimo

necessário para que a medicação entre em contato com os microrganismos para eliminá-los.

O estabelecimento do espectro de atividade de qualquer agente antimicrobiano é útil para melhorar o processo de controle da infecção. Em geral, há três técnicas *in vitro* que podem ser empregadas para este propósito – o método de diluição (como por exemplo, o teste de concentração inibitória mínima - CIM), que permite determinação da quantidade de agente antimicrobiano necessária para inibir o crescimento microbiano de determinado microrganismo; o teste de difusão em ágar, que permite a observação de zonas de inibição adjacentes aos discos que contêm o agente antimicrobiano, que podem estar relacionadas ao seu efeito; e o método de contato direto, que fornece informações qualitativas a respeito das substâncias (Estrela, 2000). Todas as técnicas apresentam vantagens e desvantagens. Por exemplo, o método de diluição (CIM) só pode ser empregado para substâncias que são solúveis no meio de cultura. Com relação ao método de difusão em ágar, o tamanho da zona de inibição microbiana depende da solubilidade e da difusibilidade da substância testada e, portanto, pode não expressar efetivamente todo o seu potencial. O método de contato direto está relacionado com a efetividade da substância e com sua exposição direta com o microrganismo; parecendo ser independente de outras variáveis (Estrela *et al.*, 2000).

O teste de difusão em ágar requer cuidadosa padronização da densidade do inóculo, conteúdo de meio, viscosidade do ágar, número e tamanho dos

espécimes contidos em cada placa (Tobbias, 1988; Weiss *et al.*, 1996). Para interpretação dos resultados adota-se o tamanho das zonas de inibição do crescimento microbiano como parâmetro de referência. A análise de substâncias que apresentam diferentes capacidades de dissociação e difusão através do ágar fica prejudicada, não oferecendo condições de igualdade para comparação, como no caso das pastas de hidróxido de cálcio. Por isso, além desse teste utilizamos o teste do contato direto. Os testes que utilizam meio de cultura líquido (caldo), oferecem maiores condições de igualdade a substâncias que apresentam dificuldade de dissociação e difusão em ágar. Entretanto, a forma de apresentação do medicamento testado ainda pode influenciar na difusão e dissociação. No presente estudo pudemos verificar que a forma líquida da clorexidina se misturou mais rapidamente com o inóculo, necessitando de menores tempos de contato para eliminar os microrganismos testados que a forma gel, mesmo esta sendo uma mistura homogênea.

Os grupos controles utilizados nestes testes apresentaram crescimento microbiano, sendo possível evidenciar esse crescimento através da análise da morfologia das colônias, coloração de Gram, teste de catalase e testes bioquímicos padronizados.

Substâncias químicas como os irrigantes devem possuir outras propriedades além da atividade antimicrobiana, como dissolução tecidual, biocompatibilidade e propriedades físico-químicas (densidade, tensão superficial, pH, viscosidade, condutividade, e capacidade de umectação). Neste estudo avaliamos apenas a

atividade antimicrobiana, tornando-se oportuno verificar na literatura outras propriedades desejadas às substâncias auxiliares utilizadas em endodontia.

Grossmann & Meiman (1941) analisaram *in vitro* a capacidade solvente do hipoclorito de sódio a 5% sobre polpas dentárias recém-extraídas e verificaram que a dissolução do tecido orgânico ocorria em período inferior a 1 hora. Kuruvila & Kamath (1998) relatam que a clorexidina não possui a propriedade de dissolução dos tecidos. A ausência desta propriedade parece ser a principal desvantagem desta substância para ser utilizada como irrigante e ao mesmo tempo parece ser esta a vantagem, pois assim é menos tóxica aos tecidos periapicais.

Com relação às propriedades físico-químicas, Pécora *et al.* (1999) relatam que instabilidade das soluções de hipoclorito de sódio permite uma rápida perda de cloro, diminuindo o tempo de vida útil dessa substância. Esta perda ocorre quando se reduz o pH da solução por meio do ácido bórico ou do bicarbonato de sódio. Outros fatores, como a elevação da temperatura e a luz solar também alteram a liberação de cloro, favorecendo a ineficácia da solução. No presente estudo as soluções de hipoclorito de sódio utilizadas foram manipuladas um dia antes da realização dos testes em pequenas quantidades, e sem a adição de conservantes.

A clorexidina apresenta uma importante propriedade que é a substantividade (ação antimicrobiana residual), comprovada por White (1997). A molécula de clorexidina se liga a hidroxiapatita do esmalte ou dentina e a grupos aniônicos

ácidos de glicoproteínas, sendo lentamente liberada à medida que sua concentração no meio diminui, permanecendo assim com um tempo de atuação prolongado (Rölla & Melsen, 1975).

Com relação as medicações utilizadas nos testes, foram empregados o hipoclorito de sódio (0,5%, 1,0%, 2,5%, 4,0% e 5,25%) e clorexidina gel e líquida (0,2%, 1,0% e 2,0%) para serem utilizados como irrigantes intracanais. Os medicamentos intracanis utilizados foram a clorexidina gel 2% e as pastas de hidróxido de cálcio associadas à água destilada, solução salina, solução anestésica, glicerina, polietilenoglicol, paramonoclorofenol canforado (PMCC), PMCC associado à glicerina e clorexidina gel 2%.

Até o início da década de 40, o irrigante mais utilizado nos tratamentos endodônticos era a água, devido a seu baixo custo, disponibilidade e capacidade de lubrificação. Porém, esta não possui atividade antimicrobiana. Vários tipos de irrigantes têm sido recomendados para uso endodôntico. Dentre eles se incluem ácidos, agentes quelantes, enzimas proteolíticas, soluções alcalinas e outros agentes químicos como os agentes oxidantes (Harrison, 1984). No entanto, um irrigante que reúna todas as propriedades acima citadas ainda não foi encontrado.

A eficiência de uma solução irrigadora não depende apenas de sua natureza química, mas também de seu volume, temperatura, tempo de contato, tensão superficial, profundidade de penetração da agulha irrigadora, calibre da agulha, e tempo de fabricação e armazenamento da solução (Ingle *et al.*, 1985).

O NaOCl pode ser encontrado em diversas concentrações (0,5; 1; 2,5; 4,0;

5,25%). Soluções mais concentradas apresentam maior atividade antibacteriana, desde que outros fatores, como tempo de atuação, pH, temperatura sejam mantidas constantes. Em relação a presença de matéria orgânica, sabe-se que o cloro que reage com os tecidos passa a ser consumido, implicando numa redução no seu efeito antimicrobiano. Para compensar esta interferência nos efeitos antimicrobianos do NaOCl durante o preparo químico-mecânico do canal radicular, a solução irrigadora deve ser constantemente renovada.

Durante o tratamento endodôntico, tanto debris quanto soluções irrigadoras são extruídos através do forame apical (Vande Visse & Brilliant, 1975; Ferraz *et al.*, 2001), atingindo tecidos periapicais vitais. Desta forma, o uso de NaOCl como irrigante endodôntico deve ser realizado com cuidado. A propriedade do NaOCl de dissolver tecidos orgânicos é desejável durante a sua atuação no interior do canal radicular contaminado, auxiliando a remoção de restos pulpares. Porém, esta dissolução não é seletiva, podendo danificar os tecidos periapicais, caso os atinja. Por isso, relatos de acidentes devido à injeção acidental de NaOCl na região periapical são comuns na literatura (Becking, 1991; Ehrich *et al.*, 1993). É demonstrado que danos aos tecidos periapicais ocorrem com maior frequência em casos de polpa necrótica e em dentes com forames apicais amplos, pois há maior chance de extrusão de irrigantes (Salzgeber & Brilliant, 1977).

Em estudos *in vitro* e *in vivo*, Heggors *et al.* (1991) avaliaram atividade antimicrobiana e citotoxicidade do NaOCl. Os autores concluíram que NaOCl a 0,025% seria a concentração mais segura para o uso clínico por não produzir efeitos tóxicos e manter propriedades bactericidas. Kozol *et al.* (1988) foram ainda

mais longe, recomendando abandono do uso da solução de Dakin (NaOCl 0,5%) pois observaram que concentrações muito inferiores a esta já eram capazes de interferir na quimiotaxia de neutrófilos e causar danos a fibroblastos e células endoteliais.

Os resultados do presente estudo, assim como outros na literatura (Abou-Rass & Piccino, 1982; Baumgartner & Cuenin, 1992), demonstraram que dentre as concentrações de NaOCl utilizadas, a de 5,25% foi a que promoveu inibição de crescimento microbiano mais rapidamente contra todos os microrganismos avaliados. Entretanto, quando foram utilizadas soluções de NaOCl em concentrações menores, principalmente 0,5% e 1%, os tempos necessários para eliminar os microrganismos aeróbios e facultativos foram significativamente maiores. Apesar de Yesilsoy *et al.* (1995) e Gomes *et al.* (1999) terem utilizado o método de difusão em ágar, a atividade antimicrobiana do hipoclorito nas mesmas concentrações são correspondentes aos nossos resultados. Quanto maior a concentração, maior e mais rápida a atividade antimicrobiana, entretanto maior será a sua toxicidade (Ansel *et al.*, 2000).

Portanto, apesar do hipoclorito de sódio, em diversas concentrações, desde sua introdução em 1936 (Walker, 1936), ainda ser o irrigante mais utilizado na Endodontia, outros irrigantes, menos citotóxicos e com maior espectro de ação contra os microrganismos da microbiota endodôntica, devem ser pesquisados.

O gluconato de clorexidina é um agente antimicrobiano de amplo espectro, tanto para as bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (Cervone *et al.*, 1990) e apresenta substantividade (Rölla & Melsen, 1975). O seu uso tem sido

preconizado em endodontia, principalmente como solução irrigadora (Delany *et al.*, 1982; Ringel *et al.*, 1982; Jeansonne & White, 1994). Entretanto, ela não possui capacidade de dissolver matéria orgânica como o NaOCl.

A clorexidina gel utilizada no presente estudo possui como veículo o natrosol (hidroxietilcelulose), que é um agente espessante não iônico altamente eficiente, hidrossolúvel e muito utilizado para espessamento de xampus, géis e sabonetes à base de tensoativos aniônicos, como o digluconato de clorexidina, aos quais apresenta excelente compatibilidade (Ferraz *et al.*, 2001).

A forma líquida apresentou sua atividade antimicrobiana mais rapidamente que a forma gel frente aos microrganismos aeróbios (*C. albicans* e *S. aureus*) e facultativo (*E. faecalis*) estudados neste trabalho. Com relação aos microrganismos anaeróbios estritos, tanto a forma líquida como a gel eliminaram os microrganismos testados no mesmo intervalo de tempo. Este fato poderia ser explicado pela agitação aplicada (10s), em aparelho de ultra-som de bancada, a qual poderia não ter sido suficiente para homogeneizar da mesma maneira as formas gel e líquida, ficando assim mais difícil misturar a forma gel com o inóculo microbiano. Gomes *et al.* (1999) avaliaram a atividade antimicrobiana dos mesmos irrigantes, porém aplicando o método de difusão em ágar e observaram que a forma gel apresentou melhores resultados que a forma líquida, fato este que foi explicado pelo contato por maior período de tempo conseguido entre o gel e ágar.

Ferraz *et al.* (2001) preconizaram a utilização da clorexidina na forma gel como irrigante endodôntico por apresentar vantagens clínicas sobre a forma líquida, como a realização de uma instrumentação mais fácil, manutenção do

princípio ativo em contato com a dentina por um longo período de tempo e diminuição da formação de *smear layer*.

Vários autores compararam a clorexidina líquida ao hipoclorito de sódio. Desta forma, cabe destacar Ringel *et al.* (1982), que analisando a eficácia antimicrobiana do gluconato de clorexidina a 0,2% e do hipoclorito de sódio a 2,5%, puderam observar que a clorexidina a 0,2% é um agente antimicrobiano que pode ser utilizado como irrigante e medicação intracanal. Jeansone & White (1994) analisaram a ação do hipoclorito de sódio a 5,25% e gluconato de clorexidina a 2% em 62 dentes humanos. A análise dos resultados revelou que tanto a clorexidina a 2% quanto o hipoclorito de sódio a 5,25% foram eficazes na redução da microbiota do canal radicular.

Os resultados deste estudo *in vitro* mostraram que as soluções de hipoclorito de sódio e a clorexidina gel e líquida poderiam ser utilizadas como irrigantes endodônticos pois apresentaram inibição de crescimento microbiano contra todos os microrganismos testados. Apenas a clorexidina gel 0,2% não estaria indicada para este fim, visto que necessitou de um tempo maior para eliminar o *E. faecalis*, podendo ultrapassar o tempo normalmente utilizado para a realização do preparo químico mecânico.

Komorowski *et al.* (2000), analisaram a substantividade de algumas substâncias empregadas na irrigação de canais radiculares, como o hipoclorito de sódio a 5,25% e a clorexidina 0,2%. Verificaram que após 5 minutos de contato com a dentina, nenhuma das soluções analisadas conseguiu eliminar *Enterococcus faecalis* do interior de túbulos dentinários bovinos. Porém, quando

empregadas como medicação intracanal, em que o período de contato da solução com os túbulos dentinários foi igual a 7 dias, a clorexidina a 0,2% apresentou efeito sobre o microrganismo analisado, enquanto o hipoclorito de sódio não foi capaz de eliminar os microrganismos que ainda permaneceram no interior dos túbulos dentinários. Portanto, o emprego da clorexidina a 0,2% estaria mais indicado como medicação intracanal e não como solução irrigadora dos canais radiculares.

Apesar de não ter sido testado o hidróxido de cálcio como agente irrigante, vale ressaltar que ele é ineficaz para esta finalidade (Estrela, 2000), geralmente porque é utilizado em um intervalo de tempo menor para agir. Já como medicação intracanal, é efetivo, caracterizando dois pontos: maior tempo para atuação e uma maior concentração da substância (Estrela, 1997).

Os efeitos biológico e antimicrobiano do Ca(OH)_2 estão relacionados a dissociação desta substância em ambiente aquoso, liberando íons cálcio e hidroxila. O seu pH alcalino (12,5) tem um efeito destrutivo nas células bacterianas e nas estruturas protéicas (Spangberg, 1994). Entretanto existem bactérias que conseguem sobreviver num pH alcalino, como os *Enterococcus faecalis*, sendo estes implicados nos casos de insucesso da terapia endodôntica (Sjogren *et al.*, 1991).

Inúmeras substâncias têm sido utilizadas como veículos para o Ca(OH)_2 , com o objetivo melhorar algumas de suas propriedades, como a ação antimicrobiana, a velocidade de dissociação iônica e propriedades físico-químicas, favorecendo as condições clínicas para seu emprego (Fava & Saunders, 1999).

Todavia, tem sido muito discutido qual a melhor opção como veículo, visto que ele é responsável por uma liberação mais rápida ou mais lenta dos íons.

Os principais veículos hidrossolúveis são: água destilada, soro fisiológico, solução anestésica, solução de metilcelulose, glicerina, polietilenoglicol e propilenoglicol, sendo considerados veículos aquosos e viscosos devido à velocidade de liberação dos íons. Os principais veículos oleosos são: óleo de oliva, silicone, óleo de papoula-lipiodol.

O paramonoclorofenol canforado (PMCC) vem sendo enquadrado como um veículo oleoso devido à presença da cânfora em sua composição, a qual foi acrescentada por Pucci (1942) com a finalidade de neutralizar a ação irritante do paramonoclorofenol (Estrela, 1997; Fava & Saunders, 1999). O PMCC é constituído por uma mistura líquida, oriunda da combinação do paramonoclorofenol com a cânfora, em partes variáveis, 25 a 35% de paramonoclorofenol e 65 a 75% de cânfora. A cânfora apresenta-se sob a forma de cristais incolores ou massas cristalinas friáveis e translúcidas, untuosas ao tato; tem odor penetrante, característico, e sabor amargo; é uma substância aromática, muito pouco solúvel em água (1:800).

Como pudemos verificar no presente trabalho, o PMCC é um potente agente antimicrobiano, apresentando halos de inibição de crescimento e eliminando os microorganismos testados rapidamente, não podendo então ser chamado de veículo, pois na verdade ele é um fármaco adjuvante terapêutico. Dessa forma, o paramonoclorofenol canforado, quando empregado em associação ao hidróxido

de cálcio, apesar de dissociar-se lentamente (Lopes *et al.*, 1996), é errôneo chamá-lo de veículo oleoso.

Com relação às propriedades antimicrobianas das pastas de hidróxido de cálcio, notamos que a associação do PMCC ao hidróxido de cálcio proporcionou a formação de halos de inibição maiores que as pastas manipuladas com os veículos aquosos ou viscosos. Os resultados do presente estudo confirmam os achados por Difiore *et al* (1983), Abdulkader *et al.* (1996), Siqueira & Uzeda (1996). Entretanto muitos autores reconhecem que o PMCC é irritante para os tecidos (Spangberg, 1994) o que limita seu uso na clínica.

A adição da glicerina ao PMCC aumentou a propriedade de difusão do medicamento no meio de cultura (ágar), produzindo halos maiores que das pastas manipuladas só com o PMCC. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Siqueira & Uzeda (1998).

Como já discutimos sobre metodologia empregada, teste de difusão em ágar não fornece condições de igualdade às substâncias com diferentes propriedades de difusão. Por isso, em nossos resultados observamos que a maioria das pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ manipuladas com: com água destilada, solução salina, glicerina e polietilenoglicol não produziram halos contra a maioria dos microrganismos testados (*S. aureus*, *E. faecalis*, *S. sanguis*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *A. naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens* e *Prevotella denticola*).

No entanto, a não produção dos halos de inibição nem sempre pode significar que as medicações não possuem atividade antimicrobiana, pois essas pastas não possuem boa difusão através do ágar. Isto provavelmente ocorreu devido ao fato dos meios de cultura possuírem em suas formulações substâncias tamponadoras. Assim, mesmo que sofra difusão, esta é lenta graças à baixa solubilidade da substância, o que faz com que os níveis de pH alcançados pelo meio não sejam elevados o suficiente para apresentar atividade antimicrobiana.

Realizamos testes complementares para verificar se a ação por contato direto realmente ocorreu. Após o período de crescimento microbiano, os cilindros foram retirados das placas e nas superfícies que estavam em contato com o ágar passou-se um *swab* e este foi plaqueado em BHI ágar ou FAA. Foi observado que nenhuma placa exibiu crescimento microbiano, confirmando a atividade antimicrobiana das pastas por contato direto.

A necessidade em estudar a eficácia antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio por ação em contato direto sobre os microrganismos justifica-se como suporte a vários questionamentos ainda existentes com relação à medicação intracanal. Várias substâncias têm sido associadas ao hidróxido de cálcio para aumentar o efeito antimicrobiano, devendo ser analisadas inicialmente *in vitro*, para posteriormente, as melhores serem selecionadas para análise *in vivo*.

Utilizando metodologia do contato direto, *Enterococcus faecalis* foi o microrganismo que apresentou maior resistência contra todos os medicamentos testados, enquanto que os anaeróbios estritos *Porphyromonas endodontalis*, *P.*

gingivalis e *Prevotella intermedia/nigrescens* foram mais sensíveis. Pode-se extrapolar que embora as bactérias anaeróbias Gram-negativas, tais como *Prevotella* e *Porphyromonas* spp. possam estar associadas com os processos infecciosos dolorosos, devido a presença da endotoxina, que pode estimular a produção de bradicinina, um potente mediador da dor, elas são mais suscetíveis às pastas de Ca(OH)_2 . Por outro lado, bactérias facultativas como *E. faecalis*, que foram associados com os canais assintomáticos (Gomes *et al.* 1996 a,b), parecem ser mais resistentes ao tratamento endodôntico e conseqüentemente relacionadas ao insucesso do tratamento.

Alguns trabalhos relatam que o hidróxido de cálcio mostrou-se pouco efetivo sobre o *Enterococcus faecalis* (Haapasalo & Orstavik, 1987; Safavi *et al.*, 1990; Siqueira *et al.*, 1996). Na presente pesquisa pudemos verificar que esse microrganismo foi o mais resistente ao efeito das medicações intracanaís, necessitando de maior tempo em contato com a medicação para ser eliminado. As críticas de que a pasta de hidróxido de cálcio associada ao soro fisiológico ou água destilada seja inefetiva contra microrganismos aeróbios e facultativos (principalmente o *E. faecalis*), devem ser revistas. Necessita-se avaliar o tempo para que esta medicação possa demonstrar sua efetividade, e o método de avaliação empregado.

As pastas de hidróxido de cálcio associadas ao PMCC necessitaram de menor tempo em contato com os microrganismos testados. Entretanto, só foi utilizado um único neutralizador das pastas de hidróxido de cálcio, que é o ácido

cítrico a 0,5% (Siqueira & Uzeda, 1998). Como pudemos observar, o PMCC é uma substância com ação antimicrobiana potente, devendo-se nos próximos estudos, utilizar um agente neutralizador para esta substância.

Na metodologia aplicada por Estrela (1997) não foi evidenciado o uso de soluções neutralizadoras dos efeitos residuais das mediações testadas. Provavelmente por isso os medicamentos apresentaram ação antimicrobiana mais rápida, necessitando de apenas 1 minuto para as pastas de Ca(OH)_2 associadas ao PMCC exibirem ação antimicrobiana contra *E. faecalis*.

A pasta de hidróxido de cálcio foi associada com a clorexidina gel 2%, por ser esta uma substância antimicrobiana, que tem sido utilizada clinicamente devido à baixa toxicidade. Estrela (1997) avaliou a associação da clorexidina líquida 1% ao hidróxido de cálcio mostrando que essa associação eliminou a maioria dos microrganismos testados em apenas 1 minuto ou no intervalo entre 1 a 48 horas. Gomes *et al.* (1999) também avaliaram essa associação, porém empregando o método de difusão em ágar, mostrando ter bons resultados essa associação.

Neste estudo empregamos as duas metodologias, teste de difusão em ágar e teste do contato direto, para avaliar a atividade antimicrobiana da associação da clorexidina gel 2% ao hidróxido de cálcio. No teste de difusão em ágar verificamos que a clorexidina apresentou os maiores halos de inibição, o hidróxido de cálcio em veículo aquoso teve ação apenas por contato direto, enquanto que a associação dos medicamentos obteve resultados intermediários, concordando com os resultados de Gomes *et al.* (1999). A associação da clorexidina gel 2% ao

hidróxido de cálcio pode ser considerada uma pasta com veículo hidrossolúvel, dado que o natrosol (veículo do gel) é uma hidroxietilcelulose classificada por Fava & Saunders (1999) como veículo aquoso. Pode-se dizer que essa associação (clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio) permitiu a essa pasta uma maior difusão no ágar, o que não aconteceu com as outras pastas com veículos hidrossolúveis.

No teste do contato direto, a associação do hidróxido de cálcio com a clorexidina também apresentou valores intermediários em relação a inibição do crescimento dos microrganismos aeróbios e facultativo. Com relação aos anaeróbios estritos apresentou resultados estatísticos iguais aos da clorexidina e da pasta de hidróxido de cálcio com água destilada. O fato é que a associação pode ser um medicamento mais eficiente para ser utilizado principalmente nos casos de retratamento onde existe a predominância de microrganismos anaeróbios facultativos tais como *Enterococcus* spp., *Actinomyces* spp., *Staphylococcus* spp. e até mesmo *Candida* spp. (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998).

A associação teria como objetivo agir como barreira física e ter ação contra o LPS bacteriano devido à presença do hidróxido de cálcio. Além disso, visa uma maior atividade antimicrobiana com um efeito antimicrobiano residual (substantividade) devido à presença da clorexidina.

Outros testes devem ser realizados, como a verificação da ação do hidróxido de cálcio com a clorexidina sobre o LPS bacteriano, sobre biofilme simples ou

misto, redução microbiana, bem como testes de biocompatibilidade para complementar o entendimento sobre o assunto.

Nas infecções primárias onde a infecção é polimicrobiana, há predominância de microrganismos anaeróbios estritos (Dahlén & Hofstad, 1977; Sundqvist, 1976; Sundqvist *et al.* 1979; Dahlén & Bergenholtz, 1980; Sundqvist & Johansson, 1980; Griffe *et al.*, 1980; Moller *et al.*, 1981; Yoshida, 1987; Brook *et al.*, 1991; Horiba *et al.*, 1991; Baumgartner, 1992). Entretanto, esses microrganismos são extremamente sensíveis às pastas de hidróxido de cálcio com água destilada.

Os resultados obtidos, nestes trabalhos *in vitro*, fornecem informações importantes como: quais são os medicamentos mais eficazes contra determinados microrganismos, e qual o tempo necessário para eliminá-los. Entretanto, esses dados necessitam de cuidados ao extrapolar para aferições *in vivo*, pois os testes *in vitro* tentam mimetizar as condições clínicas, mas muitas vezes, elas não correspondem em sua totalidade.

7. CONCLUSÃO

Com base nos métodos experimentais empregados e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

Em relação aos irrigantes, as soluções de hipoclorito de sódio (0,5%, 1,0%, 2,5%, 4,0% e 5,25%) e a clorexidina gel e líquida (1,0% e 2,0%) poderiam ser utilizadas para este fim com relação à propriedade antimicrobiana, por apresentarem inibição de crescimento microbiano contra todos os microrganismos testados. Apenas a clorexidina gel 0,2% não estaria indicada como solução irrigadora visto que necessitou de um tempo maior para eliminar o *E. faecalis*, podendo ultrapassar o tempo normalmente utilizado para a realização do preparo químico-mecânico.

Em relação aos medicamentos intracanais estudados, a clorexidina gel 2% apresentou maior atividade antimicrobiana. A associação do hidróxido de cálcio com a clorexidina gel 2% diminuiu a atividade antimicrobiana da clorexidina, porém potencializou a do hidróxido de cálcio.

Os veículos empregados para manipular as pastas de hidróxido de cálcio afetaram sua capacidade de difusão e propriedades antimicrobianas. As pastas manipuladas com paramonoclorofenol canforado e glicerina mostraram maior atividade antimicrobiana e maior difusão no teste de difusão em agar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulkader A, Deguid R, Saunders Em. The antimicrobial activity of endodontic sealers to anaerobic bacteria. *Int Endod J*, 1996; 29: 280-283.
- Abou-Rass M, Piccinino MV. The effectiveness of four clinical irrigation methods on the removal of root canal debris. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1982; 54: 323-28.
- Akpata, E.S.; Blechman, H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall *in vitro*. *Journal Dental Research*, 1982; 61: 435-38.
- Ando, N.; Hoshino, E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. *Int Endod J*, 1990; 23: 20-27.
- Ansel, H.C.; Popovich, N.G.; Allen; L.V. Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. 6 ed. São Paulo. Editorial Premier, 2000.
- Anthony, D.R.; Gordon, T.M.; Del Rio, C.E. The effect of three vehicles on the pH of calcium hydroxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1982; 54: 560-665.
- Ayhan, H.; Sultan, M.; Çirak, M.; Ruhi, M.Z. et al. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J*, 1999; 32: 99-102.
- Barbin, E.L. Estudo *in vitro* do efeito da adição de lauril dietileno glicol éter sulfato de sódio nas soluções de hipoclorito de sódio sobre suas propriedades físico-

- químicas anteriores e posteriores à dissolução do tecido pulpar bovino. [Dissertação de Mestrado] Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 1999.
- Barbosa, S.V.; Almeida, D. HCT 20. Uma solução irrigadora para canais radiculares humanos. Análise *in vitro*. *Rev Bras Odontol*, 1987; 44: 21-8.
- Barnett F., Axelrod P., Tronstad L., Graziani A., Slots J., Talbott G. Ciprofloxacin treatment of periapical *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Endod Dent Traumatol*, 1988; 4: 132-7.
- Barthel C.R.; Levin, L.C.; Reisner, H.M.; Trope, M. TNF-alfa release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *E.coli* lipopolysaccharide. *Int Endod J*, 1996; 29: 195-210.
- Baumgartner, J.C. Serum IgG reative with oral anaerobic microorganisms associated with infections of endodontic origin. *Oral Microbiol Imunol*, 1992; 7: 106-10.
- Baumgartner, J.C.; Cuenin, P.R. Efficacy of several concentrations os sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J Endod*, 1992; 18: 605-12.
- Becking AG. Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. Report of three cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1991; 71: 346-8.
- Berk, H. The effect of calcium hydroxide - methylcellulose paste on the dental pulp. *J Dent Child*, 1950; 17: 65-8.

- Bloomfield SF, Miles GA. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. *J Appl Bacteriol*, 1979; 46: 65-73.
- Boucher, N. M. A tool to improve the biocidal efficacy of sterilands of disinfectants in hospital or dental practice. *Can J Pharm Scien*, 1979; 14: 1-12.
- Bramante, C.M.; Benatti Neto, C.; Lia, R.C.C.; Esberand, R.M. Tratamento das perfurações radiculares com pastas de hidróxido de cálcio e iodoformio., Emprego de diferentes veículos-Estudo histológico em dentes de cães. *Rev Bras Odontol*, 1986; 43: 22-30.
- Brannström M. Smear layer: pathological and treatment considerations. *Oper Dent Suppl*, 1984; 3: 35-42.
- Briseño, B. M.; Wirth, R.; Hamm, G. et al. Efficacy of different methods and concentrations of root canal irrigations on bacteria in the root canal. *Endod Dent Traumatol*, 1992; 8: 6-11.
- Brook, I.; Frazier, E.H.; Gher, M.E. Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abcess. *Oral Microbiol Imunol*, 1991; 6: 123-25.
- Bystrom. A.; Claesson, R.; Sundqvist, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, comphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol*, 1985; 1(5): 170-5.
- Bystron, A.; Sundqvist, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J*, 1985; 18: 35-40.

- Cervone, F. ; Tronstad, L. ; Hammond, B. Antimicrobial effect of chlorhexidine in a controlled release delivery system. *Endod Dent Traumatol*, 1990; 6: 33-6.
- Chong BS, Pitt Ford TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J*, 1992; 25: 97-106.
- Costa, W.F.; Antoniazzi, J.H.; Campos, N.M.C.; Pécora, J.D. Robazza, C.R.C. Avaliação comparativa sob microscopia óptica, da capacidade de limpeza da irrigação manual convencional versus ultra-sônica de canais radiculares. *Rev Paul Odontol*, 1986; 8: 50-60.
- D'arcangelo, C.; Varvara, G.; de Fazio, P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic and microaerophilic bacteria. *J Endod*, 1999; 25: 351-3.
- Dahlén, G.; Bergenholtz, G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res*, 1980; 59: 1033-40.
- Dahlén, G.; Hofstad, T. Endotoxic activities of lipopolysaccharides of microorganisms isolated from an infected root canal in *Macaca cynomolgus*. *Scand Dent Res*, 1977; 85: 272-8.
- 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*, 1982; 53: 518-23.

- Difiore, P.M.; Peters, D.D.; Setterstrom, J.A. The antibacterial effects of calcium hydroxide apexification pastes on *Streptococcus sanguis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1983; 55: 91-4.
- Eda, S. Histochemical analysis on the mechanism of dentin formation in dog's pulp. *Bull. Tokyo Dent Coll*, 1961; 2: 59-88.
- Ehrich GD, Brian D, Walker WA. Sodium hypochlorite accident: inadvertent injection into the maxillary sinus. *J Endod*, 1993; 19: 180-182.
- Estrela, C. ; Bammann, L. L.; Pimenta, F.C. et al. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J*, 2001; 34: 341-5.
- Estrela, C. ; Estrela, C. R. A. ; Moura, J.; Bammann, L.L. Testing calcium hydroxide antimicrobial potential by different methods. *J Dent Res*, 2000; 79: 529 (IADR Abstract 3081).
- Estrela, C. Efeito antimicrobiano de pastas de hidróxido de cálcio [Tese de Livre-Docência] Ribeirão Preto: FORP, Universidade de São Paulo; 1997.
- Estrela, C. R. A. Eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras de canais radiculares [Dissertação de Mestrado] Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás; 2000.
- Estrela, C.; Bammann, L.L.; Sydney, G.B.; Mouar, J. Efeito antibacteriano de pastas de hidróxido de cálcio sobre bactérias aeróbias facultativas. *Rev Fac Odont Bauru*, 1995; 3: 21-7.

- Estrela, C.; Pesce, H.F. Chemical analysis of the formation of calcium carbonate and its influence on calcium hydroxide pastes in the presence of connective tissue of the dog. Part II. *Braz Dent J*, 1997; 8: 45-53.
- Estrela, C.; Pesce, H.F. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide pastes in the presence of connective tissue of the dog. Part I. *Braz Dent J*, 1996; 7: 41-6.
- Estrela, C.; Pimenta, F.C.; Ito, I.Y.; Bammann, L.L. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *J Endod*, 1999; 25: 416-8.
- Estrela, C.; Pimenta, F.C.; Ito, I.Y.; Bammann, L.L. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. *J Endod*, 1998; 24: 15-7.
- Estrela, C.; Sydney, G.B. EDTA effect at root dentin pH then exchange of calcium hydroxide paste. *Braz Endod J*, 1997; 2: 12-7.
- Estrela, C.; Sydney, G.B.; Bammann, L.L.; Felipe Jr., O. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. *Rev Fac Odont Bauru*, 1994; 2: 29-36.
- Fava LRG; Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J*, 1999 ; 32: 257-82.
- Fava, L.R.G. Efeito antibacteriano das pastas de hidróxido de cálcio. Revisão. *Rev Paul Odontol*, 1993; 15: 10-6.

- Ferraz CC, Figueiredo de Almeida Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod*, 2001; 27: 452-5. (a)
- Ferraz CCR Avaliação *in vitro* do gel de Clorexidina usado como irrigante Endodôntico [Tese Doutorado] Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 1999. (b)
- Ferraz CCR, Gomes NV, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Apical extrusion of debris and irrigants using two hand and three engine-driven instrumentation techniques. *Int Endod J*, 2001; 34: 354-8. (c)
- Ferreira, A.C.S.; Almeida, D.; Fonseca, G. Avaliação do poder bacteriostático e bactericida do hidróxido de cálcio utilizado como curativo de demora nos canais radiculares. *Rev Bras Odontol*, 1978; 35: 15-21.
- Foley, D. B.; Weine, F.S.; Hagen, J.C.; Deobarrio, J. J. Effectiveness of selected irrigants in the elimination of *Bacteroides melaninogenicus* from the root canal system: an *in vitro* study. *J Endod*, 1983; 9: 236-41.
- Frank AL. Therapy for divergent pulpless tooth by continued apical formation. *J Am Dent Ass*, 1966; 72: 87-93.
- Friedman S, Shani J, Stabholz A, Kaplawi J. Comparative sealing ability of temporary filling materials evaluated by leakage of radiosodium. *Int Endod J*, 1986; 19: 187-93.

- Georgopoulou, M.; Kontakiotis, E.; Nakou, M. In vitro evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonoclorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. *Endod Dent Traumatol*, 1993; 9: 249-53.
- Georgopoulou, M.; Kontakiotis, E.; Nakou, M. Evaluation of the antimicrobial effectiveness of critic acid and sodium hypochlorite on the anaerobic flora of the infected root canal. *Int Endod J*, 1994; 27: 139- 43.
- Gomes BPFA., Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Variations in the susceptibility of selected microorganisms to endodontic irrigants. *J Endod*, 1999; 25: 299 (BES Spring Meeting abstract).
- Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J*, 1996; 29: 235-41.
- Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. **Negative and positive associations between bacterial species in root canals.** *Microbios*, 1994; 80: 231-43.
- Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB 1995 Recovery of *Porphyromonas endodontalis* and *P.gingivalis* by two different sampling techniques. *J Dent Res*, 1995; 74: 848.
- Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent*, 1996; 24: 47-55.
- Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J*, 1996; 29: 235-41.

- Griffiee, M.B.; Pattersons, S.; Miller, C.H.; Kafrawy, A. H.; Newton, C.W. The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* associated with pulpal necrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1980; 50: 457-61.
- Grossman, L. I.; Meimam, B. W. Solution of pulp tissue by chemical agent. *J Am Dent Ass*, 1941; 28: 223-5 .
- Haapasalo, H. K.; sirén, E. K.; Waltimo, T.M.T.et al. Inactivation of local root canal medicaments by dentine; an *in vitro* study. *Int Endod J*, 2000; 33: 126-31.
- Haapasalo, M.; Orstavik, D. "*In vitro*" infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res*, 1987; 66: 1375-9.
- Harrison JW. Irrigation of the root canal system. *Dent Clin North Am*, 1984; 28: 797-808.
- Harrison, J. W.; Wagner, G. W. ; Henry, C.A. Comparison of the antimicrobiol effectiveness of regular and fresh scent clorox. *J Endod*, 1990; 16: 328-30.
- Harrison, J.W.; Hand, R.E. The effect dilution and organic matter on the antibacterial property of 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod*, 1981; 7: 128-32.
- Harrison, J.W.; Madonia, J.V. The toxicity of paraclorophenol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1971; 32: 90-9.
- Heggens JP, Sazy AJ, Stenberg BD, Strok LL, Mccauley RL, Hernos DN, Robson MC. Bacterial and wound-healing properties of sodium hypochlorite solutions. The 1991 Linderberg Award. *J. Burn Car Rehab*, 1991; 12: 420-4.

- Heitersay, G.S. Calcium hydroxide in the treatment of pulpes teeth with associated pathology. *J Brit Endod Soc*, 1975; 8: 74-93.
- Helgeland, K.; Heyden, G.; Rolla, G. Effect of chlorhexidine on animals cells "*in vitro*". *Scand J Dent Res*, 1971; 79: 209-15.
- Heling I, Sommer M, Steinberg D, Friedman M, Sela MN. Microbiological evaluation of the efficacy of chlorhexidine in a sustained-release device for dentine sterilization. *Int Endod J*. 1992; 25: 15-9.
- Heling M, Steinberg D, Kenig S, Gavrilovich I, Sela MN, Friedman M. Efficacy of a sustained-release device containing chlorhexidine and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in preventing secondary infection of dentinal tubules. *Int Endod J*, 1992; 25: 20-4.
- Hennessey, T.D. Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Periodontol Res*, 1973; 12: 61-7.
- Holland, R. ; SOUZA, V. Resposta da conjuntiva do olho de coelho a algumas substâncias empregadas na desinfecção dos canais radiculares. *Rev Odontol Unesp*, 1978.
- Holland, R. Emprego tópico de medicamentos no interior dos canais radiculares. *Odonto Master*, 1994; 1: 23-35.
- Holland, R.; Souza, V.; Mello, W.; Nery, M.J.; Bernabé, P.F.E.; Otoboni Filho, J.A. A histological study of the effect of calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth of dogs. *J Brit Endod Soc*, 1979; 12:15-23.

- Holland, R.; Souza, V.; Nery, M.J. Melo, W.; Bernabé, P.F.E. Root canal treatment with calcium hydroxide. Effect of an oil water soluble vehicle. *Rev Odontol Unesp*, 1983; 12: 1-6.
- Horiba, N.; Maekawa, Y.; ITO, M. Matsumoto, T.; Nakamura, H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1991; 71: 492-95.
- Ingle JI, Mullaney TA, Grandich RA, Taitor JF, Fahid A. Endodontic cavity preparation. In: Ingle JI, Tainter JF, eds. *Endodontics*, 3rd ed. Philadelphia, PA, USA: Lea and Febiger, 1985.
- Jeansonne, M. J.; White, R. R. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial irrigants. *J Endod*, 1994; 20: 276 - 8.
- Jung IY, Choi BK, Kum KY, Roh BD, Lee SJ, Lee CY, Park DS. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod*, 2000; 26:599-604.
- Kenedy GDC, Mclundie AC, Day RM. Calcium hydroxide – its role in a simplified endodontic technique. *Dent. Mag. Oral Top*. 84: 51-57, 1967.
- Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *J Endod*, 2000 26:315-7.
- kozol RA, Gillies C, Elgebaly AS. Effects of sodium hypochlorite (Dakin's solution) on cells of the wound module. *Arch Surg*, 1988; 123: 420-3.

- Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald DR. Oral Surgery, Oral medicine and Oral Pathology, 1965; 20: 340-9.
- Kuruvilla, J. R.; Kamath, P. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, endodontic irrigants. *J Endod*, 1998; 24:472-6.
- Labriola JD, Mascaro J, Alpert B The microbiologic flora of orofacial abscesses. *J Oral Max Surg*, 1983; 41: 711-4.
- Lage-Marques JL, Conti R, Antoniazzi JH, Gutz I. Avaliação iônica do hidróxido de cálcio associado a diferentes veículos. *Rev Odontol Uni São Paulo*, 1994; 2: 81-7.
- Laws, A J. Calcium hydroxide as a possible root filling material. *New Zeal Dent J*, 1962; 58: 199-215.
- Lenet BJ, Komorowski R, Wu XY, Huang J, Grad H, Lawrence HP, Friedman S. Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. *J Endod*, 2000; 26: 652-5.
- Leonardo, M.R.; Silva, R.S.; Silva, L.A.B.; Assed, S. Determinação de íons Ca^{+2} , pH e solubilidade de pastas de hidróxido de cálcio contendo PMC e PMCC. *Rev Bras Odontol*, 1993; 50: 5-10.
- Lopes, H.P.; Costa F, A.S. O emprego do hidróxido de cálcio associado ao azeite de oliva. *Rev Gaúcha Odontol*, 1986; 34: 306-13.

- Lopes, H.P.; Estrela, C. Elias, C.N. Comparative study of calcified bridge after pulpotomy and the use of calcium hydroxide associated with different vehicles. *Braz Endod J*, 1996; 1:39-43.
- Lopes, H.P.; Estrela, C.; Siqueira, J.; Fava, L.R. Considerações químicas, microbiológicas e biológicas do hidróxido de cálcio. *Odonto Master*, 1996; 1:1-17.
- Maisto, O.A.; Capurro, M.A. Obturación de conductos radiculares con hidróxido de cálcio-iodofórmio. *Rev Ass Odontol Argentina*, 1964; 52: 167-173.
- Marques, A.M.C. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras à base de clorexidina em diferentes concentrações sobre microorganismos freqüentemente encontrados no canal radicular. Estudo *in vitro* [Dissertação de Mestrado] Salvador, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia; 1997.
- Mitchell, O.F.; Shankawalker, G.B. Osteogenic potencial of calcium hydroxide and other materials in soft tissue and bone wounds. *J Dent Res*, 1958; 37: 1157-63.
- Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*, 1998; 31:1-7.
- Möller, A.J.R.; Fabricus, L.; Dahlén, G.; Öhman, A.E.; Heyden, G. Influence on periapical tissues of indigeneous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res*, 1981; 89: 475-84.

- Nikolaus, B. E. ; Wayman, B. E.; Encinas, E. The bactericidal effect of citric acid and sodium hypochlorite on anaerobic bacteria. *J Endod*, 1988; 14: 31-4.
- Ohara, P. K.; Torabinejad, M.; Kettering, J. D. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected bacteria. *Endod Dent Traumatol*, 1993; 9: 95-100.
- Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol*, 1990; 6:142-9.
- Ørstavik D.; Kerekes K.; Molven O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study. *Int Endod J*, 1991; 24: 1-7.
- Paiva, J.G.; Antoniazzi, J.H. Endodontia - Bases para a prática clínica. São Paulo: Artes Médicas, 2 ed. 1988.
- Pécora, J.D. ; Souza Neto, M. D.; Estrela, C. Soluções auxiliares do preparo do canal radicular. In: Estrela, C. ; Figueiredo, J. A. P. Endodontia: princípios biológicos e mecânicos. São Paulo: Artes Médicas, 1999. Cap. 16 : p. 553-69.
- Pécora, J.D.; Souza Neto, M.D.; Saquy, P.C. et al. Effect of Dakin's and EDTA solutions on dentin permeability of root canals. *Braz Dent J*, 1993; 4: 79-84.
- Pucci, F.M. Conductos radiculares. Vol. II, Casa A. Barreiro y Ramos S.A., Montevideo, 1944/45 p. 344-77.

- Pupo J, Biral RR, Benatti O, Abe A, Valdrighi L Antimicrobial effects of endodontic filling cements on microorganisms from root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1983; 55: 622-7.
- Pupo, J. ; Biral, R. R. ; Almeida, O. P. Atividade antimicrobiana de soluções para irrigação de canais radiculares. *Rev Gaúcha Odontol*, 1994; 42: 17-9.
- Ringel, A. M.; Patterson, S. S.; Newton, C.W. In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *J Endod*, 1982; 8: 200-4.
- Rolla, G.; Melsen, B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexedine. *J Dent Res*, 1975; 54: 57-62.
- Safavi, K.E.; Nichols, F.C. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod*, 1993;19: 76-78.
- Safavi, K.E.; Nichols, F.C. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod*, 1994; 20: 127-9.
- Safavi, K.E.; Spangberg, L.S.W.; Langeland, K. Root canal dentinal tubule disinfection. *J Endod*, 1990; 16: 207-10.
- Salzgeber RM, Brilliant JD 1977 An *in vivo* evaluation of the penetration of an irrigating solution in root canals. *J Endod*, 1977; 3: 394-98.
- Sen, B. H.; Safavi, K. E. ; Spangberg, L. S. W. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. *J Endod*, 1999; 25: 235-38.

- Silva, C.H.F.P.; Lima, K.C.; Siqueira Jr., J.F. et al. Dentinal tubule disinfection by chlorhexidine solutions: na in vitro study. *Braz Endod J*, 1997; 2: 55-7.
- Silva, L.A.B.; Leonardo, M.R.; Utrilla, L.S. Rizogênese incompleta. Efeito de diferentes pastas à base de hidróxido de cálcio na complementação radicular e reparação periapical de dentes de cães. Estudo histológico. *Revista de Odontologia da USP*, 1991; 5: 29-36.
- Siqueira JR. JF, Lopes HP. Microbiologia Endodôntica. In: Lopes HP & Siqueira Jr. JF, eds. *Endodontia: Biologia e Técnica*. Rio de Janeiro, RJ: Medsi. 1999 pp. 185-216.
- Siqueira Jr., J.F.; Magalhães, F.A.C.; Uzeda, M. Avaliação da atividade antibacteriana da medicação intracanal. *Rev Gaúcha Odontol*, 1996; 44.
- Siqueira Junior JF, de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod*, 1996; 22: 674-6.
- Siqueira Junior JF, de Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod*. 1997; 23: 167-9.
- Siqueira Junior, J. F. ; Batista, M. D. M. ; FRAGA, R.C. et al. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod*, 1998; 24:414-6.

- Sjögren, V.; Figdor, D.; Spangberg, L.; Sundqvist, G. The antimicrobial effects of calcium hydroxide as a short-term intra-canal dressing. *Int Endod J*, 1991; 24: 119-25.
- Souza, M.M.; Souza, M.C.M.G.; Saquy, P.C.; Pécora, J.D. Ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e tempos de contato. *Odontol*, 1992; 2: 302-6.
- Souza, V.; Holland, R.; Nery, M.J.; Mello, W. Emprego de medicamentos no interior dos canais radiculares. Ação tópica e a distância de algumas drogas. *Ars Curandi*, 1978; 5: p.4-15.
- Spangberg LSW. Intracanal medication. In: Ingle JI e Bakland LK, eds. *Endodontics*. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
- Stamos, D.G.; Haasch, G.C.; Gerstein, H. The pH of local anesthetic/calcium hydroxide solutions. *J Endod*, 1985;11:264-5.
- Sundqvist G. 1992 Association between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiology and Immunology*, 1992; 7: 257-62.
- Sundqvist G. 1992 Ecology of the root canal flora. *J Endod*, 1992; 18: 427-30.
- Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. 1989 Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. *J Endod*, 1989; 15: 13-9.
- Sundqvist, G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps [Dissertation Master] Umea: University of Umeo, Sweden; 1976.

- Sundqvist, G.; Eckerbom, M.I.; Larsson, A.P., Sjögren, U.T. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect Immun*, 1979; 25: 685-93.
- Sundqvist, G.; Johansson, E. Neutrophil chemotaxis induced by anaerobic bacteria isolated from necrotic dental pulps. *Scand J Dent Res*, 1980; 88: 113-21.
- Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J*, 1998; 31: 311-25. Review.
- Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LAB, Anibal EF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J*, 2002; 35: 735-9.
- Tanomaru Filho, M. Comportamento dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães portadores de reação periapical crônica em função da técnica de neutralização do conteúdo séptico-tóxico e do cimento obturador empregado no tratamento endodôntico [Tese Doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP; 1996.
- Tobias, R.S. Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. *Int Endod J*, 1988; 2: 155-60.
- Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod*. 1980; 7:17-21.
- Tronstad L. Clinical Endodontics. New York, Thieme, 1991: 167-83.

- Vahdaty, A.; Pitt Ford, T.R.; Wilson, R.F. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules *in vitro*. *Endod Dent Traumatol*, 1993; 9: 243 -8.
- Vande Visse JE, Brilliant JD. Effect of irrigation on the production of extruded material at the root apex during instrumentation. *J Endod*, 1975; 1: 243-6.
- Walker, A. A definite and dependable therapy for pulpless teeth. *J Am Dent Ass*, 1936; 23: 1418-25.
- Walker, C. Antimicrobial Agents and Chemotherapy I. In: SLOTS, J.; TAUBMAN, M.A. Oral microbiology and immunology. St. Louis: Mosby Year Book, 1992. Cap. 15 : p. 5242-64.
- White RR, Goldman M, Lin PS. The influence of the smeared layer upon dentinal tubule penetration by plastic filling materials. *J Endod*, 1984; 10: 558-62.
- White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod*, 1997; 23: 229-31.
- Winkler, K.C. Bacteriologic results from 4000 root canal cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1959; 12: 857-75.
- Yesilsoy Cwhitaker, E.; Cleveland, D.; Phillips, E. *et al.* Antimicrobial and toxic effects of established and potencial root canal irrigants. *J Endod*, 1995;21: 513-5.
- Yoshida, M. Correlation between clinical symptoms and microorhganisms isolated from root canals of teeth peripical pathosis. *J Endod*, 1987;13: 24-8.
- Zerlotti, E. Contribuição à terapêutica dos condutos radiculares. [Tese de Doutorado] Campinas: Faculdade de Odontologia de Campinas; 1959.

10. APÊNDICE

10. 1. Meios de cultura

10.1.1. Fastidious Anaerobe Agar (FAA) – LAB M (Bury, UK)

10.1.1.1. Descrição

Meio capaz de favorecer o crescimento dos anaeróbios isolados clinicamente. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Amido e bicarbonato atuam como agentes desintoxicantes, enquanto a hemina favorece a produção de pigmento nos "*Bacteroides*" produtores de pigmento preto. Vitamina K e succinato de sódio fornecem fatores essenciais de crescimento para alguns anaeróbios, como também 0,1% de glicose. O nível baixo de glicose impede a produção de níveis elevados de ácidos e álcoois que podem inibir o crescimento bacteriano.

10.1.1.2. Preparo

Adicionar 23,0 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. Então adicionar assepticamente 5% de sangue de carneiro desfibrinado, misturar bem e distribuir nas placas de petri.

10.1.1. 3. Aparência

Vermelho devido à adição de sangue. O meio fica escuro (reduzido) mais tarde devido à adição de redutores.

10.1.1.4. Armazenagem

Placas: até 7 dias a 4 °C no escuro.

10.1.1. 5. Inoculação

Em superfície.

10.1.1.6. Incubação

37 °C anaerobicamente, por períodos de 48 horas e 7 dias.

10.1.1.7. Fórmula

	g/L
Mistura de peptonas	23,0
Cloreto de sódio	5,0
Amido	1,0
Agar no. 2	12,0
Glicose	0,4
Piruvato de sódio	1,0
HCL cisteína monoidratada	1,0
Hemina	0,5
Vitamina K	0,001
L-arginina	1,0
Pirofosfato solúvel	0,25
Succinato de sódio	0,5
pH: 7,4 ± 0,2	

10.1.2. Fastidious Anaerobe Broth (FAB) - LAB M (Bury, UK)

10.1.2.1. Descrição

Meio de cultura líquido capaz de favorecer o crescimento de bactérias anaeróbias e facultativas. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Vitamina K, hemina e L-cisteína são também fatores de crescimento para alguns anaeróbios. L-cisteína e tioglicolato de sódio reduzem o Eh (redox) do meio e o ágar inibe a absorção do oxigênio.

10.1.2. 2. Preparo

Dispensar 14,85g do pó em 500 mL de água deionizada. A mistura é dispensada em tubos que são deixados semiabertos durante a esterilização, que é feita por autoclavagem a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a autoclavagem.

10.1.2.3. Aparência

Amarelo claro.

10.1.2.4. Armazenagem

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

10.1.2.5. Inoculação

Se usado como meio de cultura com sangue, uma diluição mínima de 1:10 deve ser usada.

10.1.2.6. Incubação

37 °C por 24-72 horas. Tubos bem fechados.

10.1.2.7. Fórmula

	g/L
Mistura de peptonas	15,0
Cloreto de sódio	2,5
Extrato de levedura	1,0
Agar no. 1	0,75
L-cisteína	0,5
Hemina	0,005
Vitamina K	0,005
Resazurina	0,001
Bicarbonato de sódio	0,4
pH: 7,4 ± 0,2	

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

10.1.3. 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.

10.1.3. 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.

10.1.3.3. Aparência

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

10.1.3.4. Armazenagem

Placas: até 7 dias a 4°C no escuro.

10.1.3.5. Inoculação

Em superfície.

10.1.3.6. Incubação

Tempo e temperatura para cada microrganismo.

10.1.3.7. Fórmula

	g/L
Infusão de sólidos de cérebro e coração	17,5
Proteose petona	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	

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

10.1.4.1. 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 a produção de ácido.

10.1.4.2. 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.

10.1.4.3. Aparência

Amarelo claro.

10.1.4.4. Armazenagem

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

10. 3.4.5. 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.

10.1.4.6. Incubação

37 °C aerobicamente até 15 dias.

10.1.4.7. 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	

10.1.5. Mueller-Hinton Agar (MHA; Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, Inglaterra)

10.1.5.1. Descrição

Meio para testes de sensibilidade antimicrobiana onde pode se utilizar todas as técnicas standardizadas reconhecidas internacionalmente como por exemplo o método de difusão usando discos ou poços. Este meio, usado na técnica de Bauer-Kirby, foi adotado pelo "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) nos EUA como um meio ideal para teste de suscetibilidade. O meio tem uma pequena quantidade de timina e timidina, permitindo seu uso nos testes de trimetropim e sulfonamida para assegurar os tamanhos corretos dos halos de inibição obtidos pelos antibióticos aminoglicosídeos e tetraciclina. Foi formulado como um meio para isolamento de espécies patogênicas de *Neisseria*.

10.1.5.2. Método para reconstituição

Dispensar 19,0 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min e depois agitada. E esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47°C. Misturar bem e distribuir nas placas de petri.

10.1.5.3. Aparência

Amarelo claro (sem sangue).

10.1.5.4. Armazenagem do meio preparado

Placas: até 7 dias a 4 °C no escuro.

10.1.5.5 Inoculação

Em superfície, de acordo com o NCCLS.

10.1.5.6 Incubação

37°C aerobicamente por 16-18 h

10.1.5.7. Fórmula

	g/L
Carne de vaca, de infusão desidratada	300,0
Hidrolisado de caseína	17,5
Amido	1,5
Agar no. 1	17,0
Ions cálcio	50-100 mg/L
Ions magnésio	20-35 mg/L
pH: 7,4 ± 0,2	

10.2. 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 que utilizaram o método do contato direto.

10.2.1. Neutralizadores da clorexidina

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

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 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.

10.2.2. Neutralizador do Hipoclorito de Sódio

0,6 % de tiosulfato de sódio

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 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.

10.2.3. Neutralizador do hidróxido de cálcio

0.5 % de ácido cítrico

Preparo

Previamente à esterilização, deve-se adicionar 0.5 g de ácido cítrico 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 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.

10.3. Kits de identificação microbiana

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

10.3.1.1. 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".

10.3.1.2. 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

10.3.1.3. 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 de acordo com o quadro do item

10.3.1.4. 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”.

10.3.2. API Staph (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France)

10.3.2.1. Descrição

Api Staph (# 20 500) é um sistema de identificação dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* utilizando testes bioquímicos padronizados. O sistema consiste de uma tira contendo substratos desidratados em microtubos individuais. Os testes são realizados adicionando a cada tubo uma alíquota do meio “Api Staph Medium” que foi inoculado com a amostra bacteriana a ser estudada. Cada Kit contém 25 tiras, recipientes para incubação, ampolas de “Api Staph Medium”, folhas de resultados e um manual do Kit. A identificação das amostras pode ser interpretada no catálogo “Api Staph Analytical Profile Index” (BioMérieux, ref. 20 590).

10.3.2.2 Materiais

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

- Reagentes: VP 1, VP 2, NIT 1, NIT 2, ZYM A, ZYM B
- Padrão de McFarland
- Pipetas plásticas
- Swabs estéreis
- Óleo mineral
- Catálogo: Api Staph Analytical Profile Index

10.3.2.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sangue por 18-24 horas a 37°C. 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 positiva e aeróbios ou anaeróbios facultativos.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido “Api Staph Medium” para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 0,5.

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 Staph com o inóculo bacteriano preparado no “Api Staph Medium”, evitando a formação de bolhas. Após preencher toda a tira, os tubos contendo os testes da arginina (ADH) e uréia (URE) são preenchidos com óleo mineral para promover anaerobiose. O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37 °C por 18-24 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP 1 e VP 2 no teste do piruvato de sódio (VP); NIT 1 e NIT 2 no teste do nitrato de potássio (NIT); e ZYM A e ZYM B no teste do ácido β -naftil fosfato (PAL). Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas de acordo com o quadro do item 2.4. 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 Staph Analytical Profile Index”.

10.3.3. Api 20 C AUX (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France)

10.3.3.1. Descrição

Api 20 C AUX é um sistema de identificação preciso para a maioria dos fungos encontrados na clínica microbiológica.

O API 20 C AUX consiste em 20 microtubos contendo substratos desidratados para demonstração da atividade enzimática ou fermentação de açúcares. Os microtubos são inoculados com um meio semi-sólido e os fungos crescerão apenas se forem capazes de utilizar cada substrato. As reações são lidas em comparação com o crescimento controle e identificação é obtida pelo catálogo *Analytical Profile Index* ou usando um programa computadorizado de identificação.

10.3.3.3. Materiais

Um Kit contém:

- 25 fitas API 20 C AUX
- 25 caixas para incubação
- 25 ampolas de C Medium
- 25 folhas de resposta

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

Meio para suspensão: Suspension Medium (2 mL) ou NaCl 0,85% (2 mL)

- Ágar Sabouraud

- Padrão de McFarland #2
- Pipetas plásticas
- Óleo mineral
- Catálogo: API 20 C AUX Analytical Profile Index ou programa computadorizado de identificação
- Rack para ampolas

Equipamentos laboratoriais requeridos:

- Estufa de incubação a 30 °C
- Refrigerador
- Bico de Bunsen
- Caneta para vidro

10.3.3.4. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sabouraud 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 em 2 mL meio para suspensão "Suspension Medium" ou em água destilada estéril, para

formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 2. São colocados 100 μ L no tubo "C Medium".

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do API C AUX com o inóculo bacteriano preparado C Medium. Evite a formação de bolhas. Incubar a 30°C por 48-72 horas.

Após o período de incubação checar o crescimento, após 48 h o GLU deve estar mais turvo que o controle (cúpula "0" da galeria) para ser interpretada a leitura de toda galeria. Através do catálogo "Analytical Profile Index" os resultados numéricos obtidos pelas reações podem ser identificados.

10.3.4. Rapid ID 32 A (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France)

10.3.4.1. Descrição

Rapid ID 32 A é um sistema de identificação para anaeróbios utilizando testes enzimáticos estandardizados e em miniauturas. Cada Kit contém 25 fitas, recipientes para incubação, folhas de resultados e um manual do Kit. Cada fita consiste de 32 cúpulas, 29 das quais são utilizadas para testes e contêm substratos desidratados. Após o período de incubação de 4 horas, as reações podem ser lidas visualmente, e a identificação obtida usando o catálogo "Rapid ID 32 A Analytical Profile Index."

10.3.4.2. Materiais

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

Meio para suspensão: Suspension Medium, 2 ml

- Reagentes: JAMES, NIT 1, NIT 2, FB
- Padrão de McFarland
- Pipetas
- Swabs estéreis
- Óleo mineral
- Catálogo: Rapid ID 32 A Analytical Profile Index
- Placas de ágar-sangue com suplementos para o crescimento de bactérias anaeróbias.

Equipamentos laboratoriais requeridos:

- Estufa de incubação a 37 °C
- Refrigerador
- Bico de Bunsen
- Cabine ou jarra de anaerobiose

10.3.4.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas contendo Fastidious Anaerobe Agar mais sangue de carneiro desfibrinado por 24-48 horas a 37 °C anaerobicamente. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido "Suspension Medium" ou em água destilada estéril para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4,0.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher as cúpulas com o inóculo bacteriano preparado no "Suspension Medium". Duas gotas de óleo mineral são adicionadas a cúpula URE (1.0). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37 °C anaerobicamente por 4 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes NIT 1 e NIT 2 no teste do NIT (cúpula 0.0) para verificar a redução de nitratos; JAMES no teste IND (cúpula 0.1) para verificar a produção de indol; e FB nos testes de PAL a SerA

(cúpula 0.2 a 0.E). Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas de acordo com o quadro do item

10.3.4.4. 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 "Rapid ID 32 A Analytical Profile Index".

10.3.5. Rapid ANA II (Remel Inc., Lenexa, KS, USA)

10.3.5.1 Descrição

O sistema Rapid ANA II é um método miniaturizado empregado para identificação bioquímica de substratos cromogênicos e convencionais, neste caso, de bactérias anaeróbias clinicamente significantes.

Cada "kit" consiste de 20 recipientes para testes de Rapid ANA II, bloco de anotações para os resultados, manual de instruções, manual de dados (Rapid ANA II System Code Compendium) e 1 frasco de reagente Rapid ANA II.

Cada recipiente de Rapid ANA II contém 10 cavidades com reações (reações desidratadas) e proporciona 18 scores de teste. As cavidades de 3 a 10 são bifuncionais, contendo 2 testes diferentes na mesma cavidade. Teste bifuncional significa que o primeiro score é obtido sem adição do reagente, mostrando o primeiro resultado do teste. Na mesma cavidade é observado outro score com a adição do reagente fornecendo o resultado do segundo teste. A identificação é obtida após 4 horas de incubação.

O recipiente de teste Rapid ANA II e reagentes devem ser estocados a 2-10° C. O fluido para inoculação Rapid (Rapid Inoculation Fluid), deve ser estocado a 15-30° C, na embalagem original.

10.3.5.2 Materiais:

- a) 25 tubos fechados contendo em cada 1 mL de fluido de inoculação RapID (#25-102)

KCl.....7,5g
CaCl₂.....0,5g
Água deionizada.....1000 mL
pH: 7,5-9,5.

- b) 1 frasco contendo 15 mL de reagente Innova Spot Indole (#30-9002).
c) 1 frasco contendo reagente suficiente para 20 recipientes de RapID ANA II Reagent

- d) Ingredientes reativos:

3-fenil 4-metilaninoacrolein.....0,01 %
Ácido hidrocloreídrico.....0,1 %
Ácido acético.....1 %
Detergente.....0,1 %

- e) Swabs estéreis
f) Pipetas estéreis.
g) Padrão McFarland: 3
h) Placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado.
i) Jarras para anaerobiose + gerador de anaerobiose (Anaerogen-OXOID, Hampshire-Inglaterra) + indicadores de anaerobiose (OXOID, Hampshire-Inglaterra) ou Câmara de anaerobiose.

10.3.5.3 Procedimentos para identificação

Os microrganismos são subcultivados em placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro por 18 a 24 horas a 37° C. As culturas puras são primariamente checadas pela morfologia da colônia, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um *swab* estéril é usado para inoculação das colônias bacterianas no fluido de inoculação RapID. A suspensão do microrganismo que será testado deve atingir no mínimo o equivalente ao padrão MacFarland 3 (uma suspensão com turbidez menor que o padrão MacFarland 3 pode comprometer o desenvolvimento do teste). As suspensões são agitadas (se necessário) e usadas até 15 minutos do preparo. A película de proteção do recipiente é devidamente deslocada para a inoculação bacteriana.

Uma pipeta estéril é introduzida na suspensão bacteriana e todo o conteúdo é transferido para o recipiente de teste, na cúpula do canto direito superior. O recipiente para teste é então selado novamente pela película de proteção, mantendo-o em posição horizontal em superfície plana. Este é gentilmente inclinado, de forma que a suspensão seja distribuída uniformemente nas cúpulas superiores. Em seguida o recipiente é inclinado aproximadamente 45° C durante 4 horas.

Após a incubação do recipiente, cada cavidade é examinada quanto à reação enzimática, observando presença ou ausência de coloração, sendo este o primeiro resultado.

Ao adicionarmos os reagentes nas cavidades de teste específicas, obtém-se o segundo resultado, através da reação do reagente e observando-se a alteração de cor.

O resultado obtido é comparado com o padrão, que é encontrado no manual de dados.

10.4. Câmara de anaerobiose (Don-Whitley Scientific, Bradford, U.K.)

A câmara de anaerobiose consiste em uma câmara de incubação, feita de resina acrílica e tem a capacidade de armazenar placas de petri de até 180 x 90 mm. O acesso à cabine feito através de portas com luvas de borracha.

Um controlador de temperatura digital indica e mantém uma temperatura constante no interior da cabine.

A cabine utiliza o sistema "Anotox" e o catalisador Palladium Deoxo "D" para manter anaerobiose estrita dentro da cabine e evitar a formação de metabólitos voláteis tóxicos. A função do "Anotox" é purificar a atmosfera pela remoção de ácidos graxos voláteis e hidrogênio sulfúrico da atmosfera. A função do catalisador Palladium Deoxo "D" é catalisar rastros de oxigênio dentro da câmara via hidrogênio, o qual também está dentro da câmara. O vapor de água produzido pelo catalisador é removido automaticamente por um sistema de controle de umidade. O catalisador Palladium Deoxo "D" e o "Anotox" devem ser trocados uma vez por ano no serviço de manutenção. Se eles ficarem muito úmidos durante o uso, devem ser removidos e secados. O "Anotox" que é feito de material plástico deve ser seco numa incubadora com temperatura de 37°C – 60°C por algumas horas. O sachê catalisador que é feito de aço inoxidável deve ser seco em forno a 160°C por uma ou duas horas.

O controle de anaerobiose no interior da cabine é feito com uma solução de azul de metileno ou outro indicador de redução de oxigênio.

A cabine apresenta um controle de umidade que permite que qualquer excesso de umidade condensado nas placas seja canalizado para fora da câmara.

A iluminação na cabine é feita por luzes fluorescentes.

10. 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

10.5.1. Capítulo 1

10.5.1.1. Análise estatística: Tempo de contato necessário para cada irrigante produzir culturas negativas contra *E. faecalis*

Tabela 1. Transformação dos valores (tempos) das clorexidinas em segundos para realização dos testes estatísticos (expressos na tabela pela média de cada sextuplicata)

Irrigantes	<i>Enterococcus faecalis</i>
Clorexidina Gel 0,2%	7200 ¹
Clorexidina Gel 1,0%	900 ²
Clorexidina Gel 2,0%	60 ³
Clorexidina Liq. 0,2%	30 ⁴
Clorexidina Liq. 1,0%	15 ⁵
Clorexidina Liq. 2,0%	15 ⁶
Hipoclorito de sódio 0,5%	1800 ⁷
Hipoclorito de sódio 1,0%	1200 ⁸
Hipoclorito de sódio 2,5%	600 ⁹
Hipoclorito de sódio 4,0%	300 ¹⁰
Hipoclorito de sódio 5,25%	15 ¹¹

Fonte: Tabela 1, Capítulo 1.

Números sobrescritos: correspondem às colunas dos dados, na planilha do BioEstat, utilizados para realizar os testes estatísticos.

10.5.1.1.1 Teste de aderência à curva normal: Valores originais (Programa GMC, Ribeirão Preto, SP)

Tabela 1. Frequências por intervalos de classe:

Intervalos de classe	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal	0,44	5,40	24,20	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental	0,00	0,00	45,45	45,45	0,00	0,00	9,09

Tabela 2. Cálculo do Qui-quadrado: (Programa GMC, Ribeirão Preto, SP)

		Interpretação
Graus de liberdade	4	Distribuição amostral testada
Valor do Qui quadrado	54,44	Não normal
Probabilidade de Ho	0,0000%	

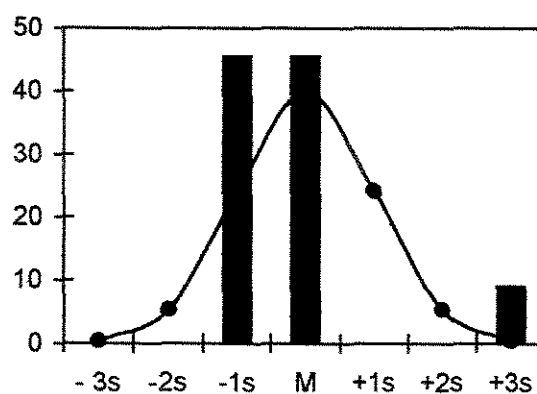


Fig1 . Histograma & Curva normal

10.5.2. Capítulo 2

10.5.2.1. Análise estatística: Clorexidina

Tabela 1. Transformação dos valores (tempos) das clorexidinas em segundos para realização dos testes estatísticos (expressos na tabela pela média de cada sextuplicata)

Clorexidina	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. endodontalis</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>
Gel 0.2%	600 ¹	7200 ²	600 ³	15 ⁴	15 ⁵	15 ⁶
Gel 1.0%	30 ⁷	900 ⁸	15 ⁹	15 ¹⁰	15 ¹¹	15 ¹²
Gel 2.0%	15 ¹³	60 ¹⁴	15 ¹⁵	15 ¹⁶	15 ¹⁷	15 ¹⁸
Liq. 0.2%	15 ¹⁹	30 ²⁰	15 ²¹	15 ²²	15 ²³	15 ²⁴
Liq. 1.0%	15 ²⁵	15 ²⁶	15 ²⁷	15 ²⁸	15 ²⁹	15 ³⁰
Liq. 2.0%	15 ³¹	15 ³²	15 ³³	15 ³⁴	15 ³⁵	15 ³⁶

Fonte: Tabela 1, Capítulo 2.

Números sobrescritos: correspondem às colunas dos dados, na planilha do BioEstat, utilizados para realizar os testes estatísticos.

10.5.2.1.1. Teste de aderência à curva normal: Valores originais (Programa GMC, Ribeirão Preto, SP)

Tabela 1. Freqüências por intervalos de classe:

Intervalos de classe	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal	0,44	5,40	24,20	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental	0,00	0,00	0,00	94,44	2,78	0,00	2,78

Tabela 2. Cálculo do Qui-quadrado: (Programa GMC, Ribeirão Preto, SP)

		Interpretação
Graus de liberdade	4	Distribuição amostral testada
Valor do Qui quadrado	128,57	Não normal
Probabilidade de Ho	0,0000%	

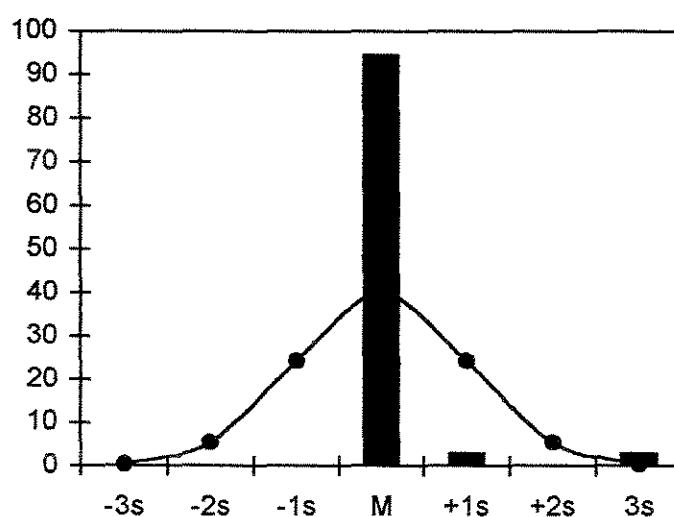


Fig1 . Histograma & Curva normal

Teste Kruskal-Wallis:

10.5.2.2. Análise estatística: hipoclorito de sódio.

Tabela 1: Transformação dos valores (tempos) das dos hipocloritos de sódio em segundos para realização dos testes estatísticos (expressos na tabela pela média de cada sextuplicata)

Hipoclorito de sódio	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. endodontalis</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>
0,5%	600 ¹	7200 ²	600 ³	15 ⁴	15 ⁵	15 ⁶
1,0%	30 ⁷	900 ⁸	15 ⁹	15 ¹⁰	15 ¹¹	15 ¹²
2,5%	15 ¹³	60 ¹⁴	15 ¹⁵	15 ¹⁶	15 ¹⁷	15 ¹⁸
4,0%	15 ¹⁹	30 ²⁰	15 ²¹	15 ²²	15 ²³	15 ²⁴
5,25%	15 ²⁵	15 ²⁶	15 ²⁷	15 ²⁸	15 ²⁹	15 ³⁰

Fonte: Tabela 2, Capítulo 2.

Números sobrescritos correspondem às colunas dos dados, na planilha do BioEstat, para realizar os testes estatísticos.

10.5.2.2.1. Teste de aderência à curva normal: Valores originais (Programa GMC, Ribeirão Preto, SP)

Tabela 2: Freqüências por intervalos de classe:

Intervalos de classe	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal	0,44	5,40	24,20	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental	0,00	0,00	60,00	20,00	10,00	10,00	0,00

Tabela 3. Cálculo do Qui-quadrado: (Programa GMC, Ribeirão Preto, SP)

		Interpretação
Graus de liberdade	4	Distribuição amostral testada
Valor do Qui quadrado	80,53	Não normal
Probabilidade de Ho	0,0000%	

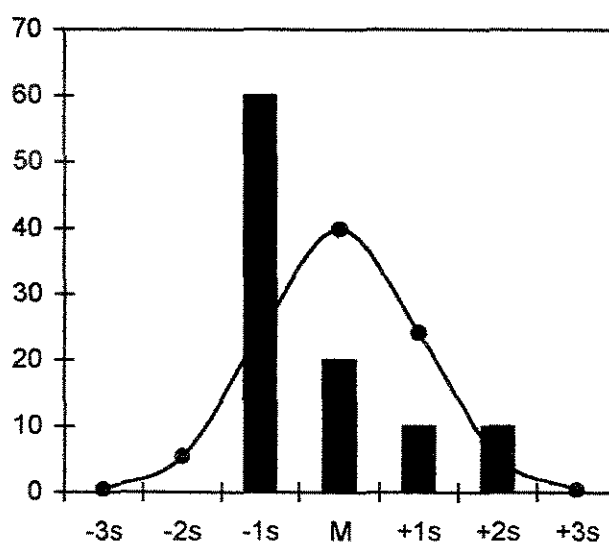


Fig1 . Histograma & Curva normal

10.5.3. Capítulo 3

10.5.3.1. Análise estatística: Tempo de contato necessário para cada irrigante produzir culturas negativas contra *E. faecalis*

Table 1. Média das zonas de inibição do crescimento microbiano (em mm) promovidas pelo hidróxido de cálcio associado a diversos veículos (Valor= 0, inibição por contato direto).

Ca(OH) ₂ +	C.a	B. s.	S.a.	E. f.	S.sa.	S. s.	S.m.	A.n.	P.g.	P.e	P.i/ P.n.	P. d.
sterile water	2,3 ¹	0,5 ²	0 ³	0 ⁴	0 ⁵	0 ⁶	0 ⁷	0 ⁸	0 ⁹	0 ¹⁰	0 ¹¹	0 ¹²
Saline	2,6 ¹³	1,0 ¹⁴	0 ¹⁵	0 ¹⁶	0 ¹⁷	0 ¹⁸	0 ¹⁹	0 ²⁰	0 ²¹	0 ²²	0 ²³	0 ²⁴
Anaesthetic solution	2,6 ²⁵	1,0 ²⁶	0 ²⁷	0 ²⁸	0 ²⁹	0 ³⁰	0 ³¹	0 ³²	0 ³³	0 ³⁴	0 ³⁵	0 ³⁶
Glycerine	2,8 ³⁷	1,0 ³⁸	0 ³⁹	0 ⁴⁰	0 ⁴¹	0 ⁴²	0 ⁴³	0 ⁴⁴	0 ⁴⁵	0 ⁴⁶	0 ⁴⁷	0 ⁴⁸
Polyethyleneglycol	1,7 ⁴⁹	0,7 ⁵⁰	0 ⁵¹	0 ⁵²	0 ⁵³	0 ⁵⁴	0 ⁵⁵	0 ⁵⁶	0 ⁵⁷	0 ⁵⁸	0 ⁵⁹	0 ⁶⁰
CMCP	3,5 ⁶¹	3,8 ⁶²	4,7 ⁶³	0,7 ⁶⁴	20,5 ⁶⁵	1,5 ⁶⁶	1,5 ⁶⁷	2,5 ⁶⁸	5,5 ⁶⁹	6,2 ⁷⁰	5,0 ⁷¹	5,0 ⁷²
CMCP + glycerine	11,3 ⁷³	6,5 ⁷⁴	11,7 ⁷⁵	7,2 ⁷⁶	12,0 ⁷⁷	10,2 ⁷⁸	11,3 ⁷⁹	8,7 ⁸⁰	22,0 ⁸¹	25,0 ⁸²	19,0 ⁸³	15,6 ⁸⁴

PMCC: paramonoclorofenol canforado

C. a.: *C.albicans*; B. s.: *B. subtilis*; S. a.: *S. aureus*; E. f.: *E. faecalis*; S. sa.: *S.sanguis*; S. s: *S. sobrinus*; S. m.: *S. mutans*; A.n.: *A.naeslundii*; P.g: *P.gingivalis*; P.e: *P. endodontalis*; P.i/P.n.: *P. intermedia/ nigrescens*; P. d: *P. denticola*.

Números sobrescritos: correspondem às colunas dos dados, na planilha do BioEstat, utilizados para realizar os testes estatísticos.

10.5.3.1.1. Teste de aderência à curva normal: Valores originais (Programa GMC, Ribeirão Preto, SP)

Tabela 1. Frequências por intervalos de classe:

Intervalos de classe	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal	0,44	5,40	24,20	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental	0,00	0,00	57,14	26,16	7,14	4,76	4,76

Tabela 2, Cálculo do Qui-quadrado: (Programa GMC, Ribeirão Preto, SP)

		Interpretação
Graus de liberdade	4	Distribuição amostral testada
Valor do Qui quadrado	67,05	Não normal
Probabilidade de Ho	0,0000%	

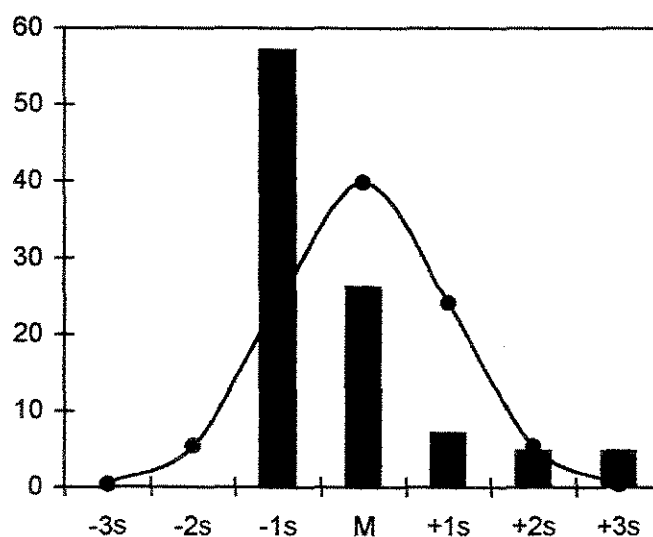


Fig1 . Histograma & Curva normal

10.5.3.1.3. Análise estatística das médias das áreas de inibição de crescimento microbiano (em mm) promovidas pelas pastas de hidróxido de cálcio associadas a diversos veículos.

Ca(OH) ₂ +	<i>C.a</i>	<i>B. s.</i>	<i>S.a.</i>	<i>E. f.</i>	<i>S.sa.</i>	<i>S. s.</i>	<i>S.m.</i>	<i>A.n.</i>	<i>P.g.</i>	<i>P.e</i>	<i>P.i/P.n.</i>	<i>P. d.</i>
água destilada	2,3 bc A	0,5 c A	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B
Solução salina	2,6 b A	1,0 b A	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B
Solução anestésica	2,6 b A	1,0 b A	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B
Glicerina	2,8 ab A	1,0 b A	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B
Polietilenoglicol	1,7 c A	0,7 bc A	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B	0 b B
PMCC	3,5 ab BC	3,8 ab A	4,7 a A	0,7 a C	20,5 a A	1,5 a C	1,5 a C	2,5 a B	5,5 a AB	6,2 a A	5,0 a AB	5,0 a AB
PMCC + glicerina	11,3 a CD	6,5 a D	11,7 a C	7,2 a D	12,0 a B	10,2 a D	11,3 a CD	8,7 a D	22,0 a A	25,0 a A	19,0 a A	15,6 a A

PMCC: paramonoclorofenol canforado

C. a.: *C.albicans*; *B. s.*: *B. subtilis*; *S. a.*: *S. aureus*; *E. f.*: *E. faecalis*; *S. sa.*: *S.sanguis*; *S. s.*: *S. sobrinus*; *S. m.*: *S. mutans*; *A.n.*: *A.naeslundii*; *P.g.*: *P.gingivalis*; *P.e.*: *P. endodontalis*; *P.i/P.n.*: *P. intermedia/ nigrescens*; *P. d.*: *P. denticola*

Letras diferentes mostram valores estatisticamente diferentes.

Letras maiúsculas mostram análise estatística numa mesma linha (Kruskal-Wallis $p < 0,05$).

letras minúsculas mostram análise estatística numa mesma coluna (Kruskal-Wallis $p < 0,05$).

10.5.4. Capítulo 4

10.5.4.2.1. Análise estatística: Hidróxido de cálcio

Tabela 1. Transformação dos valores (tempos) das pastas de hidróxido de cálcio em segundos para realização dos testes estatísticos (expressos na tabela pela média de cada sextuplicata)

Ca(OH) ² +	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. endodontalis</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>
água destilada	28800 ¹	86400 ²	86400 ³	30 ⁴	30 ⁵	30 ⁶
Glicerina	43600 ⁷	86400 ⁸	86400 ⁹	30 ¹⁰	300 ¹¹	30 ¹²
PMCC + glicerina	28800 ¹³	60 ¹⁴	21600 ¹⁵	30 ¹⁶	60 ¹⁷	30 ¹⁸
PMCC + polietilenoglicol	43600 ¹⁹	86400 ²⁰	86400 ²¹	30 ²²	300 ²³	30 ²⁴
Polietilenoglicol	28800 ²⁵	86400 ²⁶	28800 ²⁷	30 ²⁸	180 ²⁹	30 ³⁰

PMCC: paramonoclorofenol canforado

Fonte: Tabela 1, Capítulo 4.

Números sobrescritos: correspondem às colunas dos dados, na planilha do BioEstat, utilizados para realizar os testes estatísticos.

10.5.4.4.1.1. Teste de aderência à curva normal: Valores originais (Programa GMC, Ribeirão Preto, SP)

Tabela 1. Frequências por intervalos de classe:

Intervalos de classe	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal	0,44	5,40	24,20	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental	0,00	0,00	0,00	50,00	26,67	0,00	23,33

Tabela 2. Cálculo do Qui-quadrado: (Programa GMC, Ribeirão Preto, SP)

		Interpretação
Graus de liberdade	4	Distribuição amostral testada
Valor do Qui quadrado	121,05	Não normal
Probabilidade de Ho	0,0000%	

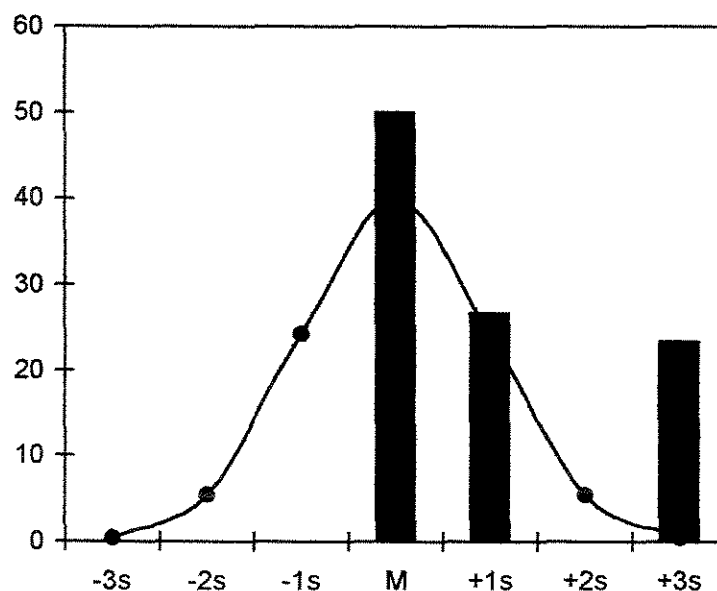


Fig 1. Histograma & Curva Normal

10.5.5. Capítulo 5

10.5.5.5.1. Análise estatística: Associação do Hidróxido de cálcio a Clorexidina gel 2%

10.5.5.5.1.1. Halos de inibição

Tabela 1. Médias de inibição do crescimento microbiano (em mm) produzidas pela clorexidina gel 2.0%, pasta de hidróxido de cálcio e associação de ambos utilizados como medicação intracanal contra os microrganismos testados.

Microorganisms	<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus Faecalis</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
2.0% chlorhexidine gel	5,00 ¹	9,67 ²	4,33 ³	17,83 ⁴	21,67 ⁵	20,33 ⁶
Calcium hydroxide	0* ⁷	0* ⁸	0* ⁹	0* ¹⁰	0* ¹¹	0* ¹²
2,0% chlorhexidine gel + Ca(OH) ₂	3,83 ¹³	4,00 ¹⁴	2,83 ¹⁵	6,00 ¹⁶	6,00 ¹⁷	6,50 ¹⁸

Fonte: Tabela 1, Capítulo 5

Números sobrescritos: correspondem às colunas dos dados, na planilha do BioEstat, utilizados para realizar os testes estatísticos.

10.5.5.5.1.1.1. Teste de aderência à curva normal: Valores originais

Tabela 1. Freqüências por intervalos de classe:

Intervalos de classe	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal	0,44	5,40	24,20	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental	0,00	0,00	0,00	33,33	44,44	5,56	16,67

Tabela 2. Cálculo do Qui-quadrado:

		Interpretação
Graus de liberdade	4	Distribuição amostral testada
Valor do Qui quadrado	47,24	Não normal
Probabilidade de Ho	0,0000%	

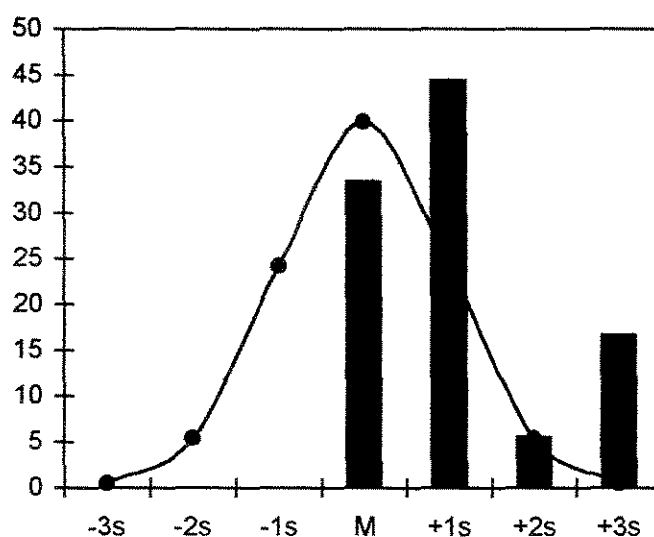


Fig 1. Histograma & Curva Normal

10.5.5.5.2. Contato direto

Tabela 1. Médias dos tempos de contato (em segundos) necessários para a clorexidina gel 2%, pasta de hidróxido de cálcio e associação de ambos, utilizados como medicação intracanal, contra os microrganismos testados (expressos na tabela pela média de cada sextuplicata)

	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. endodontalis</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>
Clorexidina gel 2%	15 ¹	15 ²	15 ³	15 ⁴	15 ⁵	15 ⁶
Ca(OH) ² + água destilada	28800 ⁷	86400 ⁸	86400 ⁹	30 ¹⁰	30 ¹¹	30 ¹²
Associação	3600 ¹³	21600 ¹⁴	3600 ¹⁵	30 ¹⁶	30 ¹⁷	30 ¹⁸

PMCC: paramonoclorofenol canforado

Fonte: Tabela 1, Capítulo 5.

Números sobrescritos: correspondem às colunas dos dados, na planilha do BioEstat, utilizados para realizar os testes estatísticos.

10.5.5.5.2.1. Teste de aderência à curva normal: Valores originais

Tabela 1. Freqüências por intervalos de classe:

Intervalos de classe	M-3s	M-2s	M-1s	Med.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal	0,44	5,40	24,20	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental	0,00	0,00	0,00	50,00	26,67	0,00	23,33

Tabela 2. Cálculo do Qui-quadrado:

		Interpretação
Graus de liberdade	4	Distribuição amostral testada
Valor do Qui quadrado	121,05	Não normal
Probabilidade de Ho	0,0000%	

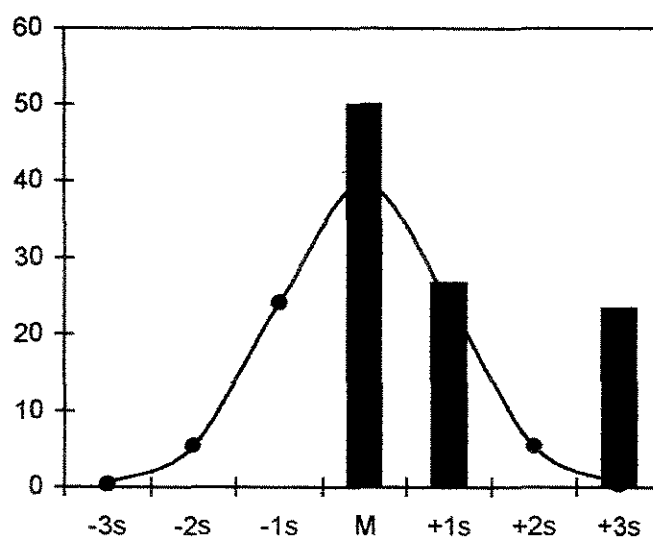


Fig 1. Histograma & Curva Normal

10.5.6. Laudo Técnico das substâncias testadas



CERTIFICADO DE ANÁLISE

PEDIDO : N. FISCAL Nº DATA: 04/10/02

CLIENTE : PRODERMA

PRODUTO : HIPOCLORITO DE SÓDIO - 12%

VALIDADE: 06 meses

LOTES: 0144/02

DATA FABRICAÇÃO: 27/09/02

QUANTIDADE :

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICO

Fórmula Química	NaClO
Alcalinidade Residual	de 3,0 a 8,0 g/l NaOH
Ferro	<3,0 mg/lFe
Peso Molecular	74,5
Ponto de Fusão	-25° C (12%)
Ponto de Ebulição	Decompõe-se
Densidade	1,2 (12%) (água =1)
Pressão de Vapor	17,5 mmHg (0°C)
Solubilidade em água	Completa
Observações	Não inflamável, não combustível

HIPOCLORITO DE SÓDIO tem atuação fundamental como agente sanitizante no tratamento de água de piscinas, desinfecção de água potável, desinfecção hospitalar, lavagem de frutas e verduras. É utilizado como intermediário em diversos processos químicos e aplicações, onde se faz uso de suas propriedades oxidantes, branqueamento e desinfetantes: Por exemplo, tratamento contra poluentes perigosos, como cianetos, nitritos e derivados de enxofre.

CERTIFICADO EMITIDO POR COMPUTADOR, DISPENSA ASSINATURA.



HENRIFARMA PRODUTOS QUÍMICOS E FARMACÊUTICOS LTDA.

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Nº N.F 057.785

PRODUTO	DIGLUCONATO DE CLORHEXIDINA SOL 20%
ESPECIFICAÇÃO	BP 93
FÓRMULA	(C22 H30 N10 Cl2) . (C6 H12 O7) 2
PESO MOLECULAR	897.8 (ANIDRO)
ASPECTO	LÍQUIDO QUASE INCOLOR OU AMARELADO, INODORO OU QUASE.
SOLUBILIDADE	MISCÍVEL EM ÁGUA E EM ÁLCOOL
PAÍS DE ORIGEM	ÁFRICA DO SUL
LOTE NR	11120004
DATA DE FABRICAÇÃO	04/12/2000
DATA DE VALIDADE	01/12/2002
CONSERVAÇÃO	RECIPIENTES HERMÉTICOS PROTEGIDOS DA LUZ E TEMPERATURA < 25 °C

DETERMINAÇÃO FÍSICA	ESPECIFICAÇÕES	UNIDADES	RESULTADOS
pH - SOL 5 %	5.5 A 7.0	NR ABS	6.5

DETERMINAÇÃO QUÍMICA	ESPECIFICAÇÕES		UNIDADES	RESULTADOS
TEOR	19.0 A 21.0		% VOLUME	30.38 <i>verificar</i>
RESÍDUO DE IGNIÇÃO	MÁXIMO	0.1	%	< 0.1
4-CLOROANILINA	TESTE			PASSA TESTE
SUBSTÂNCIAS RELATIVAS	TESTE			PASSA TESTE

Gabriel Pinchas Szlejf

GABRIEL PINCHAS SZLEJF
FARMACÊUTICO RESPONSÁVEL
CRF - SP Nº 11811

CONVÊNIO



OSWALDO CRUZ
LABORATÓRIO



CONVÊNIO

Produto:

NATROSOL 250 HHR(HYDROXYETHYLCELULOSE)**

Data de Fabricação: 08/08/2001

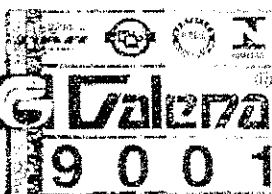
País de Origem: HOLANDA

Data de Validade: 08/08/2002

Número do Lote: V-1897

Nota Fiscal: 345275

01/08.0245 33476



Armazenamento: Temperatura ambiente, em recipiente perfeitamente fechado, protegido de luz e umidade.

Teste	Especificação	Resultado
Aspecto*	Grânulos ou pó branco, branco amarelado ou branco acinzentado.	Pó branco amarelado.
Solubilidade*	Solúvel em água quente ou fria, originando solução coloidal.	Conforme
	Praticamente insolúvel em etanol.	Conforme
	Praticamente insolúvel em acetona.	Conforme
pH (1%)	5,5 a 8,5	6,8
Perda por desidratação*	No máximo 10,0%	4,6%
Identificação*	Positiva	Conforme
Viscosidade (1%)	8000 a 9999 cP	5100 cP

(*) Testes realizados no Laboratório de Controle de Qualidade Galena, os dados estão em conformidade com o certificado de análise do fornecedor.

Referência: Especificação do fornecedor

Resultado:

(X) Aprovado

() Reprovado

Theophilo Marinho Neto
Farmacêutico Responsável
CRF-SP: 18.016

10.5.7. Artigos e Resumos Publicados

In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis

B. P. F. A. Gomes, C. C. R. Ferraz, M. E. Vianna, V. B. Eerber, F. B. Teixeira & F. J. Souza-Filho
Endodontic Unit, School of Dentistry of Piracicaba, State University of Campinas-UNICAMP, Piracicaba – SP, Brazil

Abstract

Gomes BPF A, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*, **34**, 424–428, 2001.

Aim The aim of this study was to assess, *in vitro*, the effectiveness of several concentrations of NaOCl (0.5%, 1%, 2.5%, 4% and 5.25%) and two forms of chlorhexidine gluconate (gel and liquid) in three concentrations (0.2%, 1% and 2%) in the elimination of *E. faecalis*.

Methodology A broth dilution test using 24-well cell culture plates was performed and the time taken for the irrigants to kill bacterial cells was recorded. Isolated 24 h colonies of pure cultures of *E. faecalis* grown on 10% sheep blood plus Brain Heart Infusion (BHI) agar plates were suspended in sterile 0.85% NaCl solution. The cell suspension was adjusted spectrophotometrically to match the turbidity of a McFarland 0.5 scale. One mL of each tested substance was placed on the bottom of wells of 24-well cell culture plates (Corning, NY), including the control group (sterile saline). Six wells were used for each time period and irrigant concentration. Two mL of the bacterial suspension were ultrasonically mixed for 10 s

with the irrigants and placed in contact with them for 10, 30, and 45 s; 1, 3, 5, 10, 20, and 30 min; and 1 and 2 h. After each period of time, 1 mL from each well was transferred to tubes containing 2 mL of freshly prepared BHI + neutralizers in order to prevent a residual action of the irrigants. All tubes were incubated at 37°C for 7 days. The tubes considered to have positive growth were those which presented medium turbidity during the incubation period. Data were analysed statistically by the Kruskal–Wallis test, with the level of significance set at $P < 0.05$.

Results All irrigants were effective in killing *E. faecalis*, but at different times. Chlorhexidine in the liquid form at all concentrations tested (0.2%, 1% and 2%) and NaOCl (5.25%) were the most effective irrigants. However, the time required by 0.2% chlorhexidine liquid and 2% chlorhexidine gel to promote negative cultures was only 30 s and 1 min, respectively.

Conclusions Even though all tested irrigants possessed antibacterial activity, the time required to eliminate *E. faecalis* depended on the concentration and type of irrigant used.

Keywords: antimicrobial activity, chlorhexidine, endodontics, sodium hypochlorite.

Received 2 February 2000; accepted 18 September 2000

Introduction

Complete debridement and disinfection of the pulpal space are considered to be essential for predictable long-term

success in endodontic treatment. Residual pulpal tissue, bacteria, and dentine debris may persist in the irregularities of root canal systems, even after meticulous mechanical preparation (Abou-Rass & Piccinino 1982). Therefore, several irrigant solutions have been recommended for use in combination with canal preparation. However, the efficacy of these procedures also depends upon the vulnerability of the involved species. Anaerobic bacteria, especially black-pigmented Gram-negatives, have been linked

Correspondence: Dr Brenda P. F. A. Gomes, Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, Endodontia, Avenida Limeira, 901 – Piracicaba – SP, 13414–018 – Brazil (fax: +0055 19 430 5218; e-mail: bpgomes@fop.unicamp.br).

to the signs and symptoms of endodontic disease (Gomes et al. 1996a) but facultative bacteria, such as *Enterococcus faecalis*, have also been isolated from pathologically involved root canals, being considered one of the most resistant species in the oral cavity and a possible cause of failure of root canal treatment (Gomes et al. 1996b).

An irrigant serves to flush out debris from within the instrumented root canals, dissolve organic tissue remnants, disinfect the root canal space and provide lubrication during instrumentation, without causing irritation to biological tissues (Cheung & Stock 1993, Ingle et al. 1994). Sodium hypochlorite (NaOCl) has become the most popular agent for endodontic irrigation, even though its optimum working concentration has not been universally agreed (Cheung & Stock 1993). Chlorhexidine gluconate, a less malodorous and toxic agent, has been suggested as an irrigant based on its antibacterial effects, substantivity and lower cytotoxicity than NaOCl, whilst demonstrating efficient clinical performance (Leonardo et al. 1999).

The purpose of this study was to assess *in vitro* the effectiveness of NaOCl and two forms of chlorhexidine gluconate (liquid and gel) at different concentrations in the elimination of *E. faecalis*.

Materials and methods

The irrigants tested in the elimination of *E. faecalis* were several concentrations of NaOCl (0.5%, 1%, 2.5%, 4% and 5.25%) and two forms of chlorhexidine gluconate (gel and liquid) in three concentrations (0.2%, 1% and 2%). All irrigants were prepared by the same manufacturer (Drogas Farmácia de Manipulação Ltda., Piracicaba, Brazil). NaOCl and chlorhexidine liquid at different concentrations were diluted with sterile water without preservatives. Chlorhexidine gel consisted of gel base (1% natrosol) and chlorhexidine gluconate.

Isolated 24 h colonies of pure cultures of *E. faecalis* (ATCC 29212) grown on 10% sheep blood plus Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK) agar plates were suspended in sterile 0.85% NaCl solution. The cell suspension was adjusted spectrophotometrically to match the turbidity of a McFarland 0.5 scale (1.5×10^8 cfu mL⁻¹).

One mL of each tested substance was placed on the bottom of wells of 24-well cell culture plates (Corning, NY, USA, ref. no. 3524, well Vol. 3.2 mL), including the control group (sterile saline). Six wells were used for each time period and irrigant concentration (i.e. from each well, only one time period and irrigant were tested). Overall, 792 wells were used, comprising 726 for all the test irrigants and 66 for the control group. Two mL of the bacterial suspension

were ultrasonically mixed for 10 s with the irrigants and placed in contact with them for 10, 30, and 45 s; 1, 3, 5, 10, 20, and 30 min; and 1 and 2 h. After each period of time, 1 mL from each well was transferred to tubes containing 2 mL of freshly prepared BHI + neutralizers in order to prevent continued action of the irrigants. The neutralizer for NaOCl was 0.6% sodium thio-sulphate, whilst 0.5% Tween 80 + 0.07% lecithin was used for chlorhexidine (Siqueira et al. 1998b). All tubes were incubated at 37 °C for 7 days. The tubes considered to have positive bacterial growth were those which presented medium turbidity matching the turbidity of a McFarland 4 scale (12×10^8 cfu mL⁻¹) during the incubation period. The purity of the positive cultures was confirmed by Gram staining, by colony morphology on BHI agar + blood and by the use of a biochemical identification kit (API 20 Strep – bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France). The results were analysed statistically by the Kruskal-Wallis test, with the level of significance set at $P < 0.05$.

Results

Table 1 shows the contact time required by each tested irrigant to produce 100% of inhibition growth of *E. faecalis*.

All irrigants were effective in killing the bacteria tested, but at different times. Chlorhexidine gluconate liquid (1% and 2%) and NaOCl (5.25%) took significantly less time (>30 s) to eliminate *E. faecalis* than the other irrigants tested. However, the time required by chlorhexidine liquid (0.2%) and chlorhexidine gel (2%) to produce negative cultures was only 30 s and 1 min, respectively.

When used at 0.2% concentration, chlorhexidine gel destroyed bacterial cells after 2 h of contact, as opposed to only 15 min when used at 1.0% concentration.

Table 1 Contact time required by each tested irrigant to produce negative cultures (i.e. 100% inhibition growth) of *E. faecalis*

Irrigants	Contact time
0.2% chlorhexidine gel	2 h
1.0% chlorhexidine gel	15 min
2.0% chlorhexidine gel	1 min
0.2% chlorhexidine liquid	30 s
1.0% chlorhexidine liquid	< 30 s
2.0% chlorhexidine liquid	< 30 s
0.5% sodium hypochlorite	30 min
1.0% sodium hypochlorite	20 min
2.5% sodium hypochlorite	10 min
4.0% sodium hypochlorite	5 min
5.25% sodium hypochlorite	< 30 s

*Number of tests performed using the irrigants: 726; number of tests performed using sterile saline (control group): 66.

The antimicrobial activity of NaOCl was related to its concentration, i.e. higher concentrations took less time to inhibit bacterial growth than lower concentrations.

All specimens in the control group yielded positive cultures and *E. faecalis* was always recovered from all positive cultures.

Discussion

Laboratory tests of any kind are only the first steps in a study of the effectiveness of irrigants. Antimicrobial activity of an *in vitro* environment depends upon the pH of the substrates in plates or tubes, sensitivity of the drug, bacterial source (wild strains or collection species), the number of bacteria inoculated, incubation time, and the metabolic activity of the microorganisms. On the other hand, the duration of effectiveness of the drug, temperature, contamination and possible leakage of the agent into the mouth must be considered whilst working *in vivo* (Updegraff & Chaug 1977, Ayhan *et al.* 1999).

Enterococcus faecalis, a facultatively anaerobic Gram-positive coccus, has been implicated in persistent root canal infections (Engström 1964, Cavalleri *et al.* 1989, Gomes *et al.* 1996b, Molander *et al.* 1998) and has been used in several previous studies on the efficacy of endodontic irrigants (Shih *et al.* 1970, Parsons *et al.* 1980, Vahdaty *et al.* 1993, Siqueira *et al.* 1997, Heling & Chandler 1998, Siqueira *et al.* 1998a, Ayhan *et al.* 1999), especially for its high level of resistance to a wide range of antimicrobial agents (Heath *et al.* 1996). In the present study we used ATCC strain because it was also utilized in previous *in vitro* studies investigating the antibacterial effects of endodontic irrigants (Siqueira *et al.* 1997, 1998a, Gomes *et al.* 1999, Ferraz *et al.*, in press).

Sodium hypochlorite solution is, to date, the most commonly employed root canal irrigant. However, no general agreement exists regarding its optimal concentration, which ranges from 0.5% to 5.25%. Kozol *et al.* (1988) evaluated the toxic effects of NaOCl and observed that 0.025% was a safe concentration for clinical use, maintaining the antimicrobial action without harmful effects on the periapical tissues. Many studies (Spångberg *et al.* 1973, Byström & Sundqvist 1983) recommend its use at the concentration of 0.5% in order to obtain acceptable cytotoxic and bactericidal levels. According to a standard undergraduate text book (Harty 1990), 2.5% is the most favoured concentration.

NaOCl provides good tissue solvent action (Grossman & Meiman 1941, Senia *et al.* 1975, Moorer & Wessellink 1982), has a broad spectrum of antimicrobial activity (Spångberg *et al.* 1973, Byström & Sundqvist 1983,

Jeansonne & White 1994, Barnard *et al.* 1996, Siqueira *et al.* 1998a, Ayhan *et al.* 1999), acts as a lubricant for instrumentation and can flush loose debris from root canals (Abou-Rass & Piccinino 1982, Baumgartner & Mader 1987, Baumgartner & Cuenin 1992). The major disadvantages of NaOCl are its cytotoxic effect if injected into the periapical tissues (Spångberg *et al.* 1973, Pashley *et al.* 1985, Spångberg *et al.* 1988), its foul smell and taste, its ability to bleach clothes, and its potential for causing corrosion (Neal *et al.* 1983, Busslinger *et al.* 1998). It is also known to produce allergic reactions (Kaufman & Keila 1989).

Exactly how NaOCl destroys microorganisms has never been demonstrated experimentally. The disinfecting efficiency of NaOCl depends on the concentration of undissociated hypochlorous acid (HClO) in solution. HClO exerts its germicidal effect by an oxidative action on sulphhydryl groups of bacterial enzymes. As essential enzymes are inhibited, important metabolic reactions are disrupted, resulting in the killing of the bacterial cells (Dychdala 1991). However, microorganisms such as *E. faecalis* are resistant to NaOCl, especially at low concentrations (Baumgartner & Cuenin 1992, Heling & Chandler 1998, Ayhan *et al.* 1999). For instance, 0.5% NaOCl took 30 min to destroy bacterial cells, as demonstrated in the present work. On the other hand, the use of NaOCl at high concentrations is undesirable because it is an irritant to periapical tissues (Spångberg *et al.* 1973), even though its antimicrobial action is proportional to its concentration.

The present results showed that 5.25% was the most efficient concentration of NaOCl assessed, killing the bacterial cells in less than 30 s, in agreement with previous studies (Senia *et al.* 1975).

Chlorhexidine gluconate is a cationic bisguanide that seems to act by adsorbing onto the cell wall of the microorganism and causing leakage of intracellular components. At low chlorhexidine concentrations, small molecular weight substances will leak out, specifically potassium and phosphorous, resulting in a bacteriostatic effect. At higher concentrations, chlorhexidine has a bactericidal effect due to precipitation and/or coagulation of the cytoplasm, probably caused by protein cross-linking (Fardal & Turnbull 1986).

Chlorhexidine gluconate has been used in endodontics as an irrigant solution, but always in a liquid presentation. Chlorhexidine gel was evaluated as an intracanal medication, demonstrating good performance (Siqueira & Uzeda 1997). The natrosol gel (hydroxyethyl cellulose, pH 5.5) used as a base for chlorhexidine gluconate is soluble in water and widely used to thicken shampoos, gels and soaps. The gel formulation may keep the 'active

principle' of chlorhexidine gluconate in contact with the microorganisms longer, inhibiting their growth.

In a previous study (Gomes *et al.* 1999) that tested the antimicrobial activity of several irrigants, including chlorhexidine gluconate (in gel and solution) and different concentrations of NaOCl against selected endodontic microorganisms, by means of the agar diffusion method, chlorhexidine gel was more efficient than the liquid presentation at equivalent concentrations, although no significant difference was detected. In addition, the growth inhibition haloes produced by both forms of 2% chlorhexidine were significantly larger than those created by all concentrations of NaOCl, including 5.25%. All microbial species tested in that study were sensitive to chlorhexidine gluconate, either in gel or in solution, at both tested concentrations. Chlorhexidine demonstrated a broad spectrum of antimicrobial action, in agreement with the results of previous studies (Delany *et al.* 1982, Ringel *et al.* 1982, Jeansonne & White 1994).

The results of the present study confirm those obtained by Ohara *et al.* (1993), although these investigators only used chlorhexidine in a liquid formulation. In both experiments, the antimicrobial activity of chlorhexidine gluconate was superior to that of NaOCl, except for 0.2% chlorhexidine gluconate gel, which took almost 2 h to produce negative cultures. The present investigation tested the antimicrobial activity of chlorhexidine and NaOCl through direct contact with *E. faecalis* suspension and showed that chlorhexidine liquid killed the bacterial cells more rapidly than chlorhexidine gel; this is in contrast to our previous work (Gomes *et al.* 1999). This fact can be explained by the methodologies used; in this study, chlorhexidine liquid mixed very well with the bacterial suspension, immediately exerting its antimicrobial action, whereas the gel formulation, which is more difficult to mix, prevented direct contact between bacterial cells and chlorhexidine, thus requiring a longer time to act against the microorganisms. In the agar diffusion method, the gel formulation kept the active agent in contact with the inoculated media for a longer time, producing the largest inhibition zones. However, during root canal preparation the antimicrobial irrigant used should also act as lubricant, remove the smear layer, be water-soluble, be biocompatible with periapical tissues, and have contact with the microorganisms. A gel formulation has all these advantages (Ferraz *et al.*, in press).

Conclusions

The time required to eliminate *E. faecalis* depended on the concentration and type of irrigant used. The present

study confirmed the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite, and also provided new data on the properties of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. Studies using chlorhexidine gel are indicated, especially with respect to its mechanical properties. Further studies involving wild and collection strains, not only of *E. faecalis* but also of other endodontically related bacteria, might be informative. It should be emphasized that, as with most *in vitro* studies, the present findings remain to be confirmed clinically.

Acknowledgements

We thank Dr M. Campbell, University of Manchester, UK, for invaluable statistical help. This work was supported by Brazilian grants from FAPESP (no. 1996/5584-3), CNPq (520277/99-6 & 104238/99-2) and FAEP (1127/97 & 1127/99).

References

- Abou-Rass M, Piccinino MV (1982) The effectiveness of four clinical irrigation methods on the removal of root canal debris. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **54**, 323-8.
- Ayhan H, Sultan N, Çirak M, Ruhi MZ, Bodur H (1999) Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *International Endodontic Journal* **32**, 99-102.
- Barnard D, Davies J, Figdor D (1996) Susceptibility of *Actinomyces israelii* to antibiotics, sodium hypochlorite and calcium hydroxide. *International Endodontic Journal* **29**, 320-6.
- Baumgartner JC, Cuenin PR (1992) Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *Journal of Endodontics* **18**, 605-12.
- Baumgartner JC, Mader CL (1987) A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. *Journal of Endodontics* **4**, 147-57.
- Busslinger A, Sener B, Barbakow F (1998) Effects of sodium hypochlorite on nickel-titanium Lightspeed® instruments. *International Endodontic Journal* **31**, 290-4.
- Byström A, Sundqvist G (1983) Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **55**, 307-12.
- Cavalleri G, Cuzzolin L, Urbani G, Benoni G (1989) Root canal microflora: qualitative changes after endodontic instrumentation. *Journal of Chemotherapy* **1**, 101-2.
- Cheung GSP, Stock CJR (1993) *In vitro* cleaning ability of root canal irrigants with and without endosonics. *International Endodontic Journal* **26**, 334-43.
- Delany GM, Patterson SS, Miller MS, Newton CW (1982) The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **53**, 518-23.

- Dychdala GR (1991) Chlorine and chlorine compounds. In: Block SS, ed. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. 4th edn. Philadelphia, USA: Lea & Febiger, 133–5.
- Engström B (1964) The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontologisk Revy* 15, 87–105.
- Fardal O, Turnbull RS (1986) A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *Journal of the American Dental Association* 112, 863–9.
- Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (in press) *In vitro* assessment of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *Journal of Endodontics* (in press).
- Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB (1996a) Clinical significance of dental root canal microflora. *Journal of Dentistry* 27, 47–55.
- Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB (1996b) Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *International Endodontic Journal* 29, 235–41.
- Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ (1999) Variations in the susceptibility of selected microorganisms to endodontic irrigants (BES Spring Meeting Abstract). *Journal of Endodontics* 25, 299.
- Grossman L, Meiman B (1941) Solution of pulp tissue by chemical agents. *Journal of the American Dental Association* 28, 233–5.
- Harty FJ (1990) *Endodontics in Clinical Practice*, 3rd edn. London, UK: Wright.
- Heath CH, Blackmore TK, Gordon DL (1996) Emerging resistance in *Enterococcus* spp. *Medical Journal of Australia* 164, 116–20.
- Heling I, Chandler NP (1998) Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *International Endodontic Journal* 31, 8–14.
- Ingle JI, Bakland LK, Peters DL, Buchanan S, Mullaney TP (1994) Endodontic cavity preparation. In: Ingle JI, Bakland LK, eds. *Endodontics*. 4th edn. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 92–227.
- Jeanonne MJ, White RR (1994) A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *Journal of Endodontics* 20, 276–8.
- Kaufman AY, Keila S (1989) Hypersensitivity to sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics* 15, 224–6.
- Kozol RA, Gillies C, Elgebaly AS (1988) Effects of sodium hypochlorite (Dakin's solution) on cells of the wound module. *Archives of Surgery* 123, 420–3.
- Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LAB, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito FY (1999) *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *Journal of Endodontics* 25, 167–71.
- Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T (1998) Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal* 31, 1–7.
- Moorer WR, Wesselink PR (1982) Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *International Endodontic Journal* 15, 187–96.
- Neal RG, Craig RG, Powers JM (1983) Effect of sterilization and irrigants on the cutting abilities of stainless steel files. *Journal of Endodontics* 9, 93–6.
- Ohara PK, Torabinejad M, Kettering JD (1993) Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. *Endodontics and Dental Traumatology* 9, 95–100.
- Parsons GJ, Patterson SS, Miller CH, Katz S, Kafrawy AH, Newton CW (1980) Uptake and release of chlorhexidine by bovine pulp and dentin specimens and their subsequent acquisition of antibacterial properties. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 49, 455–9.
- Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH (1985) Cytotoxic effects of sodium hypochlorite on vital tissue. *Journal of Endodontics* 11, 525–8.
- Ringel AM, Patterson SS, Newton CW, Miller CH, Mulhern JM (1982) *In vivo* evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *Journal of Endodontics* 8, 200–4.
- Senia ES, Marraro RV, Mitchell JL, Lewis AG, Thomas L (1975) Rapid sterilization of gutta-percha with 5.25% sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics* 1, 136–40.
- Shih M, Marshall J, Rosen S (1970) The bactericidal efficiency of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 29, 613–9.
- Siqueira JF Jr, Batista MMD, Fraga RC, Uzeda M (1998a) Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *Journal of Endodontics* 24, 414–6.
- Siqueira JF Jr, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, Uzeda M (1997) Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from root canal, *in vitro*. *International Endodontic Journal* 30, 279–82.
- Siqueira JF Jr, Pereira da Silva CHF, Cerqueira MDO, Lopes HP, Uzeda M (1998b) Effectiveness of four chemical solutions in eliminating *Bacillus subtilis* spores on gutta-percha cones. *Endodontic and Dental Traumatology* 14, 124–6.
- Siqueira JF Jr, Uzeda M (1997) Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *Journal of Endodontics* 23, 167–9.
- Spångberg L, Engström B, Langeland K (1973) Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics *in vitro*. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 36, 856–70.
- Spångberg L, Safavi KE, Kaufman A, Pascon EA (1988) Antimicrobial and toxic effect *in vitro* of a bisdequalinium acetate solution for endodontic use. *Journal of Endodontics* 14, 175–8.
- Updegraff DM, Chaug RW (1977) Antibacterial activity of dental restorative materials. *Journal of Dental Research* 50, 382–92.
- Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF (1993) Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules *in vitro*. *Endodontics and Dental Traumatology* 9, 243–8.



ORAL SURGERY,
ORAL MEDICINE,
ORAL PATHOLOGY,
ORAL RADIOLOGY,
and
ENDODONTICS

Endodontics Section
LARZ SPÄNGBERG, DDS, PhD, *Editor*
University of Connecticut Health Center
School of Dental Medicine
Department of Endodontology
Farmington, CT 06030-1715
860-679-4350 • Fax: 860-679-2208

PRIORITAIRE

En cas de non remise
prière de retourner à
22764 HAMBURG
ALLEMAGNE

Port Payé
60544 Frankfurt
ALLEMAGNE

DR. BRENDA PAULA F. A. GOMES
DEPARTMENT OF RESTORATIVE DENTISTRY OF PIRACICABA
UNIVERSITY OF CAMPINAS
AV. LIMEIRA, 901
PIRACICABA - SP CEP-13414-018
BRAZIL

AIR MAIL

Date: 11/04/2002

Manuscript # 83/02

Title In vitro evaluation of chlorhexidine and sodium hypochlorite
antimicrobial activity against
endodontic pathogens

Status: ☒ received and sent to reviewers

☐ revision received

☐ incomplete submission

_____ is missing

☐ still under review

☐ accepted and sent to Editor-in-Chief

☐ revision has not been received - do you wish to withdraw?

Thank you for submitting your paper to the Endodontics Section of ORAL SURGERY, ORAL MEDICINE,
ORAL PATHOLOGY, ORAL RADIOLOGY AND ENDODONTICS.

AIR MAIL

LARZ SPÄNGBERG, DDS, PhD
Editor

In Vitro Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide Pastes and their Vehicles Against Selected Microorganisms

Brenda Paula Figueiredo de Almeida GOMES¹

Caio Cezar Randi FERRAZ¹

Morgana Eli VIANNA¹

Pedro Luiz ROSALEN²

Alexandre Augusto ZAIA¹

Fabricio Batista TEIXEIRA¹

Francisco José de SOUZA-FILHO¹

Departments of ¹Restorative Dentistry, Endodontic Area, and ²Pharmacology, Dental School of Piracicaba, UNICAMP, Piracicaba, SP, Brazil

The aim of this study was to investigate in vitro the antimicrobial activity of calcium hydroxide in combination with several vehicles against some microorganisms commonly isolated from root canals. Antimicrobial activity was determined by the agar diffusion method. Stainless-steel cylinders were placed on each inoculated agar medium. The test medicaments and their controls were placed inside the cylinders. The zones of growth inhibition were measured and recorded after incubation for each plate and the results were analyzed statistically (ANOVA). The in vitro antimicrobial effects of the medications were ranked from strongest to weakest as follows: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + CMCP + glycerine, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + CMCP, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + glycerine, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + anesthetic, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + saline, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + H_2O , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + polyethyleneglycol. The pastes with oily vehicles showed significantly larger mean zones of inhibition compared to those with aqueous or viscous vehicles. It was concluded that diffusion and antimicrobial activity of calcium hydroxide were affected by the type of vehicle used.

Key Words: intracanal medication, calcium hydroxide, microorganisms.

INTRODUCTION

The role of bacteria and their by-products in the initiation and perpetuation of pulp and periapical diseases has been well established. Most infecting bacteria, together with their principal substrate of necrotic pulp debris, may be removed by routine endodontic procedures such as instrumentation and irrigation, and the use of an intracanal medicament with antimicrobial activity. Nevertheless, this is not always fully achieved in clinical practice. The anatomical complexities of many root canals, and consequent limitations of access by instruments, irrigants and intracanal medications are well known (1). Despite the antimicrobial properties of the chemomechanical preparation and the intracanal dressings, the elimination of the microorganisms may

not be uniform due to the vulnerability of the involved species (2).

Even though anaerobic bacteria, especially black-pigmented Gram-negative, have been linked to signs and symptoms (3,4), facultative bacteria, such as *Enterococcus faecalis*, have been considered one of the most resistant species in the oral cavity and a possible cause of failure of root canal treatment (2,5).

It has long been recognized that the antibacterial effects of biomechanical procedures can be enhanced by the subsequent placement of an antimicrobial intracanal medication such as calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) (6). Calcium hydroxide was first introduced as a pulp capping agent in 1930 by Hermann and since then its use in endodontic therapy has increased. Today it is one of the most versatile medications in dentistry,

Correspondence: Dr. Brenda P.F.A. Gomes, Endodontia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP-UNICAMP, Avenida Limeira, 901, Bairro Areião, 13414-900 Piracicaba, SP, Brasil. Fax: +55-19-430-5218. E-mail: bpgomes@fop.unicamp.br

especially for its use as an intracanal dressing. Moreover, calcium hydroxide is considered to fulfill many of the properties of an ideal root canal dressing due to its moderate antibacterial action, its ability to induce hard tissue formation and to cause intracanal occlusion, and its tissue dissolving capability (7).

For calcium hydroxide to act effectively as an intracanal dressing, it should ideally occupy all of the pulp space, thereby diffusing into areas inaccessible to instruments. Its effectiveness is linked to the diffusion of hydroxyl ions through the dentinal tubules and accessory canals into areas where bacteria and their by-products may be harbored. In addition to acting as a physical barrier, the calcium hydroxide dressing may both prevent root canal re-infection and interrupt the nutrient supply to the remaining bacteria. Its alkalizing pH (around 12.5) promotes a destructive effect on cell membranes and protein structure (8).

Recent studies have reviewed the classification and clinical indications of various formulations of calcium hydroxide (9,10) and their mechanisms of antimicrobial activity (11), clearly indicating that even though this medication has been used for more than 80 years, there are still many questions to be answered regarding its antimicrobial action.

The agar diffusion method has been widely used to test antimicrobial activities of endodontic medications and sealers (12,13). It allows direct comparison of intracanal medicaments against the test microorganisms, indicating which medication has the potential to eliminate bacteria from the root canal system.

The purpose of this study was to assess in vitro the antimicrobial activity of calcium hydroxide associated with several vehicles against aerobes and facultative and strictly anaerobic microorganisms commonly isolated from root canals. The antimicrobial activity of the vehicles was also evaluated.

MATERIAL AND METHODS

The microorganisms used in this experiment were two aerobes, six facultative anaerobic bacteria, and four black-pigmented Gram-negative anaerobes commonly isolated from infected root canals: *Candida albicans* NTCC 3736, *Bacillus subtilis* ATCC 19659, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Streptococcus*

mutans OMZ 175, *Actinomyces naeslundii* M104, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens* and *Prevotella denticola*. The last four microorganisms were isolated from clinical trials. The aerobes and facultative anaerobes were kindly donated by the Center of Oral Biology, University of Rochester, NY, USA.

Each microbial strain was evaluated against calcium hydroxide pastes prepared with the following vehicles: a) sterile distilled water (aqueous vehicle); b) sterile saline (aqueous vehicle); c) anesthetic solution (aqueous vehicle, 3% carbocaine (mepivacaine) with no vasoconstrictor; Sterling Drug, New York, NY); d) glycerine (viscous vehicle); d) polyethyleneglycol (viscous vehicle, proprietary brand: Calen™; S.S. White Artigos Dentários, Rio de Janeiro, RJ, Brazil); e) camphorated paramonochlorophenol (CMCP, oily vehicle; Frank's paste, 2:1); f) CMCP + glycerine (2:1:1). Distilled water, 0.85% sterile saline, anesthetic solution, glycerine, polyethyleneglycol, CMCP and CMCP + glycerine (1:1) were used as controls.

The calcium hydroxide pastes were prepared using calcium hydroxide powder (Mallinckrodt, Inc., Phillipsburg, NJ, USA). The consistency of the pastes was similar to that of toothpaste, with a viscosity of 3501 cP at 0.1 rpm (Brookfield Digital Reometer, model DV-III-IV, São Paulo, SP, Brazil), and pH 12.5 determined with a pH meter (Analion, pH digital PM 605, Ribeirão Preto, SP, Brazil). Calen is the proprietary brand of Leonardo and Leal's paste, with the following formulation: calcium hydroxide (2.5 g), zinc oxide (0.5 g), hydrogenized colophony (0.05 g) and polyethyleneglycol 400 (12.75 ml). This is the only proprietary brand of a calcium hydroxide paste containing this viscous vehicle (10).

All microorganisms were previously subcultured in appropriate culture media and under gaseous conditions to confirm their purity.

Aerobe and facultative strains were individually inoculated into tubes containing 5 ml of sterile 0.85% saline solution. The suspension was adjusted spectrophotometrically to match the turbidity of a McFarland 0.5 scale. Five hundred µl of each test microorganism suspension was inoculated into glass bottles containing 50 ml of BHI agar at 46°C, vortexed, and poured onto 130-mm plates containing a previously set layer of Mueller Hinton (MH) agar (Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK).

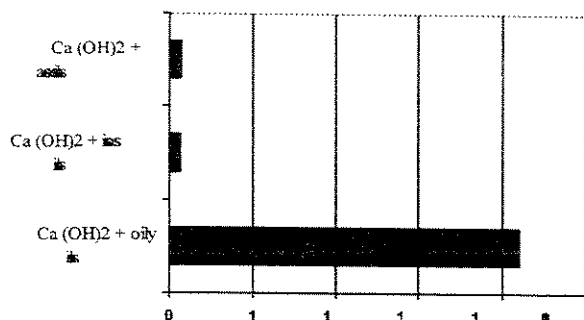


Figure 1. Average values of growth inhibition zones (in mm) by $\text{Ca}(\text{OH})_2$ paste in combination with several vehicles against all microorganisms tested.

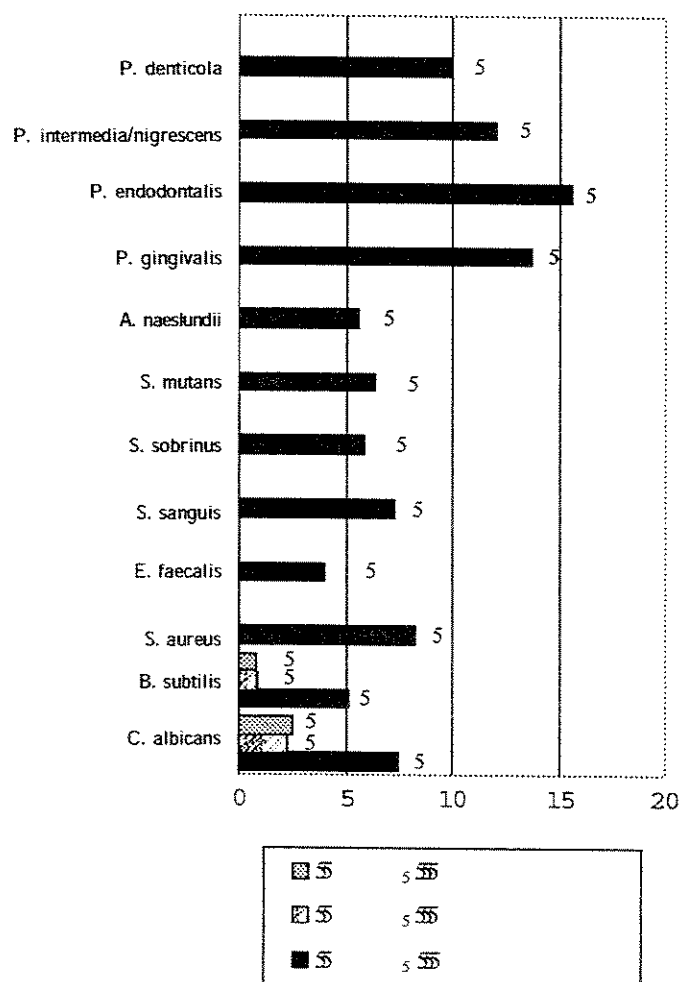


Figure 2. Average values of growth inhibition zones (in mm) by $\text{Ca}(\text{OH})_2$ paste in combination with several vehicles against all microorganisms tested.

microbial inhibition (in mm) provided by calcium hydroxide associated with several vehicles. Zones of microbial inhibition equal to zero mean that the medication had antimicrobial action by direct contact, however, without halo formation. All calcium hydroxide pastes were inhibitory at least by direct contact against all microbial strains tested (Table 1).

Based on the averages of the diameters of the zones of microbial growth inhibition, the antimicrobial effects of the $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pastes could be ranked from strongest to weakest according to the vehicle group, as follows: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + CMCP + glycerine, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + CMCP, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + glycerine, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + anesthetic, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + saline, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + H_2O , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + polyethyleneglycol. The pastes with oily vehicles showed significantly larger mean zones of inhibition (8.42 mm) compared with those with aqueous (0.25 mm) or viscous vehicles (0.27 mm) ($p < 0.05$) (Figure 1).

The aqueous and viscous vehicles such as water, saline, anesthetic, glycerine and polyethyleneglycol had no antimicrobial action. On the other hand, the oily vehicles such as CMCP and CMCP plus glycerine showed average inhibition zones of microbial growth of 6.19 mm and 8.75 mm, respectively (Table 2).

The susceptibility of individual microorganisms to the calcium hydroxide pastes was varied. All microorganisms were more susceptible to calcium hydroxide prepared with oily vehicles. *E. faecalis* was most resistant (3.95 mm), followed by *B. subtilis* (5.6 mm) and *A. naeslundii* M104 (5.6 mm), while the anaerobic *P. endodontalis* (15.6 mm), followed by *Porphyromonas gingivalis* (13.75 mm) and *Prevotella intermedia/nigrescens* (12 mm), were more susceptible to pastes with oily vehicles. However, *B. subtilis* and *C. albicans* showed some susceptibility to all calcium hydroxide pastes (Figure 2).

DISCUSSION

Common clinical signs such as exudation, hemorrhage, perforation, root resorption, trauma or incomplete root formation may indicate the need for intracanal medicaments. In

For the anaerobes, isolated colonies were suspended to reach 1.0 on the McFarland scale. Sterile swabs were dipped into the bacterial suspension and inoculated onto pre-reduced 70-mm plates containing 5% sheep-blood-Fastidious Anaerobe Agar (FAA; Lab-M, Bury, UK). The inoculum procedures used were appropriate to provide a semi-confluent growth of the tested microorganisms.

Sterile stainless-steel tubes of 8.0 x 1.0 x 10 mm (inner diameter, 6 mm) were added to the surfaces of the media and filled with 40 µl of each test substance and its control. The plates were kept for 2 h at room temperature to allow the diffusion of the agents through the agar and then incubated at 37°C under appropriate gaseous conditions and for an appropriate period of time: aerobes, 24 h; facultatives, 24-48 h in a CO₂ incubator (Jouan, Saint Herblain, France), in an atmo-

sphere of 10% CO₂; anaerobes in an anaerobic work station (Don Whitley Scientific, Bradford, UK) in an atmosphere of 5-10% H₂, 10% CO₂, 80-85% N₂ for 7 days. Zones of inhibition of microbial growth around the cylinder containing the tested substances were measured and recorded after the incubation period. The inhibitory zone was considered to be the shortest distance (mm) from the outer margin of the cylinder to the initial point of the microbial growth. Six replicates were made for each microorganism. Analysis of variance (ANOVA) was used to determine the differences in susceptibility to intracanal medication between microbial species.

RESULTS

Table 1 shows the mean area of the zones of

Table 1. Mean area of the zones of microbial growth inhibition (in mm) provided by calcium hydroxide associated with several vehicles.

Ca(OH) ₂ +	C.a.	B.s.	S.a.	E.f.	S.sa.	S.s.	S.m.	A.n.	P.g.	P.e.	P.i./P.n.	P.d.
sterile water	2.3	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
saline	2.6	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
anesthetic solution	2.6	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
glycerine	2.8	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
polyethyleneglycol	1.7	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CMCP	3.5	3.8	4.7	0.7	2.5	1.5	1.5	2.5	5.5	6.2	5.0	5.0
CMCP + glycerine	11.3	6.5	11.7	7.2	12.0	10.2	11.3	8.7	22.0	25.0	19.0	15.6

C.a.: *C. albicans*; B.s.: *B. subtilis*; S.a.: *S. aureus*; E.f.: *E. faecalis*; S.sa.: *S. sanguis*; S.s.: *S. sobrinus*; S.m.: *S. mutans*; A.n.: *A. naeslundii*; P.g.: *P. gingivalis*; P.e.: *P. endodontalis*; P.i./P.n.: *P. intermedia/nigrescens*; P.d.: *P. denticola*.

CMCP: camphorated paramonochlorophenol. Zero means inhibition by direct contact.

Table 2. Mean area of the zones of microbial growth inhibition (in mm) provided by the vehicles.

Vehicles	C.a.	B.s.	S.a.	E.f.	S.sa.	S.s.	S.m.	A.n.	P.g.	P.e.	P.i./P.n.	P.d.	Average values of each vehicle against all microorganisms tested
sterile water	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
saline	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
anesthetic solution	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
glycerine	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
polyethyleneglycol	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CMCP	4.0	3.0	5.3	3.0	6.0	6.0	2.5	5.0	11.0	12.5	10.0	6.0	6.19
CMCP + glycerine	4.5	3.5	7.0	5.0	13.5	13.5	5.0	5.0	13.0	15.0	12.0	8.0	8.75

C.a.: *C. albicans*; B.s.: *B. subtilis*; S.a.: *S. aureus*; E.f.: *E. faecalis*; S.sa.: *S. sanguis*; S.s.: *S. sobrinus*; S.m.: *S. mutans*; A.n.: *A. naeslundii*; P.g.: *P. gingivalis*; P.e.: *P. endodontalis*; P.i./P.n.: *P. intermedia/nigrescens*; P.d.: *P. denticola*.

CMCP: camphorated paramonochlorophenol. *Microbial growth

these situations, it is beneficial to clean and shape the canals and place the Ca(OH)_2 paste densely into the full length of the canal, in order to increase the efficacy of the antimicrobial effect (8).

The calcium hydroxide antimicrobial action is related to the alkaline pH. The change of dentinal pH caused by hydroxyl ions is slow and depends on several factors that can alter the rate of ionic dissociation and diffusion, such as the level of hydrosolubility of the vehicle employed, difference in viscosity, acid-base characteristics, dentinal permeability, and level of existing calcification (14). The lethal effects of hydroxyl ions on bacterial cells are probably due to the damage to the bacterial cytoplasmic membrane, protein denaturation, and damage to the DNA (11). The time needed for calcium hydroxide to optimally disinfect the root canal is still unknown and might be related to the type of microorganism involved, location of the microorganism in the root canal system, presence or absence of smear layer and presence or absence of root canal exudation.

Moreover, Ca(OH)_2 should ideally be placed so that it occupies the apical regions in sufficient quantity to permit its biological effect to be exerted in close proximity to the appropriate tissues. In many clinical situations, the correct placement of Ca(OH)_2 paste into the root canal system may be hindered due to anatomical irregularities. In most cases, Ca(OH)_2 should be combined with a liquid acting as a carrier because some researchers have found that techniques that deliver dry calcium hydroxide powder alone are difficult or impossible to use in smaller, curved canals (15). In general dental practice, sterile water or saline are among the most commonly used carriers and are also effective in delivering hydroxyl ions (8).

According to Fava and Saunders (10), the vehicle plays a most important role in the biological action of calcium hydroxide which is determined by the velocity of ionic dissociation in Ca^{++} and OH^- ions. The aqueous vehicles are represented in this study by sterile water, sterile saline and anesthetic solution, although this category also includes Ringer's solution, methylcellulose and carboxymethylcellulose, and anionic detergent solutions such as sodium lauryl diethyleneglycol or sodium lauryl sulfate. Generally, aqueous solutions promote a rapid ion liberation and should be used in clinical situations involving intense exudate, and dental replantation, among others, being the best vehicle for

Ca(OH)_2 powder (8). Although acidic, with a pH ranging from 4 to 5, local anesthetics provide an adequate mixing agent because calcium hydroxide is a very strong base minimally affected by the acid (16).

Viscous vehicles (glycerine, polyethyleneglycol, propyleneglycol) are also water-soluble substances that release Ca^{++} and OH^- ions more slowly for extended periods. These should be used for redressing, because the paste may remain in the root canal for a longer period. Several investigators have claimed that calcium hydroxide pastes containing viscous vehicles such as glycerine incorporate more Ca(OH)_2 than aqueous vehicles in order to achieve a toothpaste consistency, and their delivery into canals with a Lentulo spiral is a superior method of placement for length and density (15). Pastes containing oily vehicles (olive oil, camphorated paramonochlorophenol, metacresylacetate, eugenol) have restricted application, and their use has been reported in clinical situations that require a very slow ion dissociation, i.e., a permanent root filling for perforation defects after internal resorption (10).

In the present study, all calcium hydroxide pastes mixed with inert vehicles had antimicrobial action, but just by direct contact, in agreement with previous studies (17). Other studies have also reported the failure of calcium hydroxide to eliminate enterococci effectively (2,6) as they tolerate very high pH values, varying from 9 to 11. In the present study, *Enterococcus faecalis* was the microorganism showing the smallest inhibition zone against all tested intracanal medications, while strict anaerobes such as *Porphyromonas endodontalis*, *P. gingivalis* and *Prevotella intermedia/nigrescens* showed the largest inhibition zones.

Pastes prepared with aqueous vehicles had a lower antimicrobial action in the following crescent order: water, saline and anesthetic. Glycerine (a viscous vehicle) mixed with Ca(OH)_2 produced larger zones of microbial growth inhibition compared to the aqueous vehicles. On the other hand, polyethyleneglycol (also a viscous vehicle) showed the weakest antimicrobial action, confirming a previous study (18). The in vitro ineffectiveness of calcium hydroxide mixed with inert vehicles may be related to the fact that culture media possess buffer substances in their formulations and also due to the vehicle diffusion ability. Therefore, although calcium hydroxide could have diffused across the medium, the pH levels reached were not sufficient to present inhibitory activity (11).

Some *in vivo* studies have indicated that killing of microbes in the canal can be achieved more reliably with calcium hydroxide paste mixed with aqueous vehicle than with other medicaments tested (6). This may be explained by the filling ability of these pastes, which may be more relevant in preventing recontamination than the chemical effect. Because calcium hydroxide has a low water solubility, it is slowly dissolved in saliva, thus remaining in the canal for a long period of time, delaying bacterial progression toward the apical foramen. The present study has shown that Ca(OH)_2 pastes kill bacteria by direct contact, which means that the remaining microorganisms in contact with this medication in the root canal will be eradicated if they are not tolerant to this medication.

As verified in the present study, the superior *in vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide associated with camphorated paramonochlorophenol (CMCP) has long been recognized. The addition of glycerine to Frank's paste seems to enhance its antimicrobial action since glycerine helps the diffusibility of Ca(OH)_2 + CMCP (17), as also observed in the present study.

In conclusion, even though calcium hydroxide is the recommended intracanal medication for the treatment of apical periodontitis, it cannot be considered as a universal intracanal medicament, since it is not equally effective against all bacteria found in the root canal. The association of calcium hydroxide to CMCP aiming to improve its antimicrobial property should be avoided, as this vehicle can be irritating to periapical tissues (8). Another medication or association, such as 2% chlorhexidine gel should be considered, which is biocompatible with periapical tissues, has a wide spectrum of antimicrobial activity with prolonged action and diffuses through the dentine tubules (12,19).

The first step in a study of the effectiveness of intracanal medicament is the laboratory test. *In vitro* research to determine the antimicrobial activity depends on the sensitivity of the drug, bacterial source (wild strains or collection species), number of bacteria inoculated, pH of the substrates in plates or tubes, agar viscosity, storage conditions of the agar plates, incubation time and the metabolic activity of the microorganisms. On the other hand, the duration of effectiveness of the drug, temperature, contamination and possible leakage of the agent into the mouth must be considered while working *in vivo* (20).

The present study confirmed some published data on the *in vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide associated with several vehicles, and also provided new data on the susceptibility of endodontic related microorganisms to the intracanal medicaments tested.

Thus, we conclude that the type of vehicle utilized affects the diffusion ability and the antimicrobial activity of calcium hydroxide. However, *in vitro* results must be analyzed carefully before their extrapolation to clinical conditions. Research is in progress to evaluate the antibacterial effectiveness of these pastes as intracanal medications using other *in vitro* tests and also *in vivo* models.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. M. Campbell from the University of Manchester, UK, for the invaluable statistical help. This work was supported by the Brazilian agencies FAPESP (grant no. 2000/13689-7 & 1996/5584-3), CNPq (520277/99-6) and CAPES.

RESUMO

Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. Atividade antimicrobiana *in vitro* das pastas de hidróxido de cálcio e seus veículos sobre microrganismos específicos. *Braz Dent J* 2002;13(3):155-161.

O objetivo deste trabalho foi investigar *in vitro* a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio em combinação com vários veículos contra alguns microrganismos mais frequentemente isolados dos canais radiculares. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão no ágar. Cilindros de aço inoxidável foram colocados sobre as placas de ágar já inoculadas, dentro dos quais os medicamentos testados e seus controles foram introduzidos. As zonas de inibição do crescimento microbiano foram medidas e anotadas após o período de incubação de cada placa e os resultados foram analisados estatisticamente. A atividade antimicrobiana *in vitro* dos medicamentos testados, em ordem decrescente, foi: Ca(OH)_2 + PMCF + glicerina, Ca(OH)_2 + PMCF, Ca(OH)_2 + glicerina, Ca(OH)_2 + anestésico, Ca(OH)_2 + salina, Ca(OH)_2 + H_2O , Ca(OH)_2 + polietilenoglicol. Pastas com veículos oleosos produziram as maiores zonas de inibição, quando comparadas com as com veículos aquosos ou oleosos. Concluímos que a habilidade de difusão e a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio estão relacionadas com os tipos de veículos utilizados.

Unitermos: medicação intracanal, hidróxido de cálcio, microrganismos.

REFERENCES

1. Biffi JC, Rodrigues HH. Ultrasound in endodontics: a quantitative and histological assessment using human teeth. *Endod Dental Traumatol* 1989;5:55-62.
2. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J* 1996;29:235-241.
3. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J* 1994;27:291-298.
4. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent* 1996; 29:47-55.
5. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1-7.
6. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dental Traumatol* 1985;1:170-175.
7. Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endodon* 1993;19:302-306.
8. Spangberg LSW. Intracanal medication. In: *Endodontics*. Ingle JJ, Bakland L. eds. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p 627-640.
9. Estrela C, Pécora JD, Souza-Neto MD, Estrela CR, Baummann LL. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide. *Braz Dent J* 1999;10:63-72.
10. Fava LRG, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J* 1999;32:267-282.
11. Siqueira Jr JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999;32:361-369.
12. Siqueira Jr JF, Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endodon* 1997;23:167-169.
13. Mickel AK, Wright R. Growth inhibition of *Streptococcus anginosus* (milleri) by three calcium hydroxide sealers and one zinc oxide-eugenol sealer. *J Endodon* 1999;25:34-37.
14. Estrela C, Pimenta FC, Ito I, Baummann LL. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. *J Endodon* 1998;24:15-17.
15. Rivera EM, Williams K. Placement of calcium hydroxide in simulated canals: comparison of glycerin versus water. *J Endodon* 1994;20:445-448.
16. Statmos DG, Haasch GG, Gerstein H. The pH of local anesthetic/calcium hydroxide solutions. *J Endodon* 1985;11:264-265.
17. Siqueira Jr JF, Uzeda M. Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *J Endodon* 1998;6:63-65.
18. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ, Rosalen PL, Lilley JD. Susceptibility of selected microorganisms to intracanal medicaments. *Int Endod J* 2000;33:72 9 (abstract).
19. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endodon* (in press).
20. Weiss EI, Shalhav M, Fuzz Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact. *Endod Dental Traumatol* 1986;12:179-184.

Accepted November 19, 2001

International Endodontic Journal

Editor

Professor PMH Dummer,
Department of Adult Dental Health, Dental School,
University of Wales College of Medicine,
Heath Park, Cardiff CF14 4XY, UK
Telephone and Fax: +44 (0) 2920 742088
Email: IEJeditor@cardiff.ac.uk

01 November 2002

Dr Brenda Gomes

**Department of Restorative Dentistry
Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP
Avenida Limeira, 901 Bairro Areião
Piracicaba SP
CEP 13414-900
Brazil**

Dear Dr Gomes

Manuscript No: 02/0608

Title: In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine gel, calcium hydroxide paste and both intracanal medicaments combined

Authors: B P F A Gomes, M E Vianna, N T Sena, C C R Ferraz, A A Zaia, F J Souza-Filho

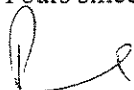
Thank you very much for submitting your article to the *International Endodontic Journal*.

Your manuscript will be sent to two referees for review and comment within the next few days. I will let you know as soon as I can whether or not your paper has been accepted for publication.

Should you wish to raise any issues about the paper please quote the reference number above.

With kind regards.

Yours sincerely,



PMH Dummer

Associate Editors

Professor JL Gutmann
Professor PR Wesselink

Assistant Editors

Dr C Reit
Dr J Whitworth



International Endodontic Journal

Editor

Professor PMH Dummer,
Department of Adult Dental Health, Dental School,
University of Wales College of Medicine,
Heath Park, Cardiff CF14 4XY, UK
Telephone and Fax: +44 (0) 2920 742088
Email: IEJeditor@cardiff.ac.uk

Associate Editors

Professor JL Gutmann
Professor PR Wesselink

Assistant Editors

Dr C Reit
Dr J Whitworth

17 October 2002

Dr Brenda Gomes

Área de Endodontia

Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP

Avenida Limeira, 901 Bairro Areião

Piracicaba SP

CEP 13414-900

Brazil

Dear Dr Gomes

Manuscript No: 02/0599

Title: In vitro evaluation of the susceptibility of some pathogens to calcium hydroxide combined with several vehicles

Authors: M E Vianna, B P F A Gomes, B A Berber, C C R Ferraz, A A Zaia, F J Souza-Filho

Thank you very much for submitting your article to the *International Endodontic Journal*.

Your manuscript will be sent to two referees for review and comment within the next few days. I will let you know as soon as I can whether or not your paper has been accepted for publication.

Should you wish to raise any issues about the paper please quote the reference number above.

With kind regards.

Yours sincerely,



PMH Dummer

1250 Análise computadorizada da radiopacidade de quatro cimentos endodônticos.

T. GUIMARÃES*, G. A. DE DEUS, E. GURGEL, T. COUTINHO, R. ZANETTI.

Departamento de Procedimentos Clínicos Integrados – FO-UFPR. Tel.: (0**21) 587-6373.

O objetivo final da terapia endodôntica consiste na obtenção de uma obturação tridimensional do sistema de canais radiculares. Assim, a radiopacidade assume um papel importante em relação às propriedades de um material obturador, uma vez que permite avaliar a qualidade da obturação. O objetivo deste trabalho foi avaliar qual dos quatro cimentos testados: Endo-Fill, Pulp Canal Sealer, Sealer 26 e AH Plus, possui maior radiopacidade. Inicialmente, os cimentos foram manipulados de acordo com instruções do fabricante e colocados em uma forma com diâmetro e espessura padronizados, tomando-se o devido cuidado para evitar a inclusão de bolhas. As amostras foram armazenadas até que o material endurecesse totalmente. A seguir, foi colocada uma amostra de cada cimento devidamente identificada sobre um filme periapical, submetendo-se o filme a um segundo de exposição radiográfica. As radiografias foram levadas a uma processadora automática, sendo, então, escaneadas e analisadas pelo programa Sens-A-Ray for Windows no computador. A área mais radiopaca de cada amostra foi selecionada pelo programa e medida a sua densidade óptica de acordo com uma escala de radiopacidade também fornecida pelo computador. Os valores variaram de zero a 255, sendo zero o valor de menor radiopacidade. De acordo com o teste estatístico de Kruskal-Wallis há diferença estatisticamente significativa entre a radiopacidade dos cimentos estudados ($p = 7,308$). No entanto, esta só pode ser afirmada entre os cimentos AH Plus e Sealer 26, como observado através do teste de Turkey ($p = 0,082$).

Concluiu-se que, no exame radiográfico, os cimentos testados apresentaram radiopacidade diferente. O Sealer 26 apresentou-se como o cimento menos radiopaco enquanto o AH Plus foi o cimento mais radiopaco.

1251 Influência da presença do ângulo cavossuperficial na infiltração marginal.

P. P. ROLA*, C. WACHO, S. M. HABITANTE.

Odontologia – UNITAU. E-mail: shabitante@uol.com.br

Objetivos: devemos sempre manter condição de saneamento conseguida durante a fase de preparo dos canais radiculares. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar qualitativamente a infiltração marginal em dentes com o preparo do ângulo cavossuperficial restaurados com dois materiais provisórios: Cimpat rosa e ionômero de vidro submetidos a ciclagem térmica. Métodos e Resultados: foram usados 50 dentes, realizou-se o acesso a câmara pulpar e foram divididos em 6 grupos: 2 grupos: controles positivo e negativo. Os outros 4 grupos continham 12 dentes e foram submetidos: G1- sem preparo do ângulo cavossuperficial e restaurados com Cimpat rosa; G2- com preparo do ângulo cavossuperficial e restaurados com Cimpat rosa; G3- sem preparo do ângulo cavossuperficial e restaurado com ionômero de vidro; G4- com preparo do ângulo cavossuperficial e restaurados com ionômero de vidro. Os espécimes foram submetidos a ciclagem térmica (700 ciclos por 2,5 minutos). Foram então imersos em azul de metileno a 0,5% pH 7,0 por 24 horas em estufa a 37°C. Os espécimes clivados e fotografados e foram avaliados conforme o critério: 1- infiltração ausente; 2- infiltração leve (restrita ao 1° mm do selamento); 3- infiltração moderada - até a metade da espessura do selamento e 4- infiltração intensa - até a câmara pulpar e submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. Os resultados não foram estatisticamente significantes a 0,5%. Porém as análises dos escores notou-se uma menor infiltração para o G2 (2,41), seguido, em ordem crescente pelos grupos: G1 (2,66), G3 (3,0) e G4 (3,25).

Conclusões: o menor grau de infiltração foi para o G2, seguido dos grupos: G1, G3 e G4.

1252 Capacidade antimicrobiana dos cimentos N-Rickert e Sealer 26.

C. WACHO*, P. P. ROLA, S. M. HABITANTE, A. O. C. JORGE.

UNITAU. Tel.: (0**12) 9771-0178. E-mail: shabitante@uol.com.br

Objetivos: a proposta deste trabalho foi estudar *in vitro* o efeito antimicrobiano dos cimentos Rickert, N-Rickert e Sealer 26 frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Candida albicans* e microrganismos bucais coletados do sulco gengival de pacientes com periodontite do adulto. Métodos e Resultados: placas de Petri foram semeadas com os microrganismos citados e realizou-se orifícios com tubo de vidro de 6 mm de diâmetro, onde foram colocados os cimentos N-Rickert, Rickert e Sealer 26 já proporcionados e espaturados conforme instruções do fabricante. Os meios foram incubados e após os halos de inibição foram medidos com auxílio de um paquímetro. Os resultados demonstraram atividade antimicrobiana para todos os cimentos sendo que ao aplicar o teste *t* de Student houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 1%, enquanto que nas outras interações não houve diferenças estatisticamente significantes.

Conclusões: o N-Rickert apresentou o maior halo de inibição de crescimento para os *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, enquanto o cimento Sealer 26 inibiu mais o crescimento das microrganismos bucais e *Streptococcus salivarius*.

1253 MEV da ação do EDTA e do NaOCl no canal radicular.

M. V. R. SO.

Departamento de Endodontia – Curso de Odontologia da ULBRA – Canoas – RS – Brasil. Tel.: (0**51) 346-5828. E-mail: marcosso@epovo.net

A ação dos instrumentos endodônticos sobre a parede dentinária promove a formação de uma massa de consistência pastosa, composta por raspas de dentina, matéria orgânica, substâncias químicas e, algumas vezes, bactérias, denominada magma dentinário. Neste estudo, avaliou-se, através da microscopia eletrônica de varredura, a limpeza das paredes dentinárias no terço apical de 40 incisivos centrais superiores humanos extraídos, representada pela presença ou ausência de magma dentinário. Estes dentes foram divididos em 4 grupos de 10 espécimes, utilizando-se o hipoclorito de sódio a 1,5% e o EDTA a 17%, isoladamente, ou de forma alternada, durante o preparo químico-mecânico do canal radicular. O resultado obtido permitiu verificar que quando se emprega o hipoclorito de sódio a 1,5% como a única solução química durante o preparo do canal radicular, o magma dentinário se tornou evidente em 9 dos 10 dentes preparados.

A utilização de substâncias quelantes isoladamente ou de forma alternada durante o preparo do canal possibilita a obtenção de um maior número de túbulos dentinários visíveis, ou seja, uma melhor limpeza das paredes de dentina.

1254 Avaliação da permeabilidade radicular após medicação intracanal com hidróxido de cálcio variando-se a solução irrigadora.

D. P. SÁNCHEZ, E. C. KAIRALLA*, J. L. LAGE-MARQUES, J. H. ANTONIAZZI.

Endodontia – FOUPE. Tel.: (0**11) 3818-7839. E-mail: jmarques@fo.usp.br.

O estudo avaliou a permeabilidade dentinária radicular em sistemas endodônticos medicados com pasta de hidróxido de cálcio e irrigados com três diferentes soluções: EDTA-T 15%, ácido cítrico 10% e tetrafluoreto de titânio 4%. Após o preparo químico-cirúrgico realizado de acordo com a técnica de Paiva & Antoniazzi os 40 espécimes foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos. Grupo I (10) - controle; Grupo II (10) - EDTA-T 15%; Grupo III (10) - ácido cítrico 10% e Grupo IV (10) - tetrafluoreto de titânio 4%. Os espécimes do Grupo I foram mantidos sem medicação, os demais foram medicados com pasta de hidróxido de cálcio P. A. veiculada em solução anestésica e, após dez dias, irrigados com 6 ml da respectiva solução irrigadora. Todos os espécimes foram então submetidos a infiltração do corante Rodamina B 1% e preparados para leitura.

Concluiu-se que: o percentual de infiltração nas diferentes situações expostas foi: Grupo I (76,6), Grupo II (49,5), Grupo III (46,0) e Grupo IV (30,0); ocorreram diferenças estatisticamente significativas na comparação dos resultados experimentais exceto na interação G-I versus G-IV. A análise morfológica em MEV apresentou achados relevantes quando observada a relação existente entre a superfície da parede do canal principal e o tratamento de esvaziamento dado aos espécimes de cada grupo experimental. (Apoio financeiro: FAPESP.)

1255 Avaliação radiográfica e microbiológica de dentes de ratos com lesão periapical induzida.

T. A. NORMANHA*, B. P. F. A. GOMES, C. R. GADÊ-NETO, A. A. ZAIA, F. J. SOUZA-FILHO.

Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Lesão periapical ocorre como uma reação inflamatória dos tecidos periradiculares a uma infecção bacteriana com destruição do osso alveolar e reabsorção radicular. O propósito desta pesquisa foi induzir lesões periapicais em dentes de ratos e realizar análise radiográfica e microbiológica dos canais radiculares infectados. Foram utilizados 5 ratos machos, da raça Wistar, pesando entre 280 a 300 g. Cada animal contribuiu com 2 dentes, num total de 10. Utilizou-se as raízes mesiais dos primeiros molares inferiores. Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (3 a 4 mg por 100 g de peso corpóreo) e posicionados em uma mesa operatória. O acesso à câmara pulpar foi feito com uma broca diamantada (# 3170 KCS) em alta rotação. Utilizando-se limas tipo K e água destilada estéril, o canal foi dilatado até a lima 30. A câmara pulpar foi deixada aberta, sem selamento coronário, por 30 dias. Após esse período, os dentes foram radiografados e foram realizadas as coletas microbiológicas dos canais radiculares com cones de papéis estéreis. Foram utilizados meios de transporte, cultura e incubação que propiciam o crescimento de bactérias anaeróbias estritas. Os ratos foram então sacrificados por inalação de éter. Lesão periapical estava presente em todos os dentes estudados. As coletas microbiológicas foram positivas em 100% dos canais, apresentando bactérias aeróbias facultativas e anaeróbias estritas. De todas as espécies bacterianas isoladas, 63,15% foram gram-negativas e 36,84% gram-positivas. Os gêneros bacterianos mais frequentemente isolados dos canais foram *Pseudomonas* (15,8%), *Haemophilus* (42,10%), *Staphylococcus* e *Streptococcus* (ambos com 10,52%).

O presente estudo demonstrou que a lesão periapical pode ser reproduzida e induzida em ratos, pela contaminação e infecção do canal radicular. (Apoio FAPESP 96/05584-3 e 99/11274-5; CNPq 520277/99-6.)

1256 Atividade antimicrobiana *in vitro* do gluconato de clorexidina gel.

M. E. VIANNA, B. P. F. A. GOMES, V. B. BERBER, C. R. FERRAZ, F. J. SOUZA-FILHO.

Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Clorexidina tem sido utilizada em Endodontia como irrigante ou medicação intracanal. O propósito deste estudo foi investigar a atividade antimicrobiana da clorexidina gel nas concentrações 0,2%, 1,0% e 2,0%, em diferentes períodos, contra *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. endodontalis* e *P. gingivalis* através do método de difusão em caldo. Foram colocados no interior de poços de culturas de células 1 ml de clorexidina gel na concentração a ser testada e a seguir adicionados 2 ml do inoculo bacteriano. Após 0, 15 e 30 s; 1, 3, 5, 10, 15 e 30 min e 1 e 2 h foram retirados 2 ml da suspensão, sendo 1 ml distribuído em tubos contendo meio de cultura adequado no qual a solução neutralizadora de clorexidina (Tween 80 + lecitina) foi adicionada e 1 ml colocado em tubos contendo apenas o meio de cultura líquido. Nutrozol (gel da clorexidina), a solução neutralizadora e solução salina foram utilizados como controles. Os tubos foram incubados a 37°C em condições gasosas adequadas por 7 dias para verificação de crescimento microbiano, evidenciado pela turbidez do meio. Aliquotas da suspensão de cada tubo foram subcultivadas em placas de agar-sangue. A pureza das culturas positivas foi confirmada através da morfologia do Gram, morfologia das colônias nas placas de agar-sangue e produção de catalase. Todos os testes foram realizados em triplicatas. Os resultados mostraram que os microrganismos anaeróbios estritos foram inibidos imediatamente após contato com todas as concentrações testadas, enquanto que os facultativos mostraram-se mais resistentes às concentrações inferiores a 2,0%. Clorexidina gel a 0,2% levou 2 h para ter ação antimicrobiana contra o *E. faecalis*.

Concluiu-se que a clorexidina gel possui ação antimicrobiana em todas concentrações testadas, sendo que esta ação depende de sua concentração e da suscetibilidade microbiana. (FAPESP, CNPq & FAEP.)

1257 Análise *in vitro* da suscetibilidade de microrganismos à clorexidina líquida.

V. B. BERBER*, B. P. F. A. GOMES, M. E. VIANNA, F. B. TEIXEIRA, F. J. SOUZA-FILHO.

Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

As propriedades antimicrobianas de um irrigante intracanal são importantes no preparo químico-mecânico. Clorexidina, conhecida por sua ação antimicrobiana, substancialidade e relativa ausência de citotoxicidade, tem sido utilizada como irrigante endodôntico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a suscetibilidade da *C. albicans*, *E. faecalis*, *P. endodontalis* e *P. intermedia* frente a clorexidina líquida a 0,2%, 1% e 2% através do teste de diluição em caldo. Um ml de cada substância a ser testada foi colocado no fundo de poços de culturas de células e a seguir adicionados 2 ml do inoculo microbiano. Decorridos 0, 15 e 30 s e 1, 3, 5, 10, 15 e 30 min, 1 ml de cada poço foi transferido para tubos contendo 3 ml de meio de cultura específico contendo neutralizador da clorexidina (Tween 80 + lecitina). Os tubos foram agitados e 1 ml de cada tubo foi subtransferido para tubos com meio de cultura adequado. A seguir os tubos foram incubados a 37°C por 7 dias nas condições gasosas adequadas. Os tubos com crescimento microbiano foram aqueles que apresentavam turbidez do meio durante o período de incubação. A pureza das culturas positivas foi confirmada através da morfologia de Gram, morfologia das colônias nas placas de agar-sangue e produção de catalase. Todos os testes foram feitos em triplicatas. A suscetibilidade desses microrganismos à clorexidina líquida foi variada. No tempo necessário para os irrigantes matarem as células microbianas foi observado que *E. faecalis* foi o organismo mais resistente (ausência de crescimento em 30 s de exposição à clorexidina 0,2%) enquanto que os outros microrganismos foram imediatamente eliminados em todas as concentrações testadas.

Concluiu-se que a clorexidina líquida nas concentrações utilizadas tem ampla ação antimicrobiana sobre fungos e bactérias anaeróbias e facultativas. (FAPESP, CNPq & FAEP.)

B053 Alteração morfológica da superfície dentinária após apicectomia com os lasers de CO₂ 9,6 ou Er:YAG.

GOUW-SOARES, S.¹, STABHOLZ, A.², LAGE-MARQUES, J. L.¹, EDUARDO, C. P.¹
1FOUSP - São Paulo - Brasil; 2Hebrew University - Israel.

A permeabilidade dentinária superficial e marginal após a apicectomia permitem a percolação de microorganismos e seus produtos do sistema de canais radiculares à região do periodonto comprometendo a reparação periapical. Este trabalho propõe avaliar a alteração morfológica da superfície dentinária após apicectomia e tratamento com os lasers de CO₂ 9,6 ou Er:YAG em 65 dentes humanos unirradiculares com os canais tratados endodonticamente e divididos em: grupo I, de controle cujos ápices foram seccionados com alta rotação; grupo II, da mesma maneira que o grupo anterior, porém com a superfície dentinária tratada com o laser de CO₂ 9,6; o grupo III, da mesma maneira que o grupo anterior, porém com a superfície dentinária tratada com o laser de Er:YAG; o grupo IV, apicetomizados e tratados com o laser de CO₂ 9,6 e o grupo V, apicetomizados e tratados com o laser de Er:YAG. As fotomicrografias demonstram que as amostras dos grupos II e IV (CO₂ 9,6) apresentam superfícies limpas, mais lisas, com fusão e resolidificação da dentina, distribuídas de maneira homogênea em toda superfície irradiada vedando os túbulos dentinários. As amostras dos grupos III e V (Er:YAG) também apresentaram superfícies limpas, sem "smear layer", no entanto, ligeiramente rugosas, compatíveis com aspecto de dentina ablacionada e sem a evidência de túbulos dentinários.

Nas condições deste estudo, as superfícies irradiadas e tratadas com os lasers de CO₂ 9,6 ou Er:YAG apresentaram alterações morfológicas que sugerem menor permeabilidade dentinária.

B054 Influência do laser Er:YAG na infiltração marginal apical de quatro cimentos obturadores.

MELLO, I. A., ANTONIAZZI, J. H., ROBAZZA, C. R. C.

Departamento de Dentística Restauradora - FOUSP. E-mail: robisabel@int.foa.br

O presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a influência da aplicação do laser Er:YAG após o preparo químico-cirúrgico no selamento marginal apical quando da utilização de diferentes cimentos obturadores. Os espécimes utilizados no experimento foram separados em quatro grupos de acordo com o cimento a ser utilizado: Sealapex, N-Rickert, AH Plus e Ketac-Bond. Metade dos dentes de cada grupo recebeu um tratamento nas paredes do canal radicular com laser Er:YAG para remover o magma dentinário enquanto a outra metade não recebeu. Após a obturação o selamento marginal foi determinado através da penetração do corante azul de metileno a 0,5% na interface material obturador/parede dentinária com prévio isolamento externo com cianoacrilato de etila.

Pela análise dos resultados verificou-se que não houve diferença estatística de penetração do agente indicador entre os dentes submetidos à aplicação do laser e os dentes que não receberam este tratamento. Entretanto, para os cimentos testados, as diferenças aconteceram entre o grupo formado pelo AH Plus e N-Rickert, com menor índice de infiltração em relação ao grupo formado pelo Ketac-Bond e Sealapex.

B055 Avaliação da determinação da odontometria utilizando-se métodos radiográfico e eletrônico.

FERREIRA, C. M. A., GURGEL FILHO, E. D., FRÖNER, I. C.

Disciplina de Endodontia - UNIFOR. Tel.: (0*85) 477-3200. E-mail: manigliaf@yahoo.com

Na busca de maior facilidade para se realizar a odontometria durante o tratamento endodôntico, muitos aparelhos eletrônicos têm sido desenvolvidos na tentativa de substituir as tomadas radiográficas. Nosso objetivo foi avaliar e comparar clinicamente a eficácia dos aparelhos Apex Finder (Analytic Technology, EUA) e Endosonic (Videntek, Brasil) em relação à técnica radiográfica, utilizada como rotina nas clínicas de Endodontia. Foram avaliados 220 canais radiculares, vitais e necrosados, sendo obtido o comprimento real do dente com os aparelhos eletrônicos e realizada a radiografia periapical de odontometria. Os comprimentos obtidos foram concordantes entre os 3 métodos em 67,72% dos canais com polpa vital, e em 70,0% dos canais com polpa necrosada. O Endosonic mostrou-se superior ao Apex Finder quando comparados com o método radiográfico, sendo que houve concordância entre os métodos em 91,36% e 69,09% respectivamente. Os aparelhos não apresentaram bons resultados quando os canais apresentam-se com os ápices totalmente atrevidos, incompletos ou arredondados.

Nossos resultados permitem-nos concluir que os aparelhos eletrônicos são de grande valia para se determinar o comprimento real dos dentes em Endodontia, porém ainda faz-se necessário o uso da radiografia periapical para a confirmação da odontometria em algumas situações clínicas que o uso do aparelho não é indicado.

B056 Estudo histopatológico da polpa de dentes portadores de periodontite agressiva.

AGUIAR, T. R. S.¹, LOTUFO, R. F., JAEGER, M., MANDARINO, D.

Departamento de Odontoclínica - FOUF; FOUSP.

O objetivo deste trabalho foi analisar as possíveis alterações pulpares em dentes humanos portadores de periodontite agressiva. Selecionou-se 28 pacientes, cuja idade variou entre 18 e 22 anos, obtendo-se 30 dentes unirradiculares isentos de cárie, abrasão, atrição, erosão, restaurações e tratamento periodontal prévio. O exame radiográfico evidenciou destruição de todo o osso de suporte até o ápice radicular. Na avaliação periodontal também observou-se destruição dos tecidos de suporte ultrapassando o ápice radicular. O exame endodôntico mostrou que todos os dentes eram vitais. Após exodontia e procedimentos para microscopia de luz, as lâminas foram analisadas em fotomicroscópio. Em 100% das amostras a polpa coronária apresentou características de normalidade (tecido conjuntivo frouxo). Em todas as amostras a polpa radicular mostrou alterações. As alterações mais frequentemente observadas na porção apical da polpa radicular foi fibrose (100%) e calcificação distrófica (36,3%). A única alteração observada na porção cervical da polpa radicular foi fibrose (73,3%).

Foi possível concluirmos que dentes sem cárie, abrasão, atrição, erosão, restaurações em pacientes portadores de periodontite agressiva envolvendo o ápice radicular apresentam alterações pulpares, as alterações mais frequentes foram fibrose e calcificação distrófica, estas alterações são mais observadas na porção apical da polpa radicular, a porção coronária da polpa apresenta características de normalidade.

B057 Prognóstico pulpar em dentes portadores de obliteração do canal radicular pós-traumática.

BASTOS, J. V. A., CORTES, M. I. S., BASTOS, F. P.

Departamento de Odontologia Restauradora - FO - UFMG.

E-mail: anailuj@dedalus.lcc.ufmg.br

O presente estudo teve como objetivo acompanhar, clínica e radiograficamente, a evolução da condição pulpar de dentes portadores de obliteração do canal radicular pós-traumática (OCR), seus fatores determinantes e características clínico-radiográficas. Embora já existisse na literatura referências à ocorrência e natureza cicatricial benigna das calcificações pulpares após lesões traumáticas, foram ANDREASEN *et al.* que em 1987, primeiro descreveram este fenômeno como uma das possíveis modalidades de reparo pulpar após traumatismos que afetavam o feixe vaso-nervoso apical, denominando-o obliteração do canal radicular pós-traumática. Neste levantamento foram analisados dados de 71 pacientes da Clínica de Traumatismos Dentários da Faculdade de Odontologia da UFMG, num total de 80 dentes portadores de OCR pós-traumática acompanhados durante um período médio de controle de 4,6 anos.

Os resultados obtidos permitem confirmar as luxações em dentes jovens como situações propícias para a evolução da OCR uma vez que na sua maioria, os pacientes foram acometidos por lesões por luxação (53,9%) em idades inferiores a 12 anos de idade (80%). A maioria dos dentes respondeu positivamente à prova elétrica e a ocorrência de alteração de cor da coroa não foi significativa (9%). Além disso, a necrose pulpar não representou um achado frequente (6,3% dos casos) demonstrando o bom prognóstico em relação à cicatrização pulpar, o que justifica condutas mais conservadoras diante destes casos.

B058 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana da clorexidina.

VIANNA, M. E. A., GOMES, B. P. F. A., FERRAZ, C. C. R., BERBER, V. B., SOUZA-FILHO, F. J.

Endodontia - FOP - UNICAMP.

A clorexidina tem sido utilizada em Endodontia como irrigante e medicação intracanal. O propósito deste estudo foi avaliar a ação antimicrobiana do gluconato de clorexidina a 0,2%, 1,0% e 2,0% nas formas gel e líquida, utilizando dois métodos: a) difusão em agar; b) contato direto. Os microrganismos testados foram: *E. faecalis*, *C. albicans*, *S. aureus*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*. No método de difusão em agar cilindros de aço inox foram colocados sobre placas de agar previamente inoculadas. Os irrigantes testados e seus controles foram introduzidos dentro dos cilindros. As zonas de crescimento microbiano foram medidas depois do período de incubação de cada placa e os resultados analisados estatisticamente. No método de contato direto, foi utilizada a diluição em caldo e os tempos gastos para que as substâncias testadas destruíssem as células microbianas foram anotados. Os resultados mostraram que os microrganismos anaeróbios estritos foram os mais suscetíveis, apresentando as maiores zonas de inibição (n = 15,43 mm) e inibição imediata quando em contato direto com todas as substâncias testadas. Por outro lado, *E. faecalis* foi o que apresentou as menores zonas de inibição (n = 4,11 mm) e levou mais tempo para ser eliminado no teste de contato direto.

Concluímos que o gluconato de clorexidina possui ação antimicrobiana em todas as concentrações testadas, em ambos os métodos utilizados. Entretanto sua ação depende da concentração, forma de apresentação e da suscetibilidade microbiana. (Apoiar: FAPESP 96/05584-3 e CNPq 52027/99-6.)

B059 Avaliação da técnica híbrida de Tagger em presença e ausência de "smear layer".

FREITAS, L. F. A., GOMES, I. C., CHEVITARESE, O., ALMEIDA, N. S., NASCIMENTO, J.

Departamento de Odontoclínica - UFF. Tel.: (0*21) 274-5228. E-mail: icamoes@matrix.com.br

Este trabalho avaliou a capacidade de penetração do material obturador no sistema de canais radiculares em presença e ausência de "smear layer". Foram usados 14 caninos extraídos, por razões clínicas, que após limpeza e saneamento dos condutos foram divididos em dois grupos de sete: Grupo 1 - foi realizada remoção de "smear layer" por meio de irrigação com 10 ml de ácido cítrico em fluxo constante por 30 s; Grupo 2 - não foi realizada remoção de "smear layer". Todos os canais foram preenchidos com cimento Endo-Fill e cones de guta-percha, pela técnica híbrida de Tagger. As raízes foram cortadas em terços e apenas os terços médios foram aproveitados sendo "splitados" obtendo-se um total de 28 amostras, observadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), com finalidade de se observar o grau de penetração do material obturador nos túbulos dentinários. Os corpos-de-prova foram visualizados com aumentos de 16, 500, 1.000, 2.000, 6.000 e 7.000 vezes, avaliando-se o percentual de túbulos dentinários preenchidos. Pode-se concluir que o Grupo 1 mostrou presença de material obturador em 56,6% de seus túbulos dentinários, percentagem significativamente maior que a do Grupo 2 onde observou-se apenas 10% de túbulos preenchidos, deixando explícito que a remoção de "smear layer" possibilita um embricamento mecânico do material obturador substancialmente superior.

B060 Avaliação comparativa *in vitro* da capacidade de preenchimento do sistema de canais radiculares de diferentes técnicas de obturação.

MAZOTTI, D. A., BONETTI FILHO, I.

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a capacidade de preenchimento do canal radicular utilizando-se da técnica de condensação lateral ativa, híbrida modificada, ultra-som Enac, Therafil, Microseal e System B. Para este estudo foram empregados 174 dentes humanos unirradiculares, incluídos em blocos de resina, seccionados longitudinalmente, unidos em um aparato de madeira com parafusos e divididos em seis grupos com 29 dentes cada. Após a instrumentação com auxílio de brocas, foi confeccionada uma depressão em cada terço do canal radicular em uma das metades do dente. Em seguida, os dentes foram obturados com as técnicas citadas. Para a avaliação da qualidade da obturação, foram realizadas fotos com aumento de 1,5 X e tomadas radiográficas, submetidas a diferentes escores.

Após análise estatística macroscópica e radiográfica, as técnicas Microseal e Therafil foram as que apresentaram melhores resultados quanto a capacidade de preenchimento, número de falhas e homogeneidade em relação às técnicas condensação lateral ativa, híbrida modificada, ultra-som Enac e System B.

la037 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ gluconato de clorexidina 2% e associação de ambos

SENA, N. T.*, GOMES, B. P. F. A., VIANNA, M. E., BERBER, V. B., FERRAZ, C. C. R.
Odontologia Restauradora - Universidade Estadual de Campinas.
E-mail: neyllasimoes@yahoo.com

Hidróxido de cálcio desenvolve um importante papel por induzir a formação de tecido duro e ação antibacteriana. Tem-se sugerido que sua associação com a clorexidina tem um ganho no seu efeito antimicrobiano. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade antimicrobiana do $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{H}_2\text{O}$, da clorexidina gel 2% e da associação de ambos (1:1), usando dois métodos: a) difusão em ágar; b) contato direto. *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* foram testados. No método de difusão em ágar, cilindros de aço foram colocados sobre placas de ágar inoculadas. As substâncias testadas e os controles foram colocados dentro dos cilindros. As zonas de inibição de crescimento foram medidas e registradas após a incubação. No método do contato direto, o tempo que a medicação levou para matar as células microbianas foi anotado. Os resultados do teste de diluição em ágar mostraram que os anaeróbios estritos foram mais susceptíveis que os facultativos, mostrando uma maior zona de inibição ($n = 13$ mm), exceto o $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{H}_2\text{O}$ que matou por contato com o medicamento. No teste de contato direto, os microrganismos estritos foram eliminados primeiramente que os facultativos, necessitando em média 1,73 min, ao passo que os facultativos necessitaram em média 13 h e 34 min.

Concluímos que todos os medicamentos testados tiveram atividade antimicrobiana, entretanto esta atividade depende do mecanismo de ação das substâncias além da susceptibilidade microbiana. (Apoio: FAPESP - 00/13689-7; CNPq - 0277/99-5.)

la038 Avaliação da permeabilidade dentinária utilizando soluções irrigantes e ultra-som no clareamento dental

CARRASCO, L. D.*, FRONER, I. C., PECORA, J. D., SOUZA, L. G.
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.
E-mail: froner@forp.usp.br

O objetivo foi analisar quantitativamente *in vitro* a alteração da permeabilidade dentinária após a aplicação de diferentes soluções irrigantes na câmara pulpar, ativadas ou não pelo ultra-som, e do agente clareador interno. Foram utilizados 26 dentes anteriores superiores, com tratamento endodôntico convencional e tampão cervical com cimento de ionômero de vidro Vidron restaurador. As soluções irrigantes utilizadas foram: água destilada, EDTA 17% e hipoclorito de sódio a 1%, ativadas ou não pelo ultra-som. Com a câmara pulpar preenchida com a solução irrigante, aplicou-se a ponta TIP 37 ativada pelo aparelho de ultra-som por 15 segundos, troca da solução irrigante e repetição por mais 2 vezes. Nos grupos sem aplicação do ultra-som, o irrigante permaneceu na câmara pulpar por 15 segundos e foi substituído também por 3 vezes. A câmara pulpar seca, foi preenchida com a pasta de perborato de sódio com água destilada. As trocas estabelecidas do agente clareador houve repetição dos procedimentos. A permeabilidade dentinária foi detectada por meio da infiltração do íon cobre revelado pelo ácido rubicínio. Os dentes foram seccionados no sentido transversal, fixados e montados em lâminas que foram analisadas utilizando-se um sistema de imagem digitalizada, composto por microscópio acoplado a um microcomputador, utilizando o programa KS 300 v. 2.0. Os resultados mostraram que a aplicação do ultra-som promoveu aumento da permeabilidade dentinária com todas as soluções avaliadas.

Podemos concluir que no clareamento dental interno a aplicação do ultra-som, pelo aumento da permeabilidade dentinária, poderá promover uma maior eficácia dos agentes clareadores. (Apoio: FAPESP - 00/12180-3.)

la039 Avaliação do selamento e extravasamento de materiais utilizados em perfurações de furca

FALEIROS, F. C. B.*, TANOMARU, J. M. G., TANOMARU FILHO, M.
Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista.
E-mail: fredhor@francanet.com.br

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade seladora e extravasamento de materiais utilizados no selamento de perfurações de furca. Quarenta e oito molares inferiores de humanos tiveram a porção coronária e o terço apical radicular seccionados. As raízes foram posicionadas sobre material de moldagem à base de silicone de condensação e foram confeccionadas cavidades na região central da bifurcação, simulando perfuração de furca. Realizada a impermeabilização da superfície dentária externa até a proximidade da perfuração, as cavidades foram preenchidas via câmara pulpar com os seguintes materiais, estabelecendo os grupos experimentais: I) Sealer 26; II) Sealapex + óxido de zinco; III) Pro Root MTA e IV) MTA Angelus. Em seguida, os dentes foram imersos em solução de azul de metileno a 2%, em ambiente à vácuo, durante 48 horas. Após este período, as raízes foram seccionadas e o extravasamento de material pela furca e a infiltração marginal foram analisados, por meio de escores. Os resultados obtidos demonstraram que o Sealer 26 proporcionou maior extravasamento que os demais materiais ($p < 0,05$). Quanto à capacidade seladora, diferença significativa foi observada entre o Sealer 26 com melhor selamento e o Sealapex acrescido de óxido de zinco ($p < 0,05$). Os materiais à base de mineral trióxido agregado foram semelhantes aos demais materiais ($p > 0,05$).

Conclui-se que o Sealer 26 apresenta boa capacidade seladora e maior intensidade de extravasamento, e os materiais à base de mineral trióxido agregado são satisfatórios nas duas avaliações.

la040 MEV da parede dentinária quando do emprego do Glyde-Prep

VIEGAS, A. P. K.*, SÓ, M. V. R., BELLO, F., KRAUSE, M., SIGNORI, R. S., VIER, F.
Odontologia - Universidade Luterana do Brasil. E-mail: aviegas@portoweb.com.br

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, através do MEV, a limpeza das paredes dentinárias do terço apical de dentes humanos frente ao emprego do Glyde-Prep (Dentsply-Maillefer), durante o preparo dos canais radiculares. Para tanto, foram utilizados 36 incisivos centrais superiores, divididos em 3 grupos experimentais, os quais tiveram seus canais preparados com limas tipo K e com o seguinte regime de irrigação: Grupo 1 (12 dentes) - irrigação com hipoclorito de sódio 1%. Grupo 2 (12 dentes) - irrigação com hipoclorito de sódio 1% + agitação EDTA 17% pós-preparo + irrigação final com hipoclorito de sódio 1%. Grupo 3 (12 dentes) - hipoclorito de sódio 1% + Glyde-Prep durante o preparo + irrigação final com hipoclorito de sódio 1%. Os resultados demonstraram que o padrão de limpeza, em função da presença ou ausência de magna dentinária, foi igual no grupo 1 e grupo 3, com 11 espécimes de cada grupo mostrando um magna dentinário intenso e ausência de túbulos dentinários visíveis. No grupo 2, 9 espécimes mostraram-se isentos de magna dentinário (teste de qui-quadrado - $p < 0,001$).

É lícito concluir que o emprego do Glyde-Prep durante o preparo do canal não permitiu a visualização da abertura dos túbulos dentinários, em nível de terço apical, na quase totalidade dos dentes observados.

la041 Adaptação de materiais em obturação retrógrada: análise em microscopia eletrônica de varredura

MATARAZZO, T. R.*, DUARTE, M. A. H., YAMASHITA, J. C., OLIVEIRA, E. C. G., KUGA, M. C.
Odontologia - Universidade do Sagrado Coração. E-mail: lismy@bol.com.br

A proposta do trabalho foi avaliar por meio de microscopia eletrônica de varredura, a adaptação de alguns materiais quando empregados em obturação retrógrada. Foram utilizados trinta caninos uniradiculares do banco de dentes da Universidade do Sagrado Coração que tiveram suas coroas seccionadas e seus canais tratados endodônticamente. Posteriormente realizou-se a apicectomia e, então, preparou-se à cavidade retrógrada com ultra-som. Os dentes foram divididos em 6 grupos em função do material utilizado na obturação retrógrada, sendo: GI- Pro Root TM MTA; GII- MTA Angelus; GIII- Super EB A; GIV- IRM; GV- Cimento Portland; GVI- Sealer 26. Os dentes foram imersos em água destilada por 15 dias, posteriormente foram secos, metalizados e analisados em microscopia eletrônica de varredura, estipulando escores em função da adaptação: escore 0- adaptado em todas as paredes; escore 1- desadaptado em 1/4 da obturação; escore 2- desadaptado em metade das paredes; escore 3- desadaptado em 1/3; escore 4- desadaptado em todas as paredes. Os dados foram comparados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis para análise global e comparação individual pelo teste de Miller. Os resultados mostraram que o grupo VI foi o melhor, diferenciando-se estatisticamente do grupo V que apresentou os piores resultados.

Conclui-se que o Sealer 26 foi o material que melhor se adaptou quando empregado em obturações retrógradas. (Agradecimento: PIBIC/CNPq e NAP/MEP-USP.)

la042 Contribuição ao estudo das alterações cromáticas - apresentação de uma metodologia de escurecimento dental

MAGALHÃES, M. C. B.*, FERREIRA, M. B., FRANCO DE CARVALHO, E. M. O., FRANCO DE CARVALHO, B. C., ROBAZZA, C. R., LAGE-MARQUES, J. L.
Clínica e Cirurgia - Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas/Centro Universitário Federal.
E-mail: mcbmagal@zipmail.com.br

O objetivo deste estudo é avaliar a técnica *in vitro* para escurecimento dental provocado por sangue. As alterações das cores foram avaliadas por análise espectrofotométrica e pela observação visual, baseada em uma escala de cor em dois tempos experimentais: cor natural dos dentes (LI) ou leitura inicial e cor: dos dentes escurecidos (LE) ou leitura após o escurecimento. Na análise espectrofotométrica foram encontrados valores de L^* (luminosidade) e a^* e b^* (matiz e saturação) com os quais foram quantificadas as alterações cromáticas dos espécimes. A observação visual através da comparação com a escala de cor (Vita), demonstrou uma alteração significativa no padrão de cor natural para o padrão de cor após o escurecimento. Os resultados mostraram ser a técnica de escurecimento eficaz e de fácil execução, uma vez que poderão ser obtidos modelos experimentais próximos da realidade clínica e que serão úteis em experimentos que tenham como objetivo a avaliação das alterações cromáticas das coroas dentais.

A técnica de escurecimento dental mostrou-se eficaz e de fácil execução. Análise espectrofotométrica e a observação visual registraram alterações colorimétricas significativas nos espécimes testados.

la043 Compatibilidade biológica do EDTA, EDTA-T e ácido cítrico em mandíbulas de ratos

SILVA, V. S.*, SCELZA, M. Z., CABRAL, M. G., CAMPOS, C. A. M., BARRETO, M. L., SCELZA, P.
Odontoclínica - Universidade Federal Fluminense. E-mail: vivigus@bol.com.br

O presente estudo avaliou a compatibilidade biológica de três substâncias quelantes utilizadas na Endodontia (EDTA 17%, EDTA-T e ácido cítrico 10%) quando implantadas em mandíbulas de ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*). Foram utilizados 36 animais nos períodos de 1, 7, 14 e 28 dias, com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Animais de Laboratório da UFF. A inserção de cada substância foi possibilitada por um material carreador (Fibrino®) colocado em perfurações bicoronárias realizadas em ambos os lados da mandíbula dos animais, onde um dos lados apresentava apenas o Fibrino® sem a substância teste (controle). Cada quelante foi testado em 3 ratos nos 4 diferentes tempos. Os resultados demonstraram que o material carreador teve presença constante nas lojas cirúrgicas em todos os tempos do estudo tanto nas amostras de substâncias teste quanto nos controles. Após 24 horas, as amostras com as substâncias teste e os controles apresentaram reação inflamatória aguda com a presença de polimorfonucleares de distribuição difusa. Nos períodos de tempo de 7, 14 e 28 dias, constatou-se a presença do Fibrino® associado à reação inflamatória de corpo estranho em todas as amostras. Observaram-se também áreas de reparação caracterizadas pela proliferação de células mesenquimais e osteogênese, as quais intensificavam-se com o passar do tempo reduzindo-se a resposta inflamatória.

Concluiu-se que o EDTA 17%, o EDTA-T e o ácido cítrico 10% não apresentaram diferenças na evolução reparativa quando comparados entre si. (Apoio financeiro: FAPERJ - processo E-26/171.984/2000.)

la044 Avaliação do selamento promovido pela obturação dos canais radiculares através da técnica de Tagger modificada

BOLZANI, L. M. V.*, PAPPEN, F. G., PAPPEN, A. F., PAPPEN, M. L. G., DEMARCO, F. F.
Odontologia Restauradora - Universidade Federal de Pelotas. E-mail: lbolzan@ufpel.tche.br

Significante infiltração de bactérias pode ocorrer em canais radiculares obturados, devido a um defeito ou à perda da restauração coronária, fratura da estrutura dentária ou cédries recorrentes, expondo o material obturador dos canais radiculares e promovendo, desta forma, a contaminação dos tecidos periapicais e consequente insucesso endodôntico. O objetivo deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, a infiltração no sentido coroa-ápice observada em canais obturados pela técnica de Tagger modificada. Foram utilizados 45 dentes uniradiculares, divididos em 3 grupos experimentais: no grupo I o cimento utilizado foi o Sealapex; no grupo II os canais foram obturados com AH Plus; e no grupo III, foi também realizada a obturação através da termoplastificação da guta-percha, sem, no entanto utilizarmos cimento endodôntico. Após a termociclagem, os dentes foram imersos em azul de metileno a 2% por 12 horas e seccionados longitudinalmente para avaliação da microinfiltração, a qual foi quantificada através da contagem de pontos em reproduções fotográficas. Os dados foram submetidos à análise estatística através dos testes ANOVA e DMS de Fisher (5%). O grupo III apresentou uma média de infiltração maior que os demais grupos, sendo esta diferença estatisticamente significativa. No entanto, não observamos diferença entre o selamento promovido pelos dois cimentos avaliados.

Podemos concluir que mesmo com a utilização da técnica de Tagger modificada, é indispensável o uso de um cimento obturador para o melhor selamento dos canais radiculares.

lb024 Estudo da anatomia interna de dentes de cães através do método da diafanização

BALTIERI, P. W. Q. *, GOMES, B. P. F. A., GADÊ-NEITO, C. R., QUADROS, L. ZAIA, A. A., TEIXEIRA, F. B.

Odontologia Restauradora - Universidade Estadual de Campinas. E-mail: pqwb@yahoo.com

Apesar de cães serem usados como modelo animal, para estudo das reações periapicais frente à terapia endodôntica, devido ao seu tamanho e fácil manuseio, a anatomia de seus canais radiculares não foi totalmente estudada. Estudos experimentais em cães relataram apenas a presença de deltas apicais. O objetivo desta investigação foi estudar a morfologia dos terços cervical, médio e apical de dentes de cães, através da técnica de diafanização. Quarenta e dois dentes de cães foram extraídos, lavados, limpos e colocados em solução de formol a 10%. Os dentes utilizados foram incisivos (n = 12), caninos (n = 4), pré-molares (n = 16) e molares (n = 10). As amostras foram submersas em NaOCl 5,25% por seis horas, para dissolução do tecido pulpar. A seguir os dentes foram descalcificados em HCl 5%, desidratados em bateria ascendente de álcoois, sendo então realizada a injeção de corante, diafanização em salicilato de metila e visualização em lupa estereoscópica. Deltas apicais foram encontrados em 78,2% dos dentes estudados, canais laterais apareceram em 7,2% dos casos, principalmente nos terços cervical e médio. A porcentagem de canais laterais encontrada em pré-molares e molares foi de 12,5% e 10%, respectivamente.

Concluímos que o sistema de canais radiculares de cães pode mostrar uma maior variabilidade do que a relatada na literatura. Além disso a presença de canais laterais qualifica este modelo animal para o estudo das lesões endo-perío. (Apoio: FAPESP - 00/13689-7 e CNPq - 520277/99-6; 105889/2001-6.)

lb025 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de cinco cimentos endodônticos

SIGNORETTI, F. G. C. *, GOMES, B. P. F. A., PEDROSO, J. A., TEIXEIRA, F., VIANNA, M. E., JACINTO, R. C., FERRAZ, C. C. R.

Odontologia Restauradora - Universidade Estadual de Campinas. E-mail: fe_signo@yahoo.com

Atividade antimicrobiana tem um importante papel na eficiência dos cimentos endodônticos durante a obstrução do canal radicular. Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar a ação antimicrobiana de cinco cimentos endodônticos: Endo Fill, Endomethasone, Endomethasone N, Sealer 26 e AH Plus, em diferentes tempos após a manipulação, i.e., imediatamente após, 24 horas, 48 horas e 7 dias; contra os seguintes microrganismos: *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. sanguis* e *A. naeslundii*. O método usado foi o contato direto através da observação da curva de crescimento microbiano em meio líquido. Os resultados mostraram que: 1) imediatamente após a manipulação, Endo Fill, Endomethasone e Endomethasone N tiveram a maior atividade antimicrobiana, sem diferenças estatisticamente significantes entre eles. Sealer 26 teve a menor atividade antimicrobiana. 2) Nos demais tempos pós-manipulação, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os cimentos testados.

Concluímos que a atividade antimicrobiana de cada cimento diminui com o tempo e depende da suscetibilidade do microrganismo envolvido. (Apoio: FAPESP: 00/13689-7 e CNPq: 520277/99-6.)

lb026 Avaliação microbiológica das espumas sintéticas que armazenam as limas endodônticas

LA CERDA, R. S. *, NEVARES, G. O., HIRATA JR., R., DE DEUS, G. A., COUTINHO T.

Procedimentos Clínicos Integrados - Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

E-mail: renatacerda@ig.com.br

Este trabalho objetivou avaliar microbiologicamente as espumas sintéticas submetidas a ação do álcool isopropílico e do glutaraldeído 2% em diferentes períodos de exposição. Como corpo-de-prova (CP), esponjas com Ø 1,0 cm foram expostas ao caldo Tryptase Soy Broth - TSB para determinação do nível de contaminação. Na 1ª fase do experimento, os CP foram submetidos aos agentes químicos, durante um intervalo de tempo variado: imediato, após 10, 15 e 30 min. Na 2ª fase, os CP foram esterilizados em autoclave e então contaminados com *S. aureus* e *E. coli*. A amostragem foi submetida ao contato com os diferentes agentes desinfetantes. Na 1ª fase, houve crescimento bacteriano nos CP imersos no glutaraldeído. Nos tempos subsequentes, não houve crescimento. Nos CPs imersos em álcool isopropílico não houve crescimento em nenhum dos tempos avaliados. Na 2ª fase, CPs inoculados com *S. aureus* e imersos no glutaraldeído sofreram crescimento bacteriano, imediatamente após o contato com esta substância. Nos demais tempos, não houve crescimento. CPs imersos no álcool isopropílico não apresentaram crescimento bacteriano. CPs inoculados com *E. coli*, 2 CPs imersos no glutaraldeído apresentaram crescimento bacteriano no contato imediato. Nos demais tempos, não houve crescimento. Em todos os períodos, o álcool não houve crescimento.

As esponjas obtidas comercialmente vem contaminadas; as soluções de glutaraldeído e álcool isopropílico foram eficazes na atividade desinfetante para os microorganismos testados, sendo que o álcool foi mais eficaz no contato imediato.

lb027 Estudo comparativo da capacidade de 3 localizadores apicais eletrônicos na determinação do comprimento dos dentes

COSTA, F. L. M. *, BOLAN, M., FELIPPE, M. C. S., FELIPPE, W. T.

Estomatologia - Universidade Federal de Santa Catarina. E-mail: felebarbenchon@hotmail.com

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de três aparelhos eletrônicos localizarem o forame apical, bem como um ponto situado próximo e aquém do forame. Foram empregados 100 dentes humanos. Após o acesso aos canais, os dentes foram medidos pela técnica direta, inserindo-se uma lima no canal até que sua ponta fosse visualizada no forame apical, a distância foi medida com um paquímetro. Em seguida, os dentes foram medidos, duas vezes, pelos três localizadores apicais (Neosono Última EZ, Foramatron IV e Tri-Auto ZX). Para a primeira medida, a lima foi introduzida no canal até que seus aparelhos acusassem que a sua ponta chegou ao forame apical (CEF). Para a segunda medida, a lima foi removida do canal no momento em que os aparelhos acusassem que sua ponta chegou à constricção apical ou ao ponto 0,5, visível no visor (CEC). Para avaliar a capacidade dos aparelhos localizarem o forame, foi feita uma comparação das primeiras medidas eletrônicas com as obtidas pelo método direto (CEF versus CD). As medidas eletrônicas foram consideradas aceitáveis quando coincidentes com as medidas diretas, ou diferentes $\pm 0,5$ mm. Para avaliar a capacidade dos aparelhos localizarem um ponto próximo e aquém do forame, foi feita uma comparação das segundas medidas eletrônicas com as obtidas pelo método direto (CEC versus CD).

De acordo com os testes estatísticos aplicados, o Tri-Auto ZX mostrou-se o aparelho mais efetivo na localização do forame apical (86,3% de medidas aceitáveis) e alcançou o maior percentual de acertos na localização de um ponto situado próximo e aquém do forame (84,2%).

lb028 Avaliação dos canais e forames apicais da raiz vestibular do 1º pré-molar superior com sulco longitudinal vestibular

MATTEUCLA, L. G. *, MAZZOCATO, G., VIER, F. V., SÓ, M. V. R.

Endodontia - Universidade Luterana do Brasil. E-mail: mattuella@bol.com.br

O objetivo do estudo foi avaliar radiograficamente o número de canais radiculares da raiz vestibular de 1º pré-molares superiores (1º PMS) com sulco longitudinal vestibular e comparar o método radiográfico (MR) com a microscopia eletrônica de varredura (MEV), quanto ao diagnóstico de n° de forames apicais (FA). Para tanto, 39 dentes tiveram suas coroas e raízes palatinas amputadas e seu(s) canal(is) radicular(es) explorado(s) com lima(s) endodôntica(s) fina(s), até que sua(s) ponta(s) fosse(m) visualizada(s) apicalmente. Os dentes foram radiografados com as limas em seu interior e classificados como portadores de 1 canal (C)/1 forame (F); 1C/2F; 2C/2F; 2C/1F. Os ápices da raiz vestibular foram seccionados e preparados para MEV. O n° de FA ($\geq$ que 80 μ m) foram obtidos. Os resultados da avaliação radiográfica demonstraram que em apenas 17,1% (06) dos casos, esse dente apresentou C e F únicos. 2 F foram verificados em 77,2% (27) dos casos, 42,9% (15) desses oriundos de 2C e 34,3% (12), de apenas 1 canal. Apresentaram 2C que terminavam no mesmo F 5,7% (2) dos casos. Em MEV, 46,1% (18) dos ápices apresentaram 2FA; 23,1% (9), apenas 1; 23,1% (9), 3 e 7,7% (3), 4. A correlação entre o diagnóstico radiográfico e a MEV quanto ao n° de FA foi de 62,8%.

Concluiu-se que a presença de sulco longitudinal vestibular no 1º PMS predispõe a bifurcação total (42,9%) ou apical (34,3%) do canal radicular; sendo que a MEV apresentou número de FA estatisticamente superiores ($p < 0,01$) ao demonstrado no MR.

lb029 Variação da dureza de uma liga NiTi após tratamentos térmicos

GUIMARÃES, R. H. R. *, LACERDA, D. L., MARTINS, R. C., BAHIA, M. G. A., BUONO, V. T. L.

Odontologia - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.

E-mail: raquelhannas@bol.com.br

Os instrumentos endodônticos rotatórios de níquel-titânio (NiTi) podem falhar devido à fadiga. Como em outros dispositivos, a resistência à fadiga destes instrumentos depende da dureza, que influencia na velocidade de propagação de trincas. Sabe-se ainda que, durante a terapia endodôntica, as limas são esterilizadas, sofrendo ciclos de aquecimento que podem afetar sua dureza. Foi o objetivo do presente estudo avaliar a variação da dureza de fios de NiTi utilizados na confecção de instrumentos ProFile (Maillefer, Ballaigues/Suíça), quando estes são aquecidos em temperaturas compatíveis com aquelas normalmente empregadas na esterilização. As amostras foram tratadas em banho de óleo de silicone a 120°, 140°, 160° e 180°C por 2 horas e a 180°C por 4, 6 e 8 horas. A variação de dureza foi avaliada com uma média de, no mínimo, dez medidas de microdureza Vickers com carga de 300 gf em cada amostra. Os resultados mostram que, em relação ao grupo controle, que não recebeu tratamento térmico, não houve variação significativa na dureza dos fios tratados a 120°C e a 140°C. Nos tratamentos a 160°C e 180°C por 2 horas, houve um aumento de dureza respectivamente de 4,5% e 9,5%. Após 4 horas de tratamento a 180°C, a dureza retornou ao patamar inicial, onde se manteve nos tratamentos por 6 e 8 horas.

Estes resultados mostram que há uma tendência inicial de endurecimento da liga no aquecimento, que pode favorecer a resistência à fadiga dos instrumentos, e que o emprego de tempos mais longos a 180°C acarreta apenas o retorno à dureza original.

lb030 Análise da espessura da linha do cimento endodôntico em três técnicas de obturação

LIMA, A. C. *, DE DEUS, G. A., GURGEL, E. D., MANIGLIA, C., PIRO, S. A., KREBS, R. L., FERREIRA, N. A.

Endodontia - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. E-mail: endocarlina@yahoo.com.br

Este estudo objetivou analisar a espessura da linha de cimento endodôntico em 3 técnicas de obturação. 30 incisivos superiores foram acessados e instrumentados de modo convencional. Os dentes foram separados em 3 grupos de 10 e obturados pelo seguinte critério: G1 - condensação lateral; G2 - compressão hidráulica; G3 - onda de condensação. Os dentes foram embutidos em resina epóxi e cortados transversalmente em 3 pontos por meio de um cortador de precisão (Isomet) - sendo o 1º corte no terço cervical, o 2º no terço médio e o 3º no terço apical. Uma preparação metalográfica para observação microscópica foi realizada em cada amostra e estas analisadas no microscópio óptico (Carl Zeiss). A medição da espessura da linha de cimento foi realizada através do programa Image Pro 4.0 (Media Cybernetics). Os dados obtidos foram tratados estatisticamente pelo teste de Wilcoxon. Os resultados da análise do terço cervical revelaram um posto médio de 97 μ m para G1, 53 μ m para G2 e 29 μ m para G3, sendo estas diferenças significantes ($p \leq 0,05$). Na análise do terço médio, obteve-se 141 μ m para G1, 97 μ m para G2 e 47 μ m para G3, sendo estas diferenças significantes ($p \leq 0,05$). Na análise do terço apical, os resultados foram de 337 μ m no G1, de 352 μ m no G2 e de 187 μ m no G3, sendo as diferenças significantes entre G3 e G1 e entre G3 e G2 ($p \leq 0,05$).

O grupo 3 (técnica de onda de condensação) obteve os melhores resultados em todos os níveis analisados, revelando assim, uma tendência da obtenção de menores espessuras da película do cimento endodôntico quando realizada a plastificação da guia-percha.

lb031 Análise qualitativa do preenchimento promovido por quatro técnicas de obturação

REZENDE, P. R. S. *, DE DEUS, G. A., COUTINHO, T., KREBS, R. L., FERREIRA, N. A.

Centro Biomédico - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. E-mail: patty@montreal.com.br

Este trabalho objetivou avaliar a qualidade do preenchimento promovido por 4 técnicas de obturação. Para tal, 40 incisivos superiores foram instrumentados e divididos em 4 grupos iguais: G1: condensação lateral; G2: compressão hidráulica; G3: sistema Thermafil; G4: onda de condensação. Após a obturação, os dentes foram cortados longitudinalmente e embutidos em resina epóxi. As amostras foram submetidas a uma preparação metalográfica. As seções foram fotografadas através de um estereoscópio (8 X de aumento). 3 observadores calibrados seguiram o seguinte padrão para análise: "score" 0: mais de 3 grandes áreas de vazios; evidência grosseira da presença de cones se destacando da massa obturadora. "Score" 1: de 2 a 3 grandes áreas de vazios; maior uniformidade na massa obturadora. "Score" 2: nenhuma grande área de vazios; boa homogeneidade. Os resultados revelaram 43% "score" 1, 57% "score" 2 no G1; 14% "score" 0, 29% "score" 1 e 57% "score" 2 no G2; e no G3 e no G4 obteve-se 100% de "score" 2. O teste estatístico Kruskal-Wallis demonstrou haver diferenças estatisticamente significantes entre G3/G4 e G1 ($p < 0,05$) e entre G3/G4 e G2 ($p < 0,05$). Houve diferenças estatisticamente significantes entre G2 e G1 ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre G3 e G4 ($p > 0,001$).

Diante dos resultados, pode-se concluir que as técnicas termoplastificadas (G3/G4) exibiram uma qualidade de preenchimento superior ao alcançado nas técnicas frias. A técnica da compressão hidráulica (G2) mostrou um preenchimento superior ao obtido nos dentes obturados pela técnica da condensação lateral (G1).

IC027 Avaliação *in vitro* das alterações promovidas em canais simulados após preparo com limas de NiTi manuais e a motor

MIRANZI, B. A. S.*, COSTA, W. F., MIRANZI, M. A. S., FRÖNER, I. C., VANSAN, L. P., PÉCORA, J. D., ALVES, M. A.

Endodontia - Universidade de Uberaba. E-mail: bmiranzi@mednet.com.br

A instrumentação de canais radiculares curvos, resulta, por vezes, na formação de acidentes e deformações, não obedecendo a forma prévia original. Os instrumentos confeccionados em níquel-titânio são propostos em substituição às limas manufaturadas de aço inoxidável na instrumentação de canais com curvaturas severas. Neste trabalho, comparou-se as alterações promovidas em 40 canais radiculares artificiais curvos de aproximadamente 30 graus de acordo com a metodologia proposta por SCHNEIDER (1971), após preparo com limas de níquel-titânio manuais Onyx-R e acionadas a motor Pow-R, ambas auxiliadas por brocas de Gates-Glidden #1 e #2 na técnica cervico-apical, preparados no comprimento de trabalho até o instrumento #40. Avaliamos as áreas desgastadas na parte curva, as distâncias desgastadas em 3 níveis, 4, 5 e 11 milímetros acima do final apical dos canais simulados e contorno final do canal para ambos os tipos de limas. Os resultados mostraram, pelas medidas das áreas apical e cervical da curvatura, maior tendência à formação de "zip" e "danger zones", significante em 1% e 5% respectivamente, para os preparos manuais, o mesmo acontecendo nos 3 níveis averiguados, onde observamos maior transporte apical e cervical, significante em 1% para os níveis analisados. O contorno final mostrou canais mais centrados e regulares quando executados com limas de níquel-titânio movidas a motor.

Conclui-se que os preparos manuais, denotam maior transporte e tendência a provocar deformações ao preparo, em relação aos preparos automatizados.

IC028 Análise das diferenças morfológicas e morfométricas comparando os sistemas de instrumentação Profile e ProTaper

CANOVA, C. A.*, BROZOWSKI, M. E., SANTOS, M.

Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo. E-mail: alecanova@bol.com.br

Este estudo visa obtermos uma análise comparativa entre estes dois métodos de instrumentação mecânica rotatória objetivando buscar diferenças morfológicas e morfométricas dos preparos mecânicos com a utilização dos instrumentos rotatórios de NiTi sistemas Profile e ProTaper. Foram utilizadas 20 raízes médias de molares inferiores extraídos. Foram utilizados limas rotatórias do sistema Profile e ProTaper (Dentsply) montados em contra-ângulo redutor e motor elétrico com controle de torque (Drillert); sistema de radiografia digital (sistema RVG - Trophy). Estas raízes foram radiografadas e mensuradas através de software que acompanha o sistema RVG e estandarizou-se que a instrumentação dos preparos mecânicos dos condutos mesio-vestibulares e mesio-linguais seriam realizados com o sistema ProTaper e Profile assim respectivamente, seguido o protocolo operatório determinado pelo fabricante. Utilizou-se como substância química auxiliar Endo-PTC neutralizado com NaOCl a 0,5% e EDTA-T para irrigação final. Após preparo químico e mecânico de todos os condutos, foram realizadas radiografias digitais das retificações obtidas e foram analisadas comparativamente as mensurações obtidas com as radiografias iniciais.

De acordo com os resultados pode-se concluir que as diferenças observadas entre morfologia e a morfometria no desgaste retificador da região cervical dos preparos observados nos dois sistemas foi ligeiramente maior quando da utilização do sistema ProTaper em relação ao sistema Profile, enquanto que nos terços médio e apical não apresentaram diferenças significativas.

IC029 Avaliação da infiltração marginal do MTA frente a duas técnicas de aplicação

MASSI, O. M.*, FIDEL, R. A. S., SOTELO, P., FIDEL, S. R., MOREIRA, E. J. L.

Endodontia - Uni La Plata. E-mail: valo@uol.com.br

O presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro*, a capacidade de selamento apical promovido pelo MTA (Angelus), frente a duas técnicas de aplicação em obturações retrógradas. Foram utilizados 20 dentes caninos que se encontravam estocados a longo tempo no laboratório de pesquisa da FO-UERJ e, cujos canais foram obturados pela técnica convencional da condensação lateral e os dentes divididos em dois grupos com dez dentes cada. O passo seguinte consistiu na apicectomia das raízes a 3 mm do ápice e preparo da cavidade com pontas lisas de ultra-som com 3 mm de profundidade, seguindo-se a obturações retrógradas da seguinte maneira: grupo A - aplicação do material na cavidade com condensadores manuais; grupo B - aplicação do material com pontas condensadoras de ultra-som. Os corpos-de-prova foram impermeabilizados, corados com Rodamina, lavados, seccionados longitudinalmente e avaliados numa escala de 0 a 3, através de três avaliadores calibrados, com auxílio de microscópio cirúrgico com aumento de 20 vezes. Os dados foram tratados estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney que não revelou diferença significativa entre os grupos testados.

Assim, foi possível concluir que as duas técnicas de retroburação testadas apresentaram graus de infiltração semelhantes.

IC030 Influência dos veículos aquoso e oleoso na difusão do hidróxido de bário através da dentina: estudo *in vitro*

ALMEIDA, M. S., CHEVITARESE, O., ALMEIDA, P. B. A.*, ALMEIDA, N. S.

Clínica - Universidade Federal Fluminense. E-mail: sanmartin@montreal.com.br

Este trabalho foi realizado para um melhor entendimento da difusão do hidróxido de cálcio através da dentina, quando empregado na terapia endodôntica. O hidróxido de cálcio foi empregado como instrumento substituindo o hidróxido de cálcio, devido à maior radiopacidade do bário comparado ao cálcio e por ambos os íons terem características químicas semelhantes. 20 dentes uniradiculares receberam o saneamento e modelagem. Os dentes foram divididos em dois grupos, de acordo com o veículo a ser associado ao Ba(OH)₂, grupo A (óleo de oliva) e grupo B (soro fisiológico). Os preenchimentos dos condutos foram realizados com espíral lento. Os vedamentos das superfícies cervical e apical foram realizados com resina epoxídica. Os dentes ficaram durante 28 dias (período de observação) imersos em água deionizada e estocados a 37°C. As raízes foram divididas em duas metades no sentido vestibulo-palatino por meio de clivagem, acompanhando o longo eixo do dente. Foram realizadas pela sonda EDX acoplada ao MEV três leituras (no terço médio da raiz): uma junto à superfície externa da radicular, outra central (equidistante do conduto e da superfície radicular externa) e uma terceira, próxima à parede interna do canal radicular. Os dados relativos ao bário foram analisados estatisticamente utilizando-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

O grupo B (soro fisiológico) apresentou maior difusão de hidróxido de bário que o grupo A ($p = 0,02$). O veículo teve influência na difusão do material e ele associado.

IC031 Análise comparativa da presença de dor após tratamento endodôntico em dentes vitais, pela técnica mediata ou imediata

CARVALHO, R. A., BARTH, I., DANIEL, R. L. P. D., FORTES, R. P.*, SOUZA, A. H. F., CHAGAS, O. L. C., RÉGO, I. A. G.

Odontologia - Universidade Potiguar. E-mail: mussolinifortes@uol.com.br

O presente trabalho objetivou avaliar a presença de dor pós-operatória, após tratamento endodôntico, em 55 casos de dentes com polpa vital inflamada. Os casos foram divididos em grupo 1 (G1), onde o tratamento endodôntico foi realizado pela técnica imediata; e grupo 2 (G2), nos quais utilizou-se a técnica mediata. Após a profilaxia, anestesia, isolamento absoluto e preparo químico-mecânico, os canais foram secos, e obturados, no G1, sendo os do G2 saturados com Otosporin[®], os acessos cavitários foram então selados com Cimpact. Decorridos sete dias, os pacientes retornaram à clínica odontológica da Universidade de Potiguar, onde os tratamentos foram executados, para controle pós-operatório, nos quais a sintomatologia apresentada foi classificada em escores.

Na análise dos resultados observou-se ausência de sintomatologia dolorosa em 93% dos casos do grupo 1, e 97% do grupo 2, sendo que os demais casos apresentaram dor apenas nas primeiras quarenta e oito horas pós-operatória.

IC032 Influência dos vários veículos sobre o pH das pastas de hidróxido de cálcio

ZILIO, D. M.*, VIANNA, M. E., FERRAZ, C. C. R., GOMES, B. P. F. A., TEIXEIRA, F. B., SOUZA-FILHO, F. J.

Odontologia Restauradora - Universidade Estadual de Campinas. E-mail: danimz@yahoo.com

Este estudo *in vitro* objetivou mensurar o pH das pastas de Ca(OH)₂ associadas a diversos veículos em função do tempo: a) água destilada, b) glicerina, c) glicerina + parabenosclorofenolcanforado (PMCC), d) PMCC, e) anestésico local (lidocaína com adrenalina), f) água destilada + iodoformio, g) polietilenoglicol (Calen[®]), e h) polietilenoglicol + PMCC (Calen PMCC[®]). O pH das pastas foi mensurado em triplicata nos períodos de 5 min, 1, 24 e 48 h, 7, 14, 28 dias. Os resultados foram avaliados estatisticamente (ANOVA - $p < 0,05$). Aos 5 min, os pHs médios das pastas com água destilada ($12,94 \pm 0,13$) e água destilada + iodoformio ($12,92 \pm 0,13$) foram estatisticamente maiores que as das pastas Calen[®] ($12,29 \pm 0,10$) e Calen PMCC[®] ($12,30 \pm 0,26$). Após 1 h, o pH médio da pasta com água destilada ($13,05 \pm 0,10$) se apresentou maior em relação ao das pastas com PMCC ($11,96 \pm 0,42$). Calen[®] ($11,97 \pm 0,12$) e, Calen PMCC[®] ($11,83 \pm 0,14$), enquanto que em 24 h, a média de pH das pastas de glicerina + PMCC ($12,67 \pm 0,05$) foi maior que Calen PMCC[®] ($11,35 \pm 0,24$). Aos 7 dias, a pasta com glicerina + PMCC apresentou maior média de pH ($11,71 \pm 0,31$) que a com anestésico local ($10,72 \pm 0,64$), água destilada ($10,96 \pm 0,10$) e Calen[®] ($10,32 \pm 0,39$). Aos 14 e 28 dias o Calen[®] ($9,58 \pm 0,46$) e o Calen PMCC[®] ($9,63 \pm 0,27$) apresentaram valores de pH estatisticamente menores que as outras pastas.

Concluímos que as médias de pH das pastas de Ca(OH)₂ associadas a todos os veículos decresceram de acordo com o tempo e, que as pastas Calen[®] e Calen PMCC[®] apresentaram as menores médias de pH. (Apoio: FAPESP - 00/13689-7 e CNPq - 520277/99-6.)

IC033 Reincidência de fraturas em dentes permanentes jovens traumatizados

AFONSO, S. E.*, OLIVEIRA, L. D., TALGE, C., VALERA, M. C., CAMARGO, C. H. R., FONSECA, M. B., SILVA, J. M. F.

Odontologia Restauradora - Universidade Júlio de Mesquita Filho. E-mail: samiraafonso@hotmail.com

A reincidência de traumatismos dentários em situações de incompleta formação radicular, é um problema relevante, visto que comumente um novo trauma pode levar a perda do elemento dental pelo comprometimento da relação corono-radicular. A proposta desse estudo foi avaliar clínica e radiograficamente a reincidência de fraturas coronárias, corono-radulares e exclusivamente radulares, em dentes portadores de rizogênese incompleta. Para tanto foram avaliados 31 dentes, com ápices incompletos, que foram tratados ou estavam em tratamento na clínica do Centro de Traumatismos Dentários da FOSJC - UNESP durante o período de 2 anos. Após a análise estatística descritiva foram verificados que: em seis dentes (19,3%) houve reincidência de fraturas, sendo que duas (33,3%) foram acima da junção cimento-esmalte e quatro (66,6%) abaixo. Destes dentes, três estavam com curativo de demora e três já haviam terminado o tratamento endodôntico.

Estes resultados mostram a importância e a necessidade da utilização de reforços mecânicos intra-radulares durante e após o tratamento de dentes permanentes jovens traumatizados.

IC034 Análise comparativa *in vitro* entre os métodos radiográfico convencional e digital utilizando o localizador apical

LOPES, R. R. YOKOYAMA, C., OYAMA, K. O. N., SANTOS, M.

Dentística - Universidade de São Paulo. E-mail: rogeriolopes@directnet.com.br

Este trabalho tem como objetivo comparar as radiografias convencional e digital (Trophy RVG) após a obtenção do comprimento do canal dos dentes obtidos com o localizador apical eletrônico Endex. Para o experimento, foram selecionados dez raízes mesio-vestibulares de molares superiores e um crânio humano para simular as dificuldades anatômicas em uma tomada radiográfica em pacientes. Após a cirurgia de acesso os dentes foram retirados em soro fisiológico. Os dentes foram fixados em um pote de filme fotográfico e suas raízes ficaram imersas em soro fisiológico para simular a impedância gerada entre a mucosa alveolar e os ligamentos periodontais. Foi utilizada uma lima tipo K #15 para mensurar o comprimento real de trabalho utilizando o Endex. No método eletrónico determinou-se o limite apical como sendo a desembocadura do forame. Após a obtenção deste comprimento real de trabalho, os dentes foram introduzidos em um alvéolo do crânio mantido fixo e foi realizada a tomada radiográfica convencional e digital. Na tomada radiográfica convencional, o tempo de exposição foi de 0,5 s e na radiografia digital foi de 0,1 s. Os resultados mostraram que não houve diferenças estatisticamente significantes para os métodos testados neste estudo ($p > 0,05$).

Através da análise dos resultados pode-se concluir que as imagens geradas pelas radiografias são semelhantes. E a radiografia digital pode ser um forte candidato a substituir a radiografia convencional pois o tempo de exposição à radiação é menor e o tempo de aquisição da imagem radiográfica é mais rápido neste tipo de radiografia.

Pa067 Infiltração marginal em obturações retrógradas realizadas com ProRoot-MTA, MTA-Angelus e Super-EBA

SILVA NETO, U. X.*, BROCHADO, V. H. D., GONÇALVES JÚNIOR, J. F.
Dentística, Endodontia e Materiais Dentários - Universidade de São Paulo.
E-mail: ulix@terra.com.br

A obturação retrógrada é uma das modalidades cirúrgicas empregadas para o selamento endodôntico apical. O objetivo desse trabalho foi avaliar a infiltração marginal permitida pelos materiais retroobturadores. Foram utilizados 34 incisivos centrais superiores humanos extraídos, cujos canais foram preparados biomecanicamente e obturados. Após 48 horas, realizou-se a apicectomia removendo-se 3 mm apicais e a confecção da cavidade retrógrada com aproximadamente 2 mm de profundidade por meio de pontas ultra-sônicas. Em seguida, realizou-se a impermeabilização da superfície externa das raízes. As raízes foram divididas aleatoriamente em três grupos de 10, sendo utilizados como materiais retroobturadores o ProRoot-MTA, o MTA-Angelus e o SUPER-EBA. Quatro dentes foram utilizados como grupo controle (positivo e negativo). Após a obturação, as raízes foram imersas em solução aquosa de Rodamina B a 0,2% por 48 horas, e lavadas em água corrente por 12 horas. Removiu-se a camada de impermeabilização e realizou-se o desgaste longitudinal da face mesial radicular com disco de *carborundum* expondo-se a retro-obturação. A medida da infiltração marginal foi feita pela técnica da planimetria em microscópio óptico. Para o grupo do ProRoot-MTA e MTA-Angelus verificou-se uma média de infiltração de 1,71 mm e 1,65 mm respectivamente. Para o Super-EBA verificou-se uma média de 1,40 mm. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio do teste ANOVA.

Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre os materiais testados ($p < 0,05$).

Pa068 Avaliação da permeabilidade e da morfologia apical após apicectomia, tratamento e retropreparo com lasers Er:YAG e Nd:YAG

OLIVEIRA, R. G.*, BALDOCHI, S. L., GOUW-SOARES, S. C., EDUARDO, C. P.
Odontologia - Universidade Federal de Juiz de Fora. E-mail: igo@artnet.com.br

Um dos maiores problemas das cirurgias para-endodônticas está vinculado à permeabilidade superficial da dentina após a apicectomia e à falta de adaptação marginal adequada entre o material retroobturador e as paredes da cavidade que acabam por permitir a percolação de microrganismos, seus subprodutos e fluidos orgânicos do sistema de canais radiculares à região periapical, comprometendo assim a devida reparação tecidual. Este trabalho tem como proposição avaliar a permeabilidade superficial e marginal da dentina de corte após a apicectomia, tratamento e retropreparo com os lasers de Er:YAG e Nd:YAG e retroobturados com IRM. Além disso, analisar, sob MEV, as alterações morfológicas causadas pela irradiação desses lasers através de fibras ópticas. Um total de vinte e quatro dentes uniradiculares com os canais tratados endodônticamente foram divididos em 3 grupos experimentais: grupo I (laser de Er:YAG); grupo II (Er:YAG e Nd:YAG); e grupo III (controle). A análise da infiltração do corante azul de metileno através da superfície dentinária de corte e da retroobturação demonstrou que as amostras dos grupos que foram irradiadas apresentaram índices de infiltração menores que as do grupo controle. Esse resultado foi compatível com as alterações morfológicas estruturais evidenciadas em MEV.

Nas condições deste estudo, a irradiação associada, ou seja, a apicectomia com o laser de Er:YAG, tratamento da superfície de corte e a confecção da retrocavidade com o laser de Nd:YAG, demonstrou ser uma opção capaz de diminuir a permeabilidade ao corante azul de metileno.

Pa069 Identificação e suscetibilidade antimicrobiana de enterococos isolados de dentes com insucesso do tratamento endodôntico

PINHEIRO, E. T.*, GOMES, B. P. F. A., FERRAZ, C. C. R., TEIXEIRA, F. B., ZAIA, A. A., SOUZA-FILHO, F. J.
Odontologia Restauradora - Universidade Estadual de Campinas.
E-mail: crikcapinheiro@yahoo.com.br

Enterococos não são comumente isolados de canais com polpas necrosadas, entretanto, têm sido associados ao insucesso do tratamento endodôntico. Estudos têm revelado uma crescente resistência antimicrobiana entre espécies de enterococos. O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de *Enterococcus* spp. em 60 dentes tratados endodônticamente associados a lesões periapicais e analisar sua suscetibilidade antimicrobiana. Durante o retratamento endodôntico, após a remoção do material obturador, as amostras dos canais foram coletadas e analisadas microbiologicamente. *Enterococcus* spp. foram testados quanto à suscetibilidade antimicrobiana através do método do "E-test", utilizando benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, eritromicina e azitromicina. A produção de β -lactamase também foi investigada. Microrganismos estavam presentes em 51 dos 60 dentes. *Enterococcus faecalis* foi isolado de 27 dos 51 canais com crescimento bacteriano, presentes em cultura pura em 18 casos. A produção de β -lactamase não foi detectada. Todas as cepas testadas foram sensíveis a benzilpenicilina, amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico. Resistência a eritromicina foi observada em 7,7% dos casos, e a maioria das cepas apresentou suscetibilidade intermediária. Azitromicina não foi eficaz contra *Enterococcus faecalis*, apresentando resistência em 38,5% dos casos.

Concluímos que há uma elevada prevalência de *Enterococcus faecalis* em canais de dentes com insucesso endodôntico, e que cepas apresentaram resistência aos antibióticos eritromicina e azitromicina. (Apoio: FAPESP, CNPq.)

Pa070 Avaliação da biocompatibilidade das soluções de hipoclorito de sódio, clorexidina e uma combinação destas

PASTERNAK, B. J.*, TAVARES, T., PERIN, F. M.
Odontologia - Universidade do Sul de Santa Catarina. E-mail: elismonica@hotmail.com

Neste estudo os autores avaliaram o potencial irritativo das soluções de gluconato de clorexidina a 2%, hipoclorito de sódio a 1% e uma associação destes irrigantes, somente alterando a concentração da clorexidina para 0,2%. Foram inoculados 0,1 ml de cada uma das substâncias testadas e de soro fisiológico no tecido subcutâneo do dorso de vinte ratos da linhagem Wistar, que receberam também, por via endovenosa, o corante Evan's blue. Após três horas os animais foram sacrificados e as áreas onde ocorreram as exsudações plasmáticas recortadas. O complexo corante-proteína foi extraído com auxílio de uma solução de formamida P.A. e mantidos em estufa a 45°C por 72 horas. As soluções resultantes foram filtradas e levadas a um espectrofotômetro digital utilizando-se o comprimento de onda de 620 nm. As médias das medidas da densidade óptica das soluções foram submetidas a uma análise de variância pelo teste de Scheffé. Os valores da densidade óptica permitiram concluir que a combinação de gluconato de clorexidina a 0,2% com hipoclorito de sódio a 1% foi significativamente menos agressiva quando comparada às soluções usadas individualmente.

Pa071 Influência de diferentes tipos de soluções irrigadoras e cimentos obturadores no reparo pós-tratamento endodôntico

SALINA, R. M. P. D.*, SOUZA, V., HOLLAND, R.
Endodontia - Universidade de Marília. E-mail: jnesello@terra.com.br

O objetivo do presente estudo foi o de analisar a influência de diferentes soluções irrigadoras e cimentos obturadores no resultado final do tratamento endodôntico. Quarenta canais radiculares de dentes de cães foram preparados biomecanicamente até a lima K nº 40, seguido da perfuração do "plato" cementário apical e sua ampliação até a lima K nº 25. Durante o preparo, metade dos canais foram irrigados com soro fisiológico e a outra metade com soda clorada. Concluído o preparo biomecânico, 10 canais irrigados com cada solução foram obturados com cones de guta-percha e o cimento AH Plus e o restante com o cimento Vidrion-Endo. Decorridos 90 dias de pós-operatório, os animais foram sacrificados e as peças obtidas preparadas para exame histomorfológico. A análise dos resultados permitiu observar que independentemente do cimento obturador utilizado não houve diferença entre os dois tipos de soluções irrigadoras empregadas ($p > 0,05$) e que o cimento AH Plus proporcionou melhores resultados que o cimento Vidrion-Endo ($p = 0,01$).

A inter-relação solução irrigadora/cimento obturador permitiu ordenar do melhor para o pior resultado a seguinte sequência: soda clorada/AH Plus, soro fisiológico/AH Plus, soro fisiológico/Vidrion-Endo e soda clorada/Vidrion-Endo.

Pa072 Padrão de desgaste de dentina na zona de perigo de raízes mesiais de molares inferiores: preparo manual e rotatório

MANIGLIA, C. A. G.*, PICOLI, F., MANIGLIA, A. B., PARDINI, L. C.
Faculdade de Odontologia de Franca - Universidade de Franca. E-mail: cmaniglia@uol.com.br

Este estudo avaliou o padrão de desgaste de dentina na zona de perigo de raízes mesiais de molares inferiores, após a instrumentação manual e rotatória. Foram utilizados 40 primeiros molares inferiores humanos, submetidos previamente a um exame radiográfico para avaliação de suas curvaturas. Posteriormente, estes foram incluídos em resina acrílica e seccionados na altura do 1/3 médio da raiz (zona de perigo), utilizando para isto, um sistema especialmente desenvolvido para reposicionamento dos cortes, de tal forma que o dente pudesse ser fotografado digitalmente, de forma padronizada, antes e após a realização da instrumentação. Os dentes foram, então, divididos em 2 grupos: Grupo I - instrumentação manual com a técnica escalonada e preparo anti-curvatura; Grupo II - preparo com sistema rotatório Profile, seguindo a técnica proposta pelo fabricante. Em ambos os grupos utilizou-se a solução de hipoclorito de sódio 1%. Foi estabelecido como padrão de desgaste, a diferença da espessura de dentina anterior e posterior ao preparo, tanto internamente, quanto externamente à curvatura radicular dos canais mesio-vestibulares e mesio-linguais. Para as mensurações da espessura de dentina inicial e final, empregou-se o software Adobe Photoshop. A análise estatística dos resultados não evidenciou diferença significativa quanto ao padrão de desgaste, entre as técnicas manual e rotatória.

Ambas as técnicas de instrumentação, manual e rotatória Profile, produziram desgaste estatisticamente semelhante ao nível de zona de perigo de raízes mesiais de molares inferiores. (Apoio: FAPESP.)

Pa073 Suscetibilidade de microrganismos isolados de canais radiculares ao hidróxido de cálcio associado a diversos veículos

VIANNA, M. E.*, GOMES, B. P. F. A., FERRAZ, C. C. R., TEIXEIRA, F. B., ZAIA, A. A., SOUZA-FILHO, F. J.
Odontologia Restauradora - Universidade Estadual de Campinas.
E-mail: morgana@aguianet.com.br

O propósito deste estudo foi verificar a suscetibilidade de microrganismos comumente isolados de canais radiculares utilizando o Ca(OH)_2 em combinação com diversos veículos. Os microrganismos testados foram *C. albicans*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis* and *P. intermedia*. Um ml de cada medicamento foi colocado no interior de poços utilizados para culturas de células, nos quais foram adicionados 2 ml da suspensão microbiana. Após 30 s; 1, 3, 5, 10, 15 e 30 min; 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 e 48 h; 7 dias. Um ml foi transferido para tubos contendo 3 ml de meio de cultura (BHI ou FAB) com solução neutralizadora do Ca(OH)_2 (0,5% ácido cítrico); e destes 1 ml foi transferido para outros tubos com 3 ml de meio de cultura adequado. Solução salina foi utilizada como controle. Os tubos foram incubados a 37°C por 7 dias em condições gasosas adequadas. Aliquotas das suspensões microbianas foram subcultivadas em placas de ágar-sangue. A pureza das colônias foi confirmada pela coloração de Gram, morfologia das colônias e produção de catalase. Os testes foram realizados em triplicata. Os resultados mostraram que *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. gingivalis* (anaeróbios estritos) foram mais suscetíveis a todas as pastas de Ca(OH)_2 testadas. *C. albicans* foi o microrganismo mais resistente seguido por *E. faecalis* e *S. aureus* (anaeróbios facultativos).

Concluímos que todos os microrganismos testados foram suscetíveis às pastas de Ca(OH)_2 , entretanto os microrganismos facultativos foram mais resistentes que os microrganismos anaeróbios estritos. (Apoio: CAPES, FAPESP - 0013685-7 e CNPq - 027799-6.)

Pa074 Influência da implantação iônica na resistência à torção de instrumentos rotatórios de níquel-titânio

COSTA, C.*, ALLONSO-FALEIROS, N., SANTOS,
Dentística - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. E-mail: crise@usp.br

O presente estudo buscou verificar o aumento da resistência à torção de instrumentos rotatórios de níquel-titânio após o tratamento de implantação iônica de nitrogênio. Os autores avaliaram-se de vinte e um instrumentos da marca Quantec series 2000 #40, com 21 mm, que foram divididos em dois grupos. O grupo 1 (G1) constituiu-se de dez instrumentos que foram subdivididos ao ensaio de torção com o auxílio de um trocômetro. O grupo 2 (G2) foi formado de onze instrumentos expostos à câmara de implantação iônica de nitrogênio, que receberam uma dose de nitrogênio de $2,5 \times 10^5$ ions/cm através de um acelerador de íons com energia de 200 Kev por 6 horas, corrente de 10 microA/cm e temperatura de 130°C, sendo que a seguir dez foram submetidos ao teste de torção, como no grupo 1 e um instrumento serviu de controle para a determinação da quantidade de íons de nitrogênio implantados por análise de reação nuclear ressonante induzida por partícula. Os resultados mostraram um incremento na resistência à torção de 56% quando comparou-se instrumentos implantados com não implantados.

Concluiu-se assim que o processo de implantação de íons de nitrogênio aumenta a resistência à torção de instrumentos de níquel-titânio.