

FERNANDA GRAZIELA CORRÊA SIGNORETTI

***Avaliação in vitro da influência da clorexidina
2% gel no pH, liberação de cálcio e ação sobre
endotoxinas do hidróxido de cálcio***

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

Orientador: Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

PIRACICABA

2009

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

Si26a Signoretti, Fernanda Graziela Corrêa.
Avaliação *in vitro* da influência da clorexidina 2% gel no pH, liberação de cálcio e ação sobre endotoxinas do hidróxido de cálcio. / Fernanda Graziela Corrêa Signoretti. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Rogério de Castilho Jacinto, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.

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

1. Endodontia. I. Jacinto, Rogério de Castilho. II. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. VI. Título. (mg/fop)

Título em Inglês: Influence of 2% chlorhexidine gel on pH, calcium release and ability of reducing endotoxin of calcium hydroxide

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Endodontics

Área de Concentração: Endodontia

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Rogério de Castilho Jacinto, Márcia da Silva Schmitz, Caio Cezar Randi Ferraz

Data da Defesa: 19-02-2009

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 19 de Fevereiro de 2009, considerou a candidata FERNANDA GRAZIELA CORRÊA SIGNORETTI aprovada.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "R. Jacinto".

PROF. DR. ROGÉRIO DE CASTILHO JACINTO

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Schmitz".

PROFa. DRa. MARCIA DA SILVA SCHMITZ

A handwritten signature in black ink, appearing to read "C. Ferraz".

PROF. DR. CAIO CEZAR RANDI FERRAZ

Dedico este trabalho...

Aos meus pais Roque e Zélia, pelo amor incondicional, aos quais devo nada menos que minha vida e tudo que sou hoje.

Aos meus irmãos Gustavo e João, meus maiores amores, pela lealdade e força nos melhores e nos piores momentos.

A todos os meus familiares, em especial à memória de minha avó Belentina, maior exemplo de luta e determinação.

Agradeço...

A Deus, antes de tudo, que sempre me ilumina, me protege e me fortalece.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto, pelos ensinamentos imprescindíveis para minha formação acadêmica, pelos conselhos nas horas difíceis, pelos momentos maravilhosos proporcionados pela nossa convivência, pelo apoio contínuo e incondicional mesmo quando estive distante, por ser um exemplo de caráter e profissionalismo, e pela amizade que nos uniu há muito tempo e só se fortalece a cada dia.

A minha co-orientadora, Prof^{ta}. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, por não ter medido esforços para que fosse possível a realização deste trabalho, pela retaguarda dada em todos os momentos que precisei, e por ser um exemplo de dedicação e competência profissional.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, instituição onde me graduei e pela qual tenho imenso carinho, agradeço aos professores, funcionários e amigos.

Ao Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, diretor desta instituição, de quem recebi apoio necessário para realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento: FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro durante meu período de formação.

Ao Prof. Dr. Jacks Jorge Junior, coordenador geral dos cursos de pós-graduação da FOP/UNICAMP.

À Prof^ª. Dr^ª. Renata C. M. R. Garcia, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP.

Às secretárias da Coordenadoria de Pós-Graduação Érica A. Pinho Sinhoreti, Raquel Q.M.C.Sacchi e a estagiária Tatiane C. Gava.

À Prof^ª. Dr^ª. Brenda P. F. A. Gomes, chefe do Departamento de Odontologia Restauradora da FOP/UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, responsável pela área de Endodontia da FOP/UNICAMP.

Aos Professores Doutores Alexandre A. Zaia, Brenda P. F. A. Gomes, Caio Cezar Randi Ferraz, José Flávio Affonso de Almeida, Francisco José de Souza-Filho e Luis Valdrighi, professores da área de Endodontia da FOP/UNICAMP, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos Professores Doutores Alexandre Augusto Zaia, Daniel Saito e Adriana de Jesus Soares, os quais participaram da banca examinadora em meu exame de Qualificação, pela dedicação dispensada.

Ao Prof. Dr. Francisco Krug do Departamento de Química Analítica do CENA/USP.

À Prof^a. Dr^a. Morgana Eli Vianna, amiga queridíssima e verdadeiro anjo da guarda desde os tempos de minha iniciação científica.

Aos meus queridos amigos da área de Endodontia, pela convivência e companheirismo constantes. Cada um de vocês teve um papel muito especial no decorrer dessa caminhada.

À Thaís Accorsi Mendonça, pela amizade imensurável e por servir de exemplo em todos os aspectos da minha vida.

À Fernanda Barrichello Tosello e Francisco Montagner, pelo carinho sem igual, pela lealdade inquestionável e pela segurança transmitida. Eu não teria conseguido de forma alguma sem vocês, por isso o mérito no dia de hoje é NOSSO.

Aos queridos membros da Liga, John V. Veasey, Débora C. Almeida e Cássio A. S. Siqueira Junior, por me ensinarem o verdadeiro significado de irmandade e por provarem que “para sempre” existe.

Às estimadas amigas de graduação Cecília, Fernanda, Luciana e Melina, pela amizade mais pura e verdadeira que se mantém intacta através dos anos.

À Juju, Samantha e Luale, por nunca terem saído do meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis. Minha eterna e mais sincera gratidão.

Aos meus grandes amigos Jéssica, Flávia, Stanley, Fada e Jorge, por todo o cuidado que já tiveram comigo.

Aos alunos de iniciação científica e estagiários da área de Endodontia da FOP/UNICAMP.

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

RESUMO

O presente estudo avaliou a influência da clorexidina 2% gel (CLX) sobre as propriedades químicas como pH e liberação de íons cálcio do hidróxido de cálcio, e sobre a capacidade de redução de endotoxinas desta medicação intracanal. A liberação do cálcio do Ca(OH)_2 + soro ou associado a CLX foi verificada pela espectrofotometria por absorção atômica e o pH através do emprego de um peagâmetro. As mensurações foram realizadas nos períodos experimentais de 24 horas, 7, 15 e 30 dias. Para a quantificação de endotoxinas foram utilizados dentes humanos, previamente preparados, contaminados, preenchidos com as medicações. Os medicamentos foram inseridos dentro dos canais de 30 dentes (GI Ca(OH)_2 + soro, GII Ca(OH)_2 + CLX, GIII CLX), e após permanecerem por 14 dias foram removidos com irrigação abundante. Este lavado foi submetido à quantificação da endotoxina remanescente através do teste cromogênico quantitativo QLC-1000. Análise estatística foi realizada com os testes ANOVA e Tuckey ($p < 0.05$). Os grupos do Ca(OH)_2 associado ou não à CLX não diferiram significativamente no período de 24 horas, 7 e 30 dias em relação à liberação de cálcio. Entretanto no período de 15 dias o Ca(OH)_2 + soro fisiológico liberou menos cálcio do que quando estava associado à clorexidina 2% gel. Nestes mesmos grupos ocorreu aumento significativo de 24 horas para 7 dias. Entretanto no período de 15 dias houve uma queda do Ca(OH)_2 + soro. Com relação ao pH, os grupos do Ca(OH)_2 associado ou não à CLX não apresentaram diferença significativa estatisticamente entre si nos intervalos testados, mantendo um pH alcalino ($p > 0.05$). Os maiores valores de pH foram observados após 30 dias para o Ca(OH)_2 + soro. Os valores mais baixos de pH foram apresentados pela clorexidina 2% gel quando testada sozinha, em todos os períodos. Um aumento significativo no pH foi observado no intervalo de 24 horas e 7 dias, tanto para o Ca(OH)_2 + soro quanto para Ca(OH)_2 + CLX. A maior redução de endotoxinas foi observada no grupo da clorexidina 2% gel (91,63%), seguida de sua associação com o Ca(OH)_2 (88,76%) e depois o Ca(OH)_2 + soro fisiológico (82,13%). Não houve diferença estatística entre a clorexidina 2% gel e sua associação com o hidróxido de cálcio, quanto à redução da quantidade de endotoxinas dentro do canal radicular. Concluiu-se que a clorexidina 2% gel não interferiu no pH e liberação de íons cálcio do hidróxido de cálcio quando em associação com este. Além disso, melhorou a capacidade do hidróxido de cálcio em reduzir o conteúdo de endotoxinas dos canais radiculares *in vitro*.

Palavras-chave: endodontia, Lisado de Amebócito de *Limulus*, QCL-1000, LPS.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the influence of 2% chlorhexidine gel (CHX) on chemical properties of calcium hydroxide and on its ability of reducing endotoxin content of root canals when used as intracanal medicament. The amount of calcium released from the pastes was assessed by atomic absorbance spectrophotometry and the pH was verified in pHmeter. The tested periods were 24 hours and 7, 15 and 30 days. For the endotoxin quantification assay, single rooted teeth were previously inoculated with endotoxins and then with intracanal medication. The medicaments were placed inside the root canal of 30 teeth, (GI - Ca(OH)₂ + 0.9% saline solution, GII - Ca(OH)₂ + CHX and GIII – CHX), and were removed after 14 days, with copiously irrigation. The removed solution was submitted to the chromogenic quantitative endotoxin test QCL-1000. Statistical analysis was performed with ANOVA and Tuckey Test (p<0.05). For calcium release analysis there was no statistical difference among the groups with Ca(OH)₂ associated or not with CHX in the periods of 24 hours, 7 days and 30 days. However, after 15 days, lower values were observed for Ca(OH)₂+ saline solution. In the groups that contained calcium hydroxide associated or not with CHX, an increase in ion release was observed from 24h to 7 days. However there was a decrease in the period of 15 days for the Ca(OH)₂+ saline solution. An alkaline pH was observed in all groups that contained calcium hydroxide (p>0.05). The highest pH values were observed after 30 days for the association between Ca(OH)₂ + saline solution. The lowest values of pH were observed for 2% chlorhexidine gel, in all periods. A higher increase of pH was stated between 24 h and 7 days for Ca(OH)₂+ saline solution and Ca(OH)₂+ CHX, and remained unaltered until the end of the experiment for both pastes. A higher reduction in the endotoxin content was observed in the CHX group (91.63%), followed by Ca(OH)₂+ CHX (88,76%) and Ca(OH)₂ + saline solution (82.13%). There were no statistical difference between 2% chlorhexidine gel and its association with calcium hydroxide over the endotoxin content reduction inside the root canal. According to the results, it can be concluded that 2% chlorhexidine gel did not interfere in the chemical properties of calcium hydroxide. Moreover, chlorhexidine was also able to improve calcium hydroxide properties for reducing the endotoxin content of root canals *in vitro*.

Key words: endodontics, Lymulus Amebocyte Lysate, QCL-1000, LPS.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	Pág 1
2	REVISÃO DA LITERATURA	Pág 3
3	PROPOSIÇÃO	Pág 36
4	MATERIAL E MÉTODOS	Pág 37
5	RESULTADOS	Pág 48
6	DISCUSSÃO	Pág 54
7	CONCLUSÃO	Pág 60
8	REFERÊNCIAS	Pág 61
9	ANEXO	Pág 77
	Certificado do Comitê de Ética	

1. INTRODUÇÃO

Pesquisas clínicas e laboratoriais têm correlacionado a importância do estudo das bactérias anaeróbias, principalmente as Gram-negativas, nas infecções radiculares e o papel dos componentes celulares como as endotoxinas e outros componentes da parede celular contribuindo para os processos inflamatórios e a sintomatologia dolorosa (Farber & Seltzer, 1988; Horiba *et al.*, 1991; Safavi & Nichols, 1993; Jacinto *et al.*, 2005).

Endotoxinas (Lipopolissacarídeos da parede celular de bactérias Gram-negativas) presentes em canais radiculares infectados induzem resposta periapical inflamatória e contribuem para o aumento de substâncias vasoativas e neurotransmissores nas terminações nervosas nas áreas de lesão; potencializando a sensação de dor (Seltzer & Farber, 1994). Tais moléculas são liberadas durante a multiplicação ou morte bacteriana.

A inoculação de endotoxina nos canais radiculares de diversos animais em laboratório (macacos, cães, gatos) induziu reação inflamatória e reabsorção óssea na região periapical em todos os casos (Nelson-Filho *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002; Dwyer & Torabinejad, 1980; Pitts *et al.*, 1982), demonstrando seu importante papel na patogênese das lesões periapicais.

Um importante objetivo do tratamento endodôntico é a eliminação das bactérias do sistema de canais radiculares por meios mecânicos e químicos e uma ampla variedade de agentes antimicrobianos tem sido usada para esse propósito (Safavi & Nichols, 1993). Entretanto, é possível que mesmo que as bactérias sejam removidas do canal radicular, endotoxinas capazes de manter ou induzir periapicopatias possam permanecer (Barthel *et al.*, 1997, Vianna *et al.*, 2007), interferindo no sucesso do tratamento endodôntico. Dessa forma, o tratamento do canal radicular infectado não deve se restringir apenas à morte bacteriana, mas também visar a inativação da endotoxina (Nelson-Filho *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002), o que ocorre através do preparo químico-mecânico coadjuvada pelo uso de medicação intracanal.

A escolha da medicação recai sobre as pastas à base de hidróxido de cálcio porque elas apresentam atividade biológica no combate à infecção do sistema de canais radiculares (Holland *et al.*, 1999; Leonardo *et al.*, 2000; Tanomaru Filho, 2002). As propriedades físico-químicas de pH, liberação de íons cálcio e solubilidade, das pastas de hidróxido de cálcio,

têm sido motivo de inúmeros estudos pelos pesquisadores, em função da importância que tais propriedades têm para o mecanismo de ação desse medicamento (Rabelo, 2003; Basrani *et al.*, 2004). Essa dissociação iônica é responsável pelas propriedades biológicas que o hidróxido de cálcio apresenta, tais como sua ação antimicrobiana (Leonardo *et al.*, 2000; Nelson Filho, 2000) e indutora de reparo por tecido mineralizado (Holland *et al.*, 1999; Tanomaru Filho, 2002). Apesar de ser a medicação mais comumente utilizada, não é eficaz contra todos os microrganismos (Gomes *et al.*, 2002), como *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. Inclusive há um questionamento a respeito da sua eficácia em reduzir o número de bactérias mesmo após longos períodos entre sessões (Peters *et al.*, 2002). Dessa forma, outras substâncias têm sido associadas ao hidróxido de cálcio visando um melhor resultado.

A clorexidina é um agente antimicrobiano de amplo espectro, preconizada na terapia endodôntica no preparo químico do canal radicular (Ferraz *et al.*, 2001) e como medicação intracanal, apresentando-se mais efetiva que o hidróxido de cálcio contra *Enterococcus faecalis* (Gomes *et al.*, 2003). Pode apresentar ainda um efeito residual após um período prolongado de contato com a dentina do canal radicular (Basrani *et al.*, 2002). O objetivo quando se associa a clorexidina ao hidróxido de cálcio seria aumentar sua atividade antimicrobiana, tornando-o eficaz inclusive contra microrganismos resistentes, porém sem perder suas propriedades desejáveis.

Muitos estudos têm avaliado a capacidade antimicrobiana destas medicações, no entanto, pouco se sabe a respeito da influência da clorexidina sobre o hidróxido de cálcio, quanto às suas propriedades químicas e capacidade de inativar as endotoxinas presentes nos canais radiculares de dentes infectados. Diante disto, é objetivo deste estudo analisar a ação do hidróxido de cálcio, da clorexidina 2% gel e da associação de ambos quanto as suas propriedades químicas e sua possível ação sobre o LPS bacteriano.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. MEDICAÇÃO INTRACANAL

A principal meta da terapia endodôntica é a desinfecção do sistema de canais radiculares e a manutenção da mesma através de um selamento adequado tanto intracanal, quanto coronário. Usualmente tal objetivo é atingido através do preparo químico-mecânico, que elimina ou reduz os microrganismos responsáveis pela patogênese das infecções pulpares e periapicais (Byström & Sundqvist, 1981; 1983; Siqueira *et al.*, 1997; Ferraz *et al.*, 2001).

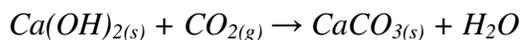
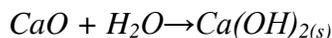
Portanto, o uso de uma substância no interior do canal entre as sessões de atendimento, já extensivamente recomendada há muitos anos na endodontia de forma rotineira não substitui em nenhum momento a etapa da instrumentação, tendo seu emprego sugerido em situações mais específicas, como nos casos de dor de origem periapical, exsudação persistente e barreira físico-química contra a reinfecção do sistema de canais entre sessões de atendimento.

Para que cada uma das indicações seja viável, a substância de escolha deve apresentar propriedades físicas, químicas e biológicas desejáveis, que quando reunidas proporcionem resultados benéficos. Na busca por uma medicação que reúna o maior número de vantagens, o hidróxido de cálcio têm sido extensivamente estudado tanto associado a veículos inertes, como a substâncias ativas.

2.1.1. HIDRÓXIDO DE CÁLCIO

Introduzido por Hermann (1920), o hidróxido de cálcio consiste em um pó branco com a fórmula $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e peso molecular 74,08. Apresenta baixa solubilidade em água (cerca de 1,2 g/l a 25°C), alto pH (cerca de 12,8) e é insolúvel em álcool (Farhad & Mohammadi, 2005). É considerado uma base forte, obtida a partir da calcinação (aquecimento) do carbonato de cálcio, até sua transformação em óxido de cálcio (cal viva). Com a hidratação do óxido de cálcio chega-se ao hidróxido de cálcio e a reação entre este e o

gás carbônico leva à formação de carbonato de cálcio, representadas nas seguintes reações (Estrela, 1997):



s=sólido e g=gás

Suas propriedades derivam da dissociação em íons cálcio e hidroxila, os quais exercem ação sobre bactérias e sobre os tecidos. Seu efeito antibacteriano estaria ligado à inativação de enzimas bacterianas e seu efeito mineralizador, a ativação enzimática tecidual (Estrela *et al.*, 1994).

Os microrganismos em geral, necessitam de condições físico-químicas favoráveis ao seu crescimento, dentre as quais: temperatura, pH, pressão osmótica, concentrações de dióxido de carbono e de oxigênio (Nolte, 1982). Em pH extremo por longo período, a inativação enzimática das bactérias pode ser irreversível, porém, quando esta condição não for mantida por muito tempo, pode haver uma reversibilidade na atividade enzimática no nível da membrana citoplasmática bacteriana (Amabis, 1976)

A membrana citoplasmática das bactérias possui importantes funções para a sobrevivência da célula (Brooks *et al.*, 1998). Segundo Cotran *et al.* (1999) os íons hidroxila induzem a peroxidação de lipídios, resultando na destruição de fosfolipídios, que são componentes estruturais da membrana celular. Eles agem removendo átomos de hidrogênio de ácidos graxos insaturados, gerando um radical lipídico livre. Este por sua vez reage com o oxigênio, resultando na formação de um radical peróxido lipídico, que remove outro hidrogênio de um segundo ácido graxo, iniciando uma reação em cadeia que causa danos extensos a membrana.

O metabolismo celular é altamente dependente das atividades enzimáticas, que por sua vez atuam em um pH ótimo, que gira em torno do neutro. A alcalinização do meio proporcionada pelo hidróxido de cálcio induz a quebra de ligações iônicas que mantêm a estrutura das proteínas. Como consequência, as enzimas perdem sua atividade biológica e ocorre a disfunção do metabolismo celular (Voet & Voet, 1995).

O hidróxido de cálcio em contato direto com tecido conjuntivo inicia uma zona de necrose, alterando o estado físico-químico da substância intercelular, o qual através da ruptura de glicoproteínas, determinando a desnaturação protéica. A formação de tecido mineralizado após o contato do hidróxido de cálcio com tecido conjuntivo tem sido observada num período de sete a dez dias (Holland, 1971).

Seus efeitos letais nos microrganismos foram observados quando houve contato direto com a substância. Em tal condição, a concentração de íons hidroxila é extremamente alta, incompatível com a sobrevivência bacteriana. Clinicamente, nem sempre isso é possível (Siqueira & Lopes, 1999). Se o hidróxido de cálcio precisa difundir-se pelos tecidos e a concentração de hidroxilas decresce como resultado da ação de sistemas tampões (bicarbonato e fosfato), ácidos, proteínas e dióxido de carbono, sua efetividade antibacteriana pode ser reduzida ou mesmo impedida (Siqueira *et al* , 1998).

Outra propriedade importante do hidróxido de cálcio é sua capacidade de neutralização de produtos ácidos, que teria efeito controlador na atividade osteoclástica em reabsorções radiculares externas (Estrela *et al.* 1994).

Spångberg (1969) utilizou mandíbulas de porco para demonstrar que implantes de hidróxido de cálcio foram substituídos por osso após um período de observação de 12 semanas.

Heithersay (1975) relatou casos clínicos com o uso de medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio e discutiu possíveis modos de ação em diferentes situações: no controle de exsudação apical, preenchimento temporário no caso de dentes com lesões periapicais extensas, curativo de demora na terapia endodôntica de rotina e quando há falta de tempo para o encerramento do tratamento, controle de reabsorção apical resultado de patologia apical crônica, reabsorção inflamatória extensa devido a trauma, controle de reabsorção interna na região apical, controle de defeitos reabsortivos internos ou externos, perfurações iatrogênicas, tratamento de fraturas radiculares e no processo de apicificação; concluindo que apesar do mecanismo de ação não estar elucidado, seu uso apresentou resultados clínicos favoráveis, principalmente no que diz respeito à formação de tecido duro.

Diferentes estudos têm sido feitos na tentativa de definir qual seria o veículo ideal, que somasse algum benefício, porém sem interferir nas propriedades do hidróxido de cálcio.

Tronstad *et al.* (1981) avaliaram cortes histológicos de dentes de macacos um mês após a colocação da medicação intracanal com hidróxido de cálcio e, utilizando soluções indicadoras, observaram que havia um gradiente de pH com altos valores próximos ao canal (maior que 12,2), que decresciam em direção a dentina periférica (de 7,4 a 9,6). Os íons hidroxila migrariam para a superfície radicular externa e ativariam a fosfatase alcalina a partir de seu elevado pH, o que poderia iniciar ou favorecer a mineralização.

Leonardo *et al.* (1993) avaliaram, *in vitro*, a solubilidade, pH e liberação de cálcio de pastas de hidróxido de cálcio associadas ao PMCC e PMC. Os resultados obtidos nesse experimento indicaram que a solubilidade da pasta Calen associada ao PMCC não sofreu influência da ausência da cânfora. O pH das pastas analisadas foi semelhante, não mostrando relação com o PMC. A liberação de íons cálcio foi mais lenta nas pastas associadas ao PMC.

Nerwich *et al.* (1993) avaliaram mudanças de pH por quatro semanas após colocação de curativo de hidróxido de cálcio em dentes humanos extraídos. Os resultados demonstraram que os íons hidroxila difundem-se em horas pela dentina mais próxima a luz do canal, mas requer de 1 a 7 dias para alcançar a dentina mais externa, próxima ao cimento. Os picos de pH foram atingidos entre 2 e 3 semanas e a difusão foi maior cervicalmente do que apicalmente. A capacidade tampão da dentina é um fator que afeta a difusão de íons hidroxila através dos túbulos dentinários, segundo os autores.

Estrela *et al.* (1995a) analisaram a velocidade de difusão dos íons hidroxila de pastas de hidróxido de cálcio preparadas com diferentes veículos: solução salina, solução anestésica e polietilenoglicol 400. Observaram que as variações no pH da superfície radicular externa ocorreram após 30 dias para os grupos com solução salina e anestésico, indo de pH 6-7 para pH 7-8; enquanto que a mesma variação para o grupo de polietilenoglicol ocorreu após 45 dias. O pH dentro do canal radicular permaneceu constante em torno de 12 durante o período de 60 dias. Não houve diferença nas medidas com a presença ou ausência de cimento.

Em outro estudo, visando analisar e discutir o mecanismo de ação dos íons cálcio e hidroxila em bactérias anaeróbicas, Estrela *et al.* (1995b) atribuíram o efeito sobre as bactérias ao alto pH do hidróxido de cálcio.

Wakabayashi *et al.* (1995) avaliaram por microscopia eletrônica de varredura a capacidade do hidróxido de cálcio associado a solução salina em dissolver a camada

odontoblástica e pré-dentina após a remoção do tecido pulpar. No grupo em que a medicação permaneceu por uma semana houve pouca dissolução da camada odontoblástica, sem afetar a pré-dentina ou os processos odontoblásticos. No grupo em que o hidróxido de cálcio permaneceu por 30 dias com trocas semanais houve uma maior efetividade deste medicamento, inclusive com erosão da camada de pré-dentina. Porém, não foi capaz de dissolver fibras de colágeno o que ocorre com o uso do hipoclorito de sódio.

Simon *et al.* (1995) determinaram quantitativamente a difusão de íons hidroxila e cálcio pela dentina radicular e cemento do hidróxido de cálcio misturado a quatro diferentes veículos: solução salina, água destilada, propilenoglicol e para-monoclorofenol canforado (PMCC). Foram utilizados dentes humanos extraídos, instrumentados e selados coronariamente e apicalmente após a inserção das respectivas medicações, foram colocados em frascos individuais com solução salina, do qual foi mensurado o pH e a liberação de íons cálcio em diferentes períodos. Os resultados indicaram diferentes graus de liberação iônica de acordo com o veículo. Os íons cálcio atingiram valores aproximadamente de 60 ppm em 30 dias para todos os grupos, exceto aquele contendo PMCC. Os autores concluíram que o propilenoglicol poderia ser utilizado rotineiramente por possuir qualidades desejáveis, frente aos demais veículos testados.

Em situações clínicas, o hidróxido de cálcio colocado no canal radicular é progressivamente diluído pelo exsudato produzido pelos tecidos periapicais, e assim, a sua concentração diminui com o tempo. Isso leva a supor que exista outro mecanismo de ação envolvido na sua atividade antibacteriana. Por ser uma base, pode reagir com gases, dióxido de carbono, por exemplo, produzindo carbonato de cálcio e água. A ocorrência disto dentro do canal radicular pode ser mecanismo indireto da atividade antibacteriana, uma vez que microrganismos anaeróbios presentes na polpa necrosada requerem tal gás para sua sobrevivência (Panopoulos & Kontakiotis, 1990)

Em 1996, Estrela & Pesce avaliaram três veículos misturados ao hidróxido de cálcio através de implantes de tubos de polietileno implantados em tecido subcutâneo de cães, avaliando a liberação de íons cálcio e hidroxila por períodos de 7, 30, 45 e 60 dias. Quando utilizada solução salina ou solução anestésica, houve uma alteração de pH 6-7 para pH 7-8 após 30 dias, permanecendo dessa forma por mais 30 dias. No grupo com polietilenoglicol

400, a mesma variação ocorreu após 45 dias e permaneceu inalterada por outros 15 dias, demonstrando que o veículo associado ao hidróxido de cálcio influencia a velocidade de sua dissociação iônica e, conseqüentemente, sua ação antimicrobiana e mineralizadora.

Fuss *et al.* (1996) avaliaram *in vitro* as mudanças de pH das pastas Calxyl, Hydrocalcium e hidróxido de cálcio misturado a água destilada, p-monoclorofenol canforado, solução anestésica ou Solvidont, após exposição por 30 dias ao ar atmosférico ou ao dióxido de carbono. Não houve diferença significativa no pH das seis pastas. Quando expostas ao ar atmosférico não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na mensuração do pH, diferente de quando expostas ao dióxido de carbono, onde houve uma maior redução significativa, mesmo o pH mantendo uma média de 12,54.

Na revisão de literatura realizada por Siqueira & Lopes (1999), os autores salientaram que as propriedades físico-químicas do hidróxido de cálcio podem limitar sua efetividade na desinfecção do sistema de canais radiculares. Além disso, não é uma medicação eficaz contra todas as espécies bacterianas encontradas nas infecções radiculares, justificando sua associação à outra substância objetivando aumentar a atividade antimicrobiana.

Deveaux *et al.* (2000) ressaltaram a importância do preenchimento total do canal radicular pela medicação intracanal, tanto por se portar como barreira física, quanto pela atividade antimicrobiana por contato direto. O uso de um método eficaz para colocação do hidróxido de cálcio foi testado pelos autores, que obtiveram melhores resultados com o uso da espiral de Lentulo e do carreador Pastinject.

Haapasalo *et al.* (2000) analisou a influência da dentina sobre algumas substâncias utilizadas na endodontia. Uma suspensão preparada com dentina transformada em pó foi dividida em alíquotas e incubada com cada uma das substâncias: solução saturada de hidróxido de cálcio, hipoclorito de sódio 1%, acetato de clorexidina 0,5% e 0,05%; e iodeto de potássio iodado 2/4% e 0,2/0,4%; e *Enterococcus faecalis*. De acordo com os resultados, os autores concluíram que a capacidade tampão do tecido dentinário exerceu efeito inibitório sobre os medicamentos.

Safavi & Nakayama (2000) avaliaram a dissociação do hidróxido de cálcio através da medição da condutividade elétrica de soluções de hidróxido de cálcio misturadas a veículos não aquosos (glicerina e propilenoglicol) visto que a capacidade de uma solução em

transmitir uma corrente elétrica é proporcional a concentração de substâncias ionizadas presentes. Os resultados sugeriram que o hidróxido de cálcio associado a tais veículos reduzem sua condutividade, podendo interferir na efetividade da medicação intracanal.

Com o objetivo de determinar a concentração de cálcio e as medidas de pH na região periapical após a colocação de quatro diferentes preparações de hidróxido de cálcio num modelo *in vitro*, Hosoya *et al.* (2001) encontraram resultados semelhantes entre os três grupos misturados com água destilada em diferentes proporções pó/líquido, que apresentaram picos de concentração de cálcio após 3 dias, seguido de uma queda até o vigésimo primeiro dia, quando iniciou novamente um aumento da concentração; enquanto que o grupo que consistia de pó apenas apresentou o pico após 7 dias, com subsequente queda até o trigésimo quinto dia, quando apresentou um pequeno aumento. Quanto ao pH os grupos se apresentaram de maneira semelhante a liberação de cálcio, com melhores resultados para as misturas. Os picos destas ocorreram após 14 dias (pH 11,24), com queda até o vigésimo primeiro dia, estabilização até o trigésimo quinto dia e queda abrupta após esse período. O pico do pH alcançado pelo grupo do hidróxido de cálcio (pó) ocorreu apenas no quadragésimo nono dia, com o valor de pH 9,21.

Embora a alcalinização realmente ocorra, estes níveis de pH podem ser insuficientes para eliminar alguns microrganismos.

Gomes *et al.* (2002) investigaram a suscetibilidade de alguns microrganismos frequentemente isolados de canais radiculares ao hidróxido de cálcio associado a diferentes veículos pelo método de difusão em ágar. A espécie que apresentou os menores halos de inibição, ou seja, maior resistência aos medicamentos testados foi o *Enterococcus faecalis*.

Maniglia *et al.* (2003) analisaram as concentrações de íons cálcio e pH em meio aquoso proporcionado por quatro diferentes substâncias propostas como medicação intracanal. Para tal, foram utilizados 100 dentes incisivos inferiores humanos, formando 04 grupos experimentais: hidróxido de cálcio p.a. e água destilada; hidróxido de cálcio adicionado ao Aderogil; hidróxido de cálcio adicionado ao Adeforte e a pasta base do cimento Life. A concentração de íons cálcio foi avaliada no instante inicial, e 1, 2, 7, 14, 17 e 33 dias após a colocação dos espécimes em meio aquoso. Os resultados deste trabalho indicaram que o hidróxido de cálcio associado à água destilada e à pasta base do cimento

Life apresentaram, respectivamente, os maiores valores de dissociação iônica dentre as medicações testadas.

Camões *et al.* (2003) questionando se os diversos veículos já associados ao hidróxido de cálcio permitiriam se os íons cálcio e hidroxila resultantes de tais misturas se difundiriam pela dentina, delinearum um estudo com dentes humanos extraídos. As associações foram inseridas dentro dos canais radiculares já instrumentados e selados apicalmente, e estes foram posteriormente colocados em frascos individuais contendo água ultrapura deionizada. As medidas foram realizadas em duas etapas; a primeira sem selamento coronário e com os canais vazios para avaliar a eventual dissolução de cálcio do tecido dentinário; e a segunda com as medicações inseridas e selamento coronário com o objetivo de avaliar a difusão pela dentina. Os grupos contendo glicerina e polietilenoglicol na composição da pasta tiveram uma tendência acidificar o meio no intervalo de 14 dias após o preenchimento dos canais e, ao final do experimento (70 dias após a inserção da medicação), o pH ficou levemente alcalino.

Visando determinar as prováveis alterações na composição química da dentina após a aplicação do hidróxido de cálcio, Pacios *et al.* (2003) avaliaram quantitativamente o liberação *in vitro* de proteínas, hidroxiprolinas e fósforo de fragmentos de dentina imersos em soluções de hidróxido de cálcio misturado a diferentes veículos: digluconato de clorexidina 0,07%, propilenoglicol, solução anestésica, PMCC e PMCC + propilenoglicol. Os valores de pH pouco variaram durante o experimento para todos os grupos, enquanto que as proteínas aumentaram significativamente nos grupos em que foram utilizadas clorexidina, solução anestésica e propilenoglicol. Houve aumento no nível de hidroxiprolina quando utilizados PMCC + propilenoglicol, PMCC e propilenoglicol. Os níveis de fósforo foram aumentados quando os veículos foram propilenoglicol e clorexidina.

Ferreira *et al.* (2004) utilizando tubos cilíndricos de polietileno preenchidos por quatro diferentes medicações a base de hidróxido de cálcio (Calen com PMCC, hidróxido de cálcio com solução salina, pasta LC – hidróxido de cálcio com óleo de oliva e cones de gutapercha contendo hidróxido de cálcio), analisaram a liberação de íons cálcio através de um método colorimétrico e o pH. Os tubos foram colocados em frascos plásticos individuais contendo 20 ml de água deionizada, da onde eram extraídas as alíquotas medidas em

diferentes tempos por quatro semanas. A pasta Calen com PMCC e o hidróxido de cálcio com solução salina exibiram os maiores valores de liberação de cálcio e níveis de pH.

Camargo *et al.* (2006) compararam o pH de pastas de hidróxido de cálcio com diferentes veículos em dentes humanos e bovinos. A pasta Calen PMCC foi estatisticamente mais efetiva quanto ao aumento no pH e liberação de íons cálcio. O período de 14 dias mostrou maior liberação de íons cálcio do que após sete dias.

Yücel *et al.* (2007) determinaram os valores de pH do hidróxido de cálcio misturado a solução salina, glicerina, xylocaína spray, Citanest Octapressin, solução de clorexidina 0,2% e Ultracaína DS. Foram preparadas soluções saturadas com cada um dos veículos citados. As mensurações foram realizadas pelo período de sete dias. Os resultados obtidos demonstraram que todas as associações tornaram-se altamente alcalinas, porém o aumento mais significativo ocorreu entre 24 horas e sete dias.

Zmener *et al.* (2007) avaliaram hidróxido de cálcio associado a água destilada e as pastas Calasept e Ultracal XS, utilizando um modelo experimental com tubos de vidro preenchidos pelas respectivas pastas e colocados em frascos individuais para que fosse procedida a mensuração do pH nos seguintes períodos: 1 e 24 horas, 15 e 30 dias. Ao final do período de observação, a alcalinização promovida pelas pastas Calasept e Ultracal XS foi significativamente maior que a pasta de hidróxido de cálcio e água destilada.

Souza-Filho *et al.* (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana e o pH das seguintes substâncias: gluconato de clorexidina 2% gel (CHX), hidróxido de cálcio $[Ca(OH)_2]$ e sua combinação com iodofórmio e óxido de zinco. Para parte microbiológica do experimento foi utilizado o método de difusão em Agar e foram testados os seguintes microrganismos: *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Os níveis de pH foram determinados imediatamente após o preparo, após 24 horas e uma semana, sendo que todos os grupos a medida permaneceu acima de 12, com exceção do grupo da CHX (pH=7.0). Todos os medicamentos testados apresentaram atividade antimicrobiana, porém a mais eficaz contra os microrganismos testados foi CHX, seguida de sua associação ao $Ca(OH)_2$ e iodofórmio. Os resultados indicaram que a associação do hidróxido de cálcio e da clorexidina 2% gel, com ou sem iodofórmio ou óxido de zinco, quando utilizada como medicação intracanal promove

ação antimicrobiana e é capaz de manter um pH ideal. Tal associação misturada a agentes radiopacificadores como iodofórmio e óxido de zinco permitiria uma melhor visualização do preenchimento do canal radicular, sendo importante na indução da apicificação.

2.1.2. CLOREXIDINA

Clorexidina têm sido usada para desinfetar canais radiculares (Delany *et al.*, 1982; Ohara *et al.*, 1993), e como medicação intracanal com bons resultados (Siqueira & Uzeda, 1997), apresentando relativa ausência de citotoxicidade (Jeansonne & White, 1994), grande substantividade (Barbosa *et al.*, 1997; White *et al.*, 1997; Almyroudi *et al.*, 2002), que prolonga sua já conhecida atividade antimicrobiana (Delany *et al.*, 1982; Cervone *et al.*, 1990; Ohara *et al.*, 1993; Waltimo *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2003a).

Quando usada em altas concentrações sua ação antimicrobiana se dá pela ligação de moléculas catiônicas às paredes celulares das bactérias que são carregadas negativamente, ocorre o rompimento da parede celular interferindo no mecanismo de transporte e favorecendo a coagulação do citoplasma pela alta afinidade às proteínas. Em baixas concentrações, substâncias de baixo peso molecular escapam pela membrana citoplasmática, causando efeito bacteriostático (Greeinstein *et al.*, 1986; Kontakiotis *et al.*, 1995; Lindskog *et al.*, 1998). Possui também atividade antibacteriana residual na superfície da dentina após uma semana de exposição à clorexidina (Heling *et al.*, 1992ab; White *et al.*, 1997; Komorowski *et al.*, 2000; Lenet *et al.*, 2000; Basrani *et al.*, 2002).

Como medicação intracanal, é mais efetiva que o Ca(OH)₂ na eliminação de *Enterococcus faecalis* (Gomes *et al.*, 2003a), e contra espécies de *Candida* (Waltimo *et al.*, 1997).

Clorexidina possui pH de 5 a 8, sendo a faixa entre 5 e 7 a de maior eficácia antibacteriana (Zerella *et al.*, 2005). Pode ser usada na forma líquida ou em gel. Sua formulação em gel possui importantes propriedades como a baixa toxicidade aos tecidos periapicais (Greenstein *et al.*, 1986), viscosidade que mantém o agente ativo em contato com as paredes do canal radicular e os túbulos dentinários, e é solúvel em água, facilitando sua remoção (Ferraz *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2001).

Emilson (1977) utilizou teste de difusão em ágar com discos contendo 50 µg de clorexidina contra 21 espécies de microrganismos, que foi correlacionada à concentração inibitória mínima através dos diâmetros das zonas de inibição. Houve um grande espectro de suscetibilidade tanto dos microrganismos Gram-positivos, quanto Gram-negativos.

Delany *et al.* (1982) testaram a ação antimicrobiana *in vitro* da solução de gluconato de clorexidina 0,2% como agente irrigante e medicação intracanal sobre a microbiota de canais radiculares em dentes humanos recém-extraídos. Realizaram a avaliação do crescimento bacteriano pela inoculação de suspensão de raspas de dentina sobre o agar. Observaram a eficácia da clorexidina nas duas funções, onde promoveram uma redução significativa do número de bactérias.

White *et al.* (1997) determinaram se a clorexidina mantinha sua ação antimicrobiana por algum período após ser utilizada como irrigante endodôntico. Foram usados dentes humanos extraídos, instrumentados com clorexidina nas concentrações 2% ou 0,12% como agente irrigante. Após períodos de 6, 12, 24, 48 e 72 horas, foram realizadas coletas dos canais radiculares com cones de papel absorvente, os quais foram colocados sobre placas inoculadas com *Streptococcus mutans* e posteriormente medidos os halos de inibição. Na concentração de 2%, a clorexidina apresentou ação antimicrobiana por até 72 horas, enquanto que na menor concentração apresentou ação por até 24 horas.

Barbosa *et al.* (1997) avaliaram clínica e laboratorialmente a capacidade antimicrobiana do PMCC, clorexidina 0,12% e hidróxido de cálcio como medicação intracanal. Foram selecionados 311 casos de necrose pulpar com evidência radiográfica de lesão periapical, que receberam após o primeiro atendimento, curativo com PMCC por uma semana, sendo logo em seguida divididos em grupos preenchidos pelas medicações experimentais. Os grupos que não apresentaram crescimento microbiano após a primeira consulta foram excluídos do trabalho, restando 120 casos apenas. Destes foi realizada uma segunda coleta, que novamente foi testada para crescimento microbiano. A atividade antimicrobiana das substâncias foi testada *in vitro* através do teste de difusão em agar contra os anaeróbios estritos *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Propionibacterium acnes*; contra os facultativos *Actinomyces naeslundii*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*

mutans, e o aeróbio *Pseudomonas aeruginosa*. A incidência de culturas negativas no estudo clínico demonstrou que todas as medicações foram eficazes em reduzir ou eliminar a microbiota endodôntica, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Nos testes *in vitro* o PMCC mostrou os maiores halos de inibição contra todas as espécies testadas.

Lindskog *et al.* (1998) avaliaram a ação da clorexidina sobre reabsorções radiculares inflamatórias, pelo período de 1 mês, em incisivos reimplantados de macacos. Os resultados mostraram que o uso da clorexidina como medicação intracanal reduziu o processo de reabsorção, provavelmente devido à sua ação antibacteriana dentro dos túbulos dentinários e sobre as células do ligamento periodontal.

Em 2001, Ferraz *et al.* estudaram o gluconato de clorexidina na forma gel como irrigante endodôntico. Foi avaliada *in vitro* a habilidade antimicrobiana e de limpeza mecânica da substância tendo como base o gel natrosol. Setenta dentes humanos extraídos com acesso coronário realizado foram contaminados com *E. faecalis* e posteriormente divididos em três grupos de acordo com o irrigante a ser utilizado: clorexidina 2% gel, clorexidina 2% líquida e NaOCl 5,25%. Após o preparo, coletas com cone de papel absorvente foram realizadas em cada um dos espécimes, e colocadas em frascos contendo o meio de cultura BHI estéril para avaliar o crescimento microbiano. Não houve diferença significativa entre as três substâncias testadas. Com relação à limpeza mecânica, 25 dentes humanos extraídos foram instrumentados da mesma forma, de acordo com cada grupo, sendo clivados longitudinalmente e avaliados em microscopia eletrônica de varredura. A clorexidina 2% gel apresentou os melhores resultados com relação à limpeza das paredes dentinárias, provavelmente em função das propriedades mecânicas do próprio gel.

Okino *et al.* (2004) avaliaram a ação do hipoclorito de sódio e da clorexidina em diversas concentrações sobre tecido pulpar de dentes bovinos. Os resultados demonstraram que a clorexidina 2% gel e 2% em solução aquosa não foram capazes de dissolver tecidos orgânicos. As concentrações de NaOCl utilizadas (0,5%; 1,0% e 2,5%) apresentaram dissolução do tecido pulpar em diferentes velocidades, sendo que esta variou proporcionalmente a concentração da substância.

A clorexidina, mesmo em baixas concentrações, apresenta efeito tóxico para microrganismos, sua toxicidade em células do sistema imune do hospedeiro foi avaliada *in vitro* por Bonacorsi *et al.* (2004). Utilizando macrófagos peritoneais de camundongos, verificaram que o potencial citotóxico da substância depende da concentração e do tempo de exposição. Concentrações abaixo de 20 µg/ml de clorexidina por uma hora e 5 µg/ml por 24 horas foram designadas sub-tóxicas.

Vianna *et al.* (2004) compararam *in vitro* a atividade antimicrobiana da clorexidina e do hipoclorito de sódio contra alguns patógenos endodônticos. Dos irrigantes testados, o NaOCl na concentrações de 0,5%; 1,0%; 2,5%; 4,0% e 5,25% e clorexidina nas seguintes concentrações e formas: 1,0% e 2,0% gel; 0,2%; 1,0% e 2,0% líquida, podem ser utilizados como soluções irrigadoras, eliminando inclusive *E. faecalis* num período de até 30 minutos.

Siqueira *et al.* (2007) conduziram um estudo clínico para avaliar a redução bacteriana após o preparo químico-mecânico tendo a solução de digluconato de clorexidina 0,12% como irrigante, seguido do uso de medicação intracanal com hidróxido de cálcio e clorexidina 0,12% gel por sete dias. Foram selecionados 17 dentes unirradiculares de 14 pacientes que apresentaram câmaras pulpares intactas, necrose pulpar e evidência radiográfica de lesão periapical crônica. Foram realizadas coletas dos canais em três momentos do tratamento: S1- coleta inicial, S2 – pós-instrumentação, S3- coleta após a remoção da medicação. Depois de processadas foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (ufc) e a identificação das mesmas através do sequenciamento do gene 16S rRNA. Todas as amostras obtidas em S1 apresentaram bactérias cultiváveis. Em S2, apesar da redução da contagem de ufc, em 53,8% dos casos ainda havia bactérias viáveis e após a coleta S3, tais casos foram reduzidos a 7,7%. Tais achados indicaram que o protocolo apresentado pode ser usado com sucesso no tratamento de infecções intra-radulares primárias em dentes com periodontite apical.

Zorko & Jerala (2008) relataram que muitos antibióticos causam a liberação de componentes da parede celular que são estimuladores do sistema imune. Dessa forma, seria desejável que a substância tivesse ação antimicrobiana e neutralizadora sobre as endotoxinas. Estudaram, então, a clorexidina e a alexidina quanto à capacidade de neutralizar componentes de membrana bacterianos que estimulam receptores tipo Toll (TLRs). Os

resultados encontrados foram de que ambas as substâncias ligam-se não só ao LPS, mas também ao ácido lipoteicóico (LTA) das bactérias Gram-positivas, inativando a resposta inflamatória mediada pela ativação dos TLRs.

2.1.3. ASSOCIAÇÃO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO E CLOREXIDINA

Das diferentes substâncias já associadas ao hidróxido de cálcio, a clorexidina pode representar uma boa opção por apresentar um amplo espectro antimicrobiano, adsorção aos tecidos dentinários e boa tolerância tecidual. Diversos estudos sobre a efetividade antimicrobiana da associação já foram realizados, entretanto não é muito clara a influência da clorexidina sobre o hidróxido de cálcio sob outros aspectos.

Basrani *et al.* (2002) avaliaram *in vitro* a ação residual da clorexidina (2% e 0,2% gel, e 2% solução + dispositivo de baixa liberação contendo 25% de clorexidina) e hidróxido de cálcio, isoladamente, e em associação com clorexidina 2% solução e 0,2% gel sobre *Enterococcus faecalis*, em 98 dentes humanos. Após a inserção das medicações e da permanência destas por 7 dias, os canais foram inoculados com *Enterococcus faecalis* por 21 dias e posteriormente foram coletadas raspas de dentina obtidas pelo uso de brocas de Gates-Glidden. Os resultados demonstraram que a clorexidina, quando em concentração de 2%, apresentou ação antimicrobiana residual significativamente maior que as demais medicações sobre *Enterococcus faecalis*.

Basrani *et al.* (2003) avaliaram a eficácia do hidróxido de cálcio (associado ou não a clorexidina 0,2% gel) e da clorexidina (0,2% e 2% em gel ou solução), através do teste de difusão em agar e crescimento microbiano após inoculação em canais radiculares de dentes humanos extraídos. Para mensuração da densidade óptica, as amostras foram coletadas dos canais infectados após sete dias da colocação da medicação e foram cultivadas por 24 horas para detecção de bactérias viáveis. No teste de difusão em agar, a clorexidina foi eficaz contra *Enterococcus faecalis* proporcionalmente a concentração, entretanto o hidróxido de cálcio não apresentou efeito. No teste de crescimento microbiano, a clorexidina apresentou resultado significativamente melhor contra *E. faecalis* que o hidróxido de cálcio ($P < .05$), mas não houve diferenças significativas entre as formas e concentrações de clorexidina. Os

autores ainda ressaltam que a clorexidina aplicada como gel ou solução pode alcançar irregularidades do sistema de canais radiculares melhor que a pasta de hidróxido de cálcio.

Rabelo (2003) avaliou, *in vitro*, a penetrabilidade, o pH e a liberação de íons cálcio de pastas à base de hidróxido de cálcio [Vitapex, Calasept, Calen Clorexidina (CHX) 1% e Calen], em canais de dentes decíduos e permanentes. A análise de pH e liberação de íons cálcio foi efetuada por meio de peagâmetro e espectrofotômetro de absorção atômica, respectivamente. As medidas das variações de cálcio e pH foram obtidas em diversos tempos experimentais. A pasta Calen CHX 1% foi a que melhor se comportou, frente à liberação de cálcio e à manutenção do pH alcalino em função do tempo. Na análise da penetrabilidade, um corante foi misturado às pastas, para evidenciar a penetração das mesmas na dentina. Os dentes foram cortados longitudinalmente no sentido vestibulo-lingual e avaliados. A autora concluiu que a pasta Calen CHX 1% foi a que apresentou o melhor resultado, seguido da pasta Calen para os dentes decíduos, enquanto para os dentes permanentes ambas apresentaram valores semelhantes, sendo melhores que a Vitapex e a Calasept.

Podbielski *et al.* (2003) realizaram um estudo com o objetivo de identificar combinações de substâncias que aumentassem a atividade antimicrobiana da medicação intracanal. O hidróxido de cálcio foi testado em suspensão e como componente de cones de guta-percha. A eficácia bactericida foi comparada entre: a) suspensão de hidróxido de cálcio; b) cones de guta-percha contendo óxido de zinco; c) suspensão de hidróxido de cálcio com cone de guta-percha contendo óxido de zinco; d) suspensão de hidróxido de cálcio associada a cones de guta-percha contendo clorexidina e óxido de zinco, e e) cones de guta-percha contendo hidróxido de cálcio juntamente com cone de guta-percha contendo óxido de zinco e clorexidina. Os microrganismos testados foram *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus intermedius*, que permaneceram em contato com as soluções e cones, até a coleta das amostras durante 1, 2, 3, 7 e 14 dias de incubação. Os resultados mostraram que a suspensão do hidróxido de cálcio isoladamente reduziu de modo considerável o número de bactérias Gram-negativas. Com relação às Gram-positivas *P. micros* e *S. intermedius*, a combinação entre hidróxido de cálcio, clorexidina e óxido de zinco apresentou ação bactericida mais rápida, se comparada ao hidróxido de cálcio, isoladamente. Em relação ao *E. faecalis*, a

combinação da suspensão do hidróxido de cálcio com os cones de guta-percha contendo óxido de zinco e clorexidina reduziu mais rapidamente o número de bactérias viáveis, sem causar sua completa inativação. Os autores recomendaram a combinação do hidróxido de cálcio à clorexidina para uma rápida erradicação de *P. micros* e *S. intermedius*

Gomes *et al.* (2003a) avaliaram a efetividade do digluconato de clorexidina 2% gel e hidróxido de cálcio como medicação intracanal, em diferentes períodos de tempo (1, 2, 7, 15 e 30 dias). Canais radiculares de dentes bovinos foram previamente infectados com *Enterococcus faecalis*. As medicações testadas foram: clorexidina 2% gel; hidróxido de cálcio + polietilenoglicol 400, clorexidina 2% gel + hidróxido de cálcio. Foi observado que a clorexidina 2% gel inibiu o crescimento bacteriano proveniente das amostras de dentina infectada em todos os períodos de tempo. A associação de hidróxido de cálcio e polietilenoglicol foram ineficientes na eliminação bacteriana, em todos os períodos de teste. Observaram ausência de contaminação da dentina nos períodos de 1 e 2 dias, nas amostras onde a associação de clorexidina 2% gel e hidróxido de cálcio foi empregada. Nos períodos subsequentes, de 7 e 15 dias, houve um decréscimo da atividade antimicrobiana e, em 30 dias, todas as amostras desse grupo apresentaram-se contaminadas. Os autores concluíram que a clorexidina 2% gel apresentou ampla atividade antimicrobiana sobre o *Enterococcus faecalis*, e que esta decresceu com o passar do tempo.

Gomes *et al.* (2003b) determinaram *in vitro* o tempo necessário para recontaminação de canais radiculares selados coronariamente, preenchidos por hidróxido de cálcio, clorexidina 2% gel ou pela associação de ambos. Foram utilizados 75 pré-molares inferiores divididos em nove grupos, de acordo com a medicação intracanal utilizada: (i) medicação com clorexidina e sem selamento, (ii) hidróxido de cálcio e sem selamento, (iii) hidróxido de cálcio associado a clorexidina e sem selamento, (iv) clorexidina 2% gel e selamento coronário, (v) hidróxido de cálcio com selamento, (vi) associação das medicações com selamento, (vii) sem medicação intracanal e com selamento coronário, (viii) sem medicação intracanal e sem selamento coronário. As coroas ficaram imersas em saliva e BHI e apenas os ápices dos dentes em teste estavam em contato com o meio de cultura líquido estéril. Os frascos foram incubados e a turbidez do meio observada diariamente. Os resultados revelaram que os tempos médios necessários para a penetração de microrganismos através

dos canais contendo os medicamentos variou de 1,8 a 7,2 dias. Os medicamentos que apresentaram maior barreira física foram aqueles que continham selamento coronário e dentre estes, os melhores em ordem decrescente foram o hidróxido de cálcio (17,2 dias), clorexidina (13,5 dias) e associação (11,9 dias). Os autores concluíram que o selamento coronário não previne infiltração de microrganismos através dos canais radiculares contendo medicação intracanal.

Evans *et al.* (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana da associação da clorexidina 2% gel e do hidróxido de cálcio, quando comparado ao efeito da associação entre hidróxido de cálcio e água destilada, em discos de dentina bovina previamente contaminada com *Enterococcus faecalis*. Após uma semana no interior dos canais radiculares, nenhuma das associações foi capaz de eliminar completamente as bactérias do interior dos túbulos dentinários. A associação entre clorexidina 2% gel e hidróxido de cálcio foi a que apresentou o maior efeito bactericida.

Basrani *et al.* (2004) avaliaram algumas propriedades físico-químicas (pH, ângulo de contato, tempo de trabalho, radiopacidade e viscosidade) de medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio e clorexidina na forma gel. As medicações testadas foram clorexidina 0,2% e 2%, hidróxido de cálcio associado à água na proporção de 40g/100ml, e associação de hidróxido de cálcio e clorexidina 0,2%. O pH inicial para as associações de hidróxido de cálcio + clorexidina ou hidróxido de cálcio + água foi igual à 12,4 e não se alterou nas primeiras 24 horas. Dessa forma, a clorexidina não alterou o pH do hidróxido de cálcio, mantendo assim a ação antimicrobiana associada à liberação de íons hidroxila. A adição da clorexidina ao hidróxido de cálcio reduziu o ângulo de contato dessa associação e aumentou sua viscosidade. O uso da clorexidina em diferentes concentrações e em combinação ao hidróxido de cálcio apresentou propriedades físico-químicas satisfatórias para ser utilizada como medicação intracanal.

Sirén *et al.* (2004) mensuraram *in vitro* o efeito das associações entre o hidróxido de cálcio e a clorexidina 2% líquida ou ao iodeto de potássio iodado (IPI), sobre *Enterococcus faecalis*, utilizando blocos de dentina bovina contaminados. Verificaram que as associações mostraram-se mais efetivas que o hidróxido de cálcio, isoladamente, não interferindo na sua alcalinidade. Observaram ainda o potencial para serem utilizadas em longo prazo, e que

testes de toxicidade indicaram que não apresentaram maior toxicidade que seus componentes isoladamente.

Zerella *et al.* (2005) avaliaram os efeitos *in vivo* da associação entre hidróxido de cálcio e clorexidina 2% solução aquosa, comparadas ao hidróxido de cálcio aquoso isoladamente, durante o retratamento de 40 dentes com infecções secundárias que apresentavam lesões periapicais. Os dentes foram divididos em dois grupos: hidróxido de cálcio e clorexidina aquosa 2%, e hidróxido de cálcio aquoso. As medicações intracanal foram mantidas por períodos que variaram entre 7 e 10 dias, depois trocadas e mantidas pelo mesmo período. A presença de espécies de *Enterococcus* foi notada na primeira sessão. Os resultados mostraram que 12 dos 40 dentes (30%) apresentaram culturas positivas antes da obturação. A medicação controle desinfetou 12 de 20 (60%) dos dentes, enquanto a medicação experimental, com associação, desinfetou 16 dos 20 (80%) dos dentes, no início da terceira sessão de atendimento. Concluíram que a associação entre a clorexidina e o hidróxido de cálcio foi eficaz na desinfecção de dentes com infecções secundárias.

De Rossi *et al.* (2005) avaliaram *in vivo* o efeito da instrumentação manual e rotatória e utilização ou não de medicação intracanal com hidróxido de cálcio e clorexidina 1%, no reparo de lesões periapicais crônicas em cães, avaliadas após 30, 75 e 120 dias. Foram divididos em 4 grupos. Os dois primeiros grupos não receberam medicação, sendo obturados em sessão única, e os outros dois grupos receberam medicação intracanal de hidróxido de cálcio e clorexidina por 15 dias. Os resultados demonstraram, através de análise radiográfica e histológica, que aos 120 dias após a obturação, apenas o grupo que recebeu hidróxido de cálcio com clorexidina apresentou redução significativa no tamanho das lesões, independente da técnica de instrumentação ter sido manual ou rotatória.

Gomes *et al.* (2006) examinaram *in vitro* a atividade antimicrobiana da clorexidina 2% gel, do hidróxido de cálcio, e da associação de ambos sobre patógenos endodônticos. Utilizaram os métodos de difusão em agar e do contato direto. A clorexidina apresentou os maiores halos de inibição variando entre 4,33 e 21,67mm, e que o tempo necessário para eliminar todos os microrganismos foi de um minuto ou menos. A pasta de hidróxido de cálcio teve ação apenas em contato direto, e necessitou de 30 segundos a 24 horas para inibir o crescimento dos mesmos microrganismos. A associação dos dois medicamentos apresentou

zonas de inibição variando entre 2,84 e 6,5mm, sendo necessários de 30 segundos a 6 horas para inibir o crescimento dos microrganismos testados. Os resultados do trabalho mostraram que a associação da clorexidina com o hidróxido de cálcio teve melhor atividade antimicrobiana do que o hidróxido de cálcio com água estéril.

Montagner *et al.* (2006) avaliaram clorexidina 2% gel, clorexidina 2% gel + hidróxido de cálcio (1:1), clorexidina 2% gel + hidróxido de cálcio + óxido de zinco (1:1:1) e soro fisiológico + hidróxido de cálcio frente à *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Actinomyces viscosus* e *Porphyromonas gingivalis*. O objetivo desse estudo foi avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana de diferentes medicações intracanal na superfície radicular externa, e os resultados mostraram que o maior efeito antimicrobiano foi produzido pela clorexidina 2% gel, seguido de clorexidina 2% gel + hidróxido de cálcio, clorexidina 2% gel + hidróxido de cálcio + óxido de zinco e soro fisiológico + hidróxido de cálcio. O microrganismo mais suscetível à ação dos medicamentos foi *A. viscosus*, seguido de *E. faecalis*, *C. albicans* e *P. gingivalis*. Os autores concluíram que as medicações intracanal que apresentam CHX em sua composição foram capazes de se difundir através da dentina, atingindo a superfície radicular externa e, que a associação de hidróxido de cálcio e soro fisiológico não mostrou nenhuma atividade antimicrobiana na superfície radicular externa no período de 72 horas e, a clorexidina 2% gel e suas associações com hidróxido de cálcio e óxido de zinco demonstraram rápida capacidade de difusão na dentina radicular, ocasionando inibição de crescimento bacteriano.

Ercan *et al.* (2007) avaliaram *in vivo* o efeito da medicação intracanal com hidróxido de cálcio associado a clorexidina 1% em casos de retratamento com lesão periapical presente. Foram selecionados 70 pacientes, que foram submetidos ao retratamento endodôntico convencional, com o uso de clorexidina 2% como irrigante. A medicação intracanal foi trocada periodicamente por até seis semanas, até que o dente estivesse assintomático. Os pacientes foram chamados a cada três meses para preservação clínica e radiográfica. Quarenta e um casos (64%) apresentaram reparo completo (período variou de 6 a 36 meses), nove casos (14%) foram de reparo incompleto e 14 casos (22%) obtiveram insucesso. Os autores sugerem que a medicação intracanal do estudo pode ser utilizada com sucesso nos casos de retratamento endodôntico com lesão periapical associada.

Ballal *et al.* (2007) investigaram a eficácia antimicrobiana do hidróxido de cálcio, clorexidina 2% gel e associação de ambos contra *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* pelo teste de difusão em agar. Os autores concluíram pelos resultados obtidos que a clorexidina 2% gel foi mais eficaz contra os dois microrganismos testados no período de 72 horas.

Kontakiotis *et al.* (2008) conduziram um estudo para determinar a influência do hidróxido de cálcio e da clorexidina 2% gel, tanto sozinhos como associados entre si, sobre o selamento da obturação endodôntica. Noventa incisivos humanos extraídos foram divididos em quatro grupos: 1) hidróxido de cálcio por duas semanas; 2) clorexidina 2% gel por duas semanas; 3) hidróxido de cálcio associado à clorexidina 2% gel por duas semanas e 4) obturação imediata pela técnica da condensação lateral de guta-percha com cimento AH26. Os três grupos que receberam medicação intracanal foram posteriormente obturados da mesma maneira. A infiltração através do material obturador foi mensurada usando-se um modelo de transporte de fluídos. Sob as condições do presente experimento, nenhum dos grupos onde foi usada medicação intracanal apresentou diferença significativa em relação ao grupo obturado imediatamente. Os autores sugerem a incorporação da associação apresentada como medicação intracanal na prática clínica.

2.2. ENDOTOXINAS

Em 1892, Richard Pfeiffer e Peter Ludwig Panum separadamente descreveram uma substância presente na bactéria causadora do cólera, que não se encaixava no padrão das exotoxinas descritas até então, por dois motivos principais: não era inativada pelo calor e não era secretada pela bactéria, mas liberada durante sua desintegração. Assumindo que tal substância estava seqüestrada dentro da bactéria, Pfeiffer adicionou a palavra grega “dentro” a “toxina” e nomeou sua descoberta de endotoxina, embora trabalhos subseqüentes tenham demonstrado que a endotoxina situa-se na superfície externa da bactéria (Rietschel & Brade, 1992).

Lipopolissacarídeos (LPS) são estruturas formadas por polissacarídeos, fosfolípídeos e polipeptídeos, que constituem parte da parede externa de bactérias Gram-negativas. O alto

peso molecular do LPS provoca um grande número de reações tóxicas por parte do hospedeiro descrito como efeito endotóxico (Dahlén & Hofstad, 1977). Pode causar desde um aumento na temperatura corporal, até complicações mais sérias como sepse, que é uma complicação de pelo menos 50-60% das bacteremias por bactérias Gram-negativas e pode levar a óbito (Rangel-Frausto, 2005).

É constituído de uma âncora hidrofóbica chamada lipídio A, estendendo a partir deste uma cadeia oligossacarídica chamada core e na porção mais externa, do antígeno-O. Há uma grande heterogeneidade de LPS criada por numerosas modificações do lipídio A e do core. O antígeno-O, se presente, é a porção mais variável do LPS e mostra altos graus de variabilidade mesmo entre diferentes cepas da mesma espécie, entretanto a atividade endotóxica da molécula é atribuída ao lipídio A (Bos *et al.*, 2007).

As endotoxinas não agem diretamente sobre os órgãos, mas através da ativação do sistema imune. São ativadores policlonais, responsáveis por fenômenos que iniciam a resposta inflamatória, tais como: quimiotaxia de polimorfonucleares (PMNs), estímulo da liberação de enzimas lisossomais de PMNs, promoção de liberação de colagenase dos macrófagos, ativação do sistema complemento, aumento de temperatura corporal, atração de osteoclastos (Morse, 1981; Farber & Seltzer, 1988), alteração da estrutura e função de vários órgãos e células, alteração das funções metabólicas e modificações hemodinâmicas (Martich *et al.*, 1993).

Principalmente a partir do final da década de 70, pesquisas na área da Odontologia têm correlacionado a importância do estudo das bactérias anaeróbias, principalmente as Gram-negativas, nas infecções radiculares e o papel dos componentes celulares como as endotoxinas e outros componentes da parede celular contribuindo para os processos inflamatórios e sintomatologia dolorosa (Dahlén & Hofstad, 1977; Farber & Seltzer, 1988; Horiba *et al.*, 1991; Safavi & Nichols, 1993; Jacinto *et al.*, 2005).

O Lisado de Amebócito *Limulus* (LAL) é usado para detecção de endotoxinas bacterianas associadas com bactérias Gram-negativas. Em 1956, Frederik Bang observou que uma infecção de bactérias Gram-negativas no caranguejo *Limulus polyphemus* resultou em uma coagulação intravascular fatal. Posteriormente Levin & Bang (1964a,b) demonstraram que esta coagulação foi causada pela ativação de uma série de enzimas localizadas em células

sanguíneas (amebócitos) do *Limulus*. Subseqüentemente, o LAL, teste realizado com o uso do reagente de LAL preparado a partir do sangue do *Limulus*, demonstrou ser o meio mais sensível e específico para mensurar as endotoxinas bacterianas (Wildfeuer *et al.*, 1974).

O primeiro teste de LAL comercialmente disponível foi o Gel Clot. Em 1977, a FDA (Food and Drug Administration for Evaluation and Research) estabeleceu um lisado padrão de referência usado para estabelecer a sensibilidade de cada lote de lisado produzido para comercialização. Atualmente existem quatro metodologias aprovadas pela FDA, sendo uma delas o QCL-1000 (Quantitative Chromogenic Lysate), que foi o primeiro teste LAL quantitativo introduzido e é uma metodologia rápida para a detecção e quantificação de endotoxinas bacterianas, requerendo apenas 16 minutos de incubação.

Schein & Schilder (1975) quantificaram o conteúdo de endotoxina em quarenta dentes indicados para tratamento endodôntico. Os canais radiculares de quarenta dentes foram inundados com água apirogênica, explorados com limas tipo Kerr até o terço apical e tiveram 0,1 mL do fluido aspirado. A determinação de endotoxina foi feita pelo teste do lisado de *Limulus*. Os dentes com polpa necrosada tinham uma concentração mais alta de endotoxina que os dentes com polpas vitais. Os dentes sintomáticos também apresentavam mais endotoxinas que os assintomáticos.

Dahlén & Hofstad (1977) estudaram a atividade endotóxica de LPS extraídos de alguns microrganismos isolados de canais radiculares de dentes de macacos com lesão periapical induzida (*Bacteroides oralis*, *Fusobacterium necrophorum* e *Fusobacterium nucleatum*). O LPS foi injetado no tecido subcutâneo de coelhos para verificar a produção de reação inflamatória da pele e para induzir quimiotaxia leucocitária em tecido subcutâneo de ratos. O LPS do *B. oralis* mostrou uma habilidade consideravelmente menor de causar inflamação cutânea que o do *Fusobacterium*. Contudo, o efeito leucocitário das preparações de LPS determinado pelo método da câmara de cicatrização em ratos foi aproximadamente na mesma proporção. Este estudo mostrou que LPS pode ser isolado a partir de bactérias orais Gram-negativas e pode ter grande importância no desenvolvimento e manutenção das doenças periapicais.

Wesselink *et al.* (1978) examinaram através de um modelo experimental simulando o canal radicular, a ação da endotoxina sobre o tecido conjuntivo subcutâneo. O modelo

consistia de um tubo de polietileno, fechado nas duas extremidades e com duas pequenas aberturas nas laterais, que foi implantado subcutaneamente em um coelho após ter sido preenchido com solução de endotoxina. Um tubo vazio implantado no mesmo animal serviu como controle. O segundo estágio da reação local de Shwartzman foi usado para detectar até mesmo as mais leves alterações teciduais causadas por pequenas quantidades de endotoxina. Os animais foram divididos em três grupos, onde foram utilizadas as seguintes quantidades de endotoxina de *E. coli* 1mg, 1µg e 1ng. Tanto para os grupos experimentais quanto para o grupo controle, a análise microscópica da região do tubo implantado mostrou acúmulo de células sanguíneas e resquícios teciduais ao longo das paredes dos tubos. A comparação do tecido ao redor dos tubos implantados não mostrou diferença qualitativa, apenas uma diferença quantitativa entre a reação tecidual dos tubos experimentais e dos tubos controle.

Dahlén & Bergenholtz (1980) analisaram a atividade endotóxica em dentes com polpas necrosadas, utilizando a técnica do lisado de *Limulus*. Foram coletadas amostras de 13 canais radiculares de dentes monorradiculares superiores com tecido pulpar necrosado. Após realização do isolamento absoluto e abertura coronária os canais radiculares foram preenchidos com 15 – 25 µl de NaCl 0,43% e as paredes dos canais radiculares foram exploradas até o ápice com lima Hedström. A suspensão foi aspirada com uma seringa, o volume foi registrado e transferido para 1 ml de NaCl 0,43% apirogênico. Os parâmetros avaliados foram: contagem de bactérias viáveis nas amostras, o LPS extraído com fenol/água das diferentes bactérias Gram-negativas e as diferentes frações do exsudato inflamatório. Os autores observaram que quanto maior o número de bactérias Gram-negativas nas amostras, maior a concentração de endotoxinas. A quantidade de endotoxinas encontrada nos canais radiculares sugere que o LPS pode ter uma significância biológica para o desenvolvimento da inflamação periapical.

Dahlén *et al.* (1981) realizaram um estudo da influência do lipopolissacarídeo (LPS), extraído e purificado do *Fusobacterium nucleatum* nos tecidos periapicais de macaco. Um volume de 5-10 µl da solução de LPS foi introduzido no canal radicular com uma seringa e conduzido com lima até a região periapical do dente devidamente isolado. Uma bolinha de algodão embebida na solução do LPS foi colocada na câmara pulpar e o acesso foi selado com cimento de óxido de zinco e eugenol. Os dentes foram observados por três meses

(Grupo I, 18 dentes) e sete meses (Grupo II, nove dentes). Dezesete dentes foram utilizados como controle. Foi observada reação inflamatória nos tecidos periapicais de todos os dentes experimentais, com reabsorção óssea e dentária. Mesmo quando a inflamação era moderada, as células do osso apical apresentavam aumento da atividade enzimática, sugestivo de reabsorção óssea ativa. As células do grupo controle apresentaram pouca ou nenhuma reação enzimática.

Dwyer & Torabinejad (1981) avaliaram o efeito da endotoxina sobre os tecidos periapicais de dentes de gatos. Injetaram solução de endotoxina em cada canino previamente preparado de seis animais, nas concentrações de 100µg/ml, 10 µg/ml e 1µg/ml, e solução salina como controle. Três animais foram submetidos aos procedimentos previamente descritos, porém utilizando-se endotoxina inativada. Como controle adicional, solução salina foi injetada nos quatro caninos de um animal. Decorridos os períodos experimentais (2, 4 ou 6 semanas) os animais foram sacrificados. Áreas radiolúcidas relativamente extensas foram observadas nas radiografias dos dentes injetados com endotoxina em todos os períodos (2, 4 e 6 semanas). Nos casos onde foi injetada solução salina ou endotoxina inativada as áreas radiolúcidas periapicais eram muito pequenas ou ausentes. Histologicamente, a inflamação foi mais intensa nos dentes injetados com endotoxina pura que naqueles preenchidos com solução salina ou endotoxina inativada. A técnica da imunodifusão dupla não demonstrou a formação de anticorpos no soro colhido. De acordo com os resultados apresentados, a conclusão foi que a endotoxina bacteriana tem um papel na produção de lesões periapicais inflamatórias.

Pitts *et al.* (1982) investigaram o papel da endotoxina na inflamação periapical em cães. Doze dentes foram instrumentados ao nível do delta apical e os quatro dentes restantes foram submetidos ao arrombamento apical. Em metade dos canais radiculares de cada grupo foram injetados 0,1 ml de endotoxina de *Salmonella minnesota* R-595 e nos canais do grupo controle, solução salina estéril. Semanalmente, por quatro semanas no primeiro grupo e cinco no segundo grupo, as soluções (endotoxina e salina) foram renovadas no interior dos canais radiculares. As alterações radiográficas periapicais ocorridas foram mais severas nas raízes contendo endotoxinas do que nas raízes contendo solução salina. A avaliação histológica também demonstrou maior destruição óssea periapical e maior resposta inflamatória nos

espécimes contendo endotoxinas. Os autores concluíram que as endotoxinas podem ter um papel de fundamental importância na inflamação periapical e na destruição óssea.

Schonfeld *et al.* (1982) analisaram a atividade endotóxica em lesões periapicais. As amostras foram obtidas de dentes sem envolvimento periodontal no momento da realização de apicectomia. As amostras eram seccionadas, sendo uma parte fixada para análise histológica e a outra congelada para análise da presença de endotoxinas. Trinta amostras de tecidos foram examinadas histologicamente e classificadas como sendo inflamadas (granulomas apicais) ou não inflamadas (cicatrizes ou cistos não inflamatórios). Foi utilizado o método do lisado de amebócito de *Limulus* (LAL) para a detecção da endotoxina. Em 75% das lesões diagnosticadas como granulomas foi detectada a presença de endotoxinas, enquanto que apenas 20% dos tecidos não inflamados continham endotoxina. A presença da endotoxina foi altamente correlacionada ($p=0.015$) com a presença de inflamação nestes tecidos.

Csako *et al.* (1983) estudaram as propriedades físico-químicas da endotoxina após exposição à radiação ionizante por cobalto 60. A destruição da toxicidade primária do lipídio-A foi sugerida pelos resultados dos seguintes testes: de pirogenicidade e reatividade ao *Limulus* durante o aumento das doses de radiação. Os resultados indicaram que a inativação é devida, provavelmente, a múltiplos efeitos da radiação ionizante sobre o LPS bacteriano e a alteração do lipídio A da molécula de endotoxina.

Millar *et al.* (1986) estudaram a influencia de duas frações quimicamente distintas do LPS de *Bacteroides gingivalis* sobre o metabolismo ósseo. A eletroforese em poliacrilamida com SDS (dodecil sulfato de sódio) não demonstrou apenas a heterogeneidade de cada espécie, mas também que elas possuíam pesos moleculares diferentes. Entretanto, ambas continham os mesmos componentes, carboidratos e ácidos graxos, e as proporções destes diferiram entre as espécies de LPS. Os efeitos diretos dessas duas espécies na modulação da reabsorção óssea, colágeno ósseo e síntese protéica não-colagenosa foram examinados. Na reabsorção óssea, as duas espécies estimularam a liberação de cálcio de ossos fetais de ratos pré-marcados nas concentrações de 0,5 a 3 µg/ml. Ambas também promoveram uma redução de 30 a 40% na formação protéica de colágeno na concentração de 10 µg/ml. As espécies de alto peso molecular inibiram significativamente a formação de proteína não-colagenosa. Os

resultados mostraram que o LPS da *B. gingivalis* inibe a formação de colágeno ósseo e promove uma potente reabsorção óssea.

Horiba *et al.* (1989) investigaram a citotoxicidade do LPS purificado de '*Bacteroides gingivalis*', *Fusobacterium nucleatum* e *Veillonella parvula*, isolados de canais radiculares infectados, contra duas linhagens de células mesenquimais, fibroblastos L-929 e WI-38, e duas linhagens de células epiteliais, KB e HeLa S-3. A inibição do crescimento celular por esse LPS foi considerável para linhagens de células mesenquimais, mas para linhagens de células epiteliais essa inibição foi branda. Cada LPS purificado de '*B. gingivalis*', *F. nucleatum* e *V. parvula*, nas concentrações de 100 µg/ml ou 250 µg/ml, inibiu mais fortemente o crescimento dos fibroblastos L929 e, em seguida, também inibiu o crescimento dos fibroblastos WI-38. A inibição das células da linhagem epitelial, KB e HeLa S-3, não ocorreu quando foi usado LPS na concentração de 100 µg/ml e quando foi adicionado LPS na concentração de 250 µg/ml ocorreu leve inibição do crescimento celular.

Horiba *et al.* (1990) estudaram a distribuição de endotoxinas nas paredes dentinárias de canais radiculares infectados e sadios. Amostras da parede dentinária da superfície pulpar até o lado cementário de 30 dentes extraídos (5 sadios e 25 com canais infectados) foram preparadas por um método abrasivo. As raízes foram seccionadas vertical e transversalmente de modo a se obter blocos de raiz com aproximadamente 1 mm². Através do método abrasivo foi obtido pó de dentina de cada espécie, que foi posteriormente medido. Água apirogênica (1 ml) foi adicionada ao pó de dentina e o conteúdo de endotoxina foi extraído das amostras com ácido cítrico e um método colorimétrico foi utilizado para quantificá-las. O conteúdo de endotoxina foi significativamente maior nas amostras da superfície pulpar (30 µm de profundidade) dos dentes com canais radiculares infectados que nas amostras da parede cementária. O conteúdo de endotoxina das amostras de dentes com áreas periapicais radiolúcidas foi significativamente maior que nos dentes com áreas periapicais normais.

Horiba *et al.* (1991) avaliaram a correlação entre o conteúdo de endotoxinas e sintomas clínicos (dor espontânea, dor à palpação e exsudação) ou áreas radiolúcidas em canais radiculares infectados. Foram coletadas amostras de 30 canais radiculares (com periodontite apical) com pontas de papel absorvente estéreis, introduzidas por um minuto na região apical, para absorver o exsudato e microrganismos e armazenadas em soro fisiológico

livre de endotoxina. A presença de endotoxina foi detectada pelo método de formação de gel. Endotoxina foi detectada nos 16 dentes com sintomas clínicos, em 4 dos 14 dentes assintomáticos, em 19 dos 22 dentes com área radiolúcida e em 19 dos 20 dentes com exsudato. O estudo indicou uma correlação positiva entre a presença de endotoxinas e os sintomas clínicos ou áreas radiolúcidas. Tal correlação sugere que um aumento no nível de endotoxina em canais radiculares infectados pode estar associado com um aumento da inflamação periapical.

Safavi & Nichols (1993) estudaram os efeitos do hidróxido de cálcio sobre o LPS bacteriano. Tubos de vidro contendo suspensão aquosa de LPS na concentração de 30 µg/ml; e/ou hidróxido de cálcio (25 mg/ml), ou água apirogênica foram agitados por 20 segundos e incubados a 37°C por uma semana, mantendo então uma agitação diária por 20 segundos. Ácidos graxos livres foram quantificados destas amostras utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massa. O tratamento do LPS com hidróxido de cálcio demonstrou elevada liberação de ácidos graxos, sugerindo que esta substância pode mediar degradação do LPS, podendo representar importância clínica na endodontia.

Safavi & Nichols (1994) investigaram se o tratamento do LPS com hidróxido de cálcio alterou sua ação biológica. Para tanto, culturas de monócitos foram estimuladas por LPS e LPS tratado com hidróxido de cálcio e seus sobrenadantes analisados quanto ao conteúdo de prostaglandina E₂ usando cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Prostaglandina E₂ foi identificada nos sobrenadantes dos monócitos estimulados pelo LPS, mas não naqueles estimulados com LPS tratado com hidróxido de cálcio. Os autores concluíram que o tratamento com hidróxido de cálcio pode alterar as propriedades biológicas do LPS bacteriano.

Seltzer & Farber (1994) investigaram o papel dos microrganismos na etiologia de lesões periapicais e determinaram que as endotoxinas e outros componentes celulares estivessem relacionados ao desenvolvimento de inflamação pulpar e periapical.

Trope *et al.* (1995) avaliaram histologicamente o reparo da reabsorção inflamatória produzida intencionalmente em dentes reimplantados de cães, pelo uso do hidróxido de cálcio como medicação intracanal por diferentes períodos. De acordo com os resultados, foi

concluído que a medicação com hidróxido de cálcio utilizada em longo prazo pode ser mais efetiva nos casos de reabsorção radicular inflamatória.

Barthel *et al.* (1997) determinaram a habilidade do hidróxido de cálcio em neutralizar a atividade biológica de endotoxina de *E. coli*. Quatro concentrações de LPS variando de 1-1000 ng/ml em água estéril foram incubadas em duplicata, tanto com 25 mg de hidróxido de cálcio ou água estéril apenas. Os controles consistiram de hidróxido de cálcio sem LPS ou água estéril apenas. Monócitos foram coletados do sangue periférico de um doador saudável por centrifugação e plaqueados em uma densidade de 4×10^6 células/ml. Os monócitos aderentes foram incubados por 4 dias a 37°C com 5% de CO₂ em meio M199 com 10% de soro autólogo. As diferentes soluções de LPS foram adicionadas aos poços da placa no quinto dia. Após 4 horas, os sobrenadantes foram coletados e o TNF- α mensurado quantitativamente por um kit comercial de ELISA. Os resultados indicaram que o hidróxido de cálcio pode eliminar a capacidade indutora do LPS de estimular a produção de TNF- α pelos monócitos do sangue periférico (P<0.0001).

Khabbaz *et al.* (2001) determinaram a presença de endotoxinas no tecido pulpar de dentes sintomáticos e assintomáticos. Quantidades iguais de tecido pulpar (aproximadamente 8 mg) foram coletadas de 28 dentes monorradiculares cariados, sendo 15 sintomáticos e 13 assintomáticas. Também foram coletadas amostras de 5 dentes monorradiculares hígidos, como controle. O método utilizado para quantificar as endotoxinas foi o método quantitativo cromogênico LAL-1000. Endotoxinas foram detectadas em todos os tecidos pulpares dos dentes sintomáticos e em 2 dos 13 dentes assintomáticos. Nenhuma endotoxina foi encontrada no grupo controle. A concentração de endotoxinas no tecido pulpar de dentes sintomáticos foi significativamente maior que nos dentes assintomáticos. O estudo sugere que a concentração de endotoxinas no tecido pulpar é um dos fatores relacionados à dor pulpar, sendo que quanto maior a concentração de endotoxina, maior a severidade da dor.

Buck *et al.* (2001) avaliaram se soluções irrigadores comumente usadas no tratamento endodôntico ou o hidróxido de cálcio alteraria o LPS, utilizando para isso a técnica da espectrometria de massa e cromatografia gasosa. Em tubos de vidro apirogênicos foram misturados 25 μ l de LPS + 0,5 ml de água apirogênica + 0,5 ml do irrigante a ser testado: água, EDTA 15%, etanol 95%, clorexidina 0,12%, clorexidina 0,12% + hipoclorito de sódio

2,6%, clorexidina 0,12% + hipoclorito de sódio 2,6% + etanol 95% e hipoclorito de sódio apenas. O tempo de exposição para cada irrigante foi de 30 minutos e para o hidróxido de cálcio os períodos foram de 1, 2 e 5 dias. O hidróxido de cálcio usado em longo período, assim como a associação de clorexidina + hipoclorito + etanol apresentaram capacidade de hidrolisar a porção ativa da endotoxina (lipídio A), enquanto que as demais soluções experimentais apresentaram pouca ou nenhuma capacidade de inativação.

Silva *et al.* (2002) avaliaram histopatologicamente os tecidos apicais e periapicais em dentes de cães que foram submetidos a endotoxina bacteriana. Os cães tiveram as polpas dos pré-molares removidas e depois foram divididos em quatro grupos, sendo dois deles experimentais (n=20) e dois grupos controle (n=10). Os canais do grupo 1 foram preenchidos com endotoxina bacteriana, o grupo 2 com endotoxina + hidróxido de cálcio, o grupo 3 com solução salina e o grupo 4 não recebeu tratamento. Após um período de 30 dias foi realizado o processamento histológico. O infiltrado inflamatório, a espessura do ligamento periodontal, e a presença de áreas de reabsorção foram similares nos grupos 1 e 4. Os grupos 2 e 3 apresentaram resultados semelhantes entre si. Os autores concluíram que a endotoxina bacteriana causa lesão periapical e o hidróxido de cálcio inativou o LPS *in vivo*.

Nelson-Filho *et al.* (2002) avaliaram radiograficamente a região apical e periapical de dentes de cães submetidos inserção de endotoxina bacteriana dentro dos canais radiculares, em associação ou não ao hidróxido de cálcio. Metade de uma suspensão de 10 mg/ml de endotoxina foi mantida em seringas carpule estéreis, enquanto que a outra metade foi misturada a 2,75g de hidróxido de cálcio p.a. e depois acondicionada da mesma forma. Os cães tiveram as polpas dos pré-molares removidas e depois foram divididos em quatro grupos, sendo dois deles experimentais (n=20) e dois grupos controle (n=10). Os canais do grupo 1 foram preenchidos com endotoxina bacteriana, o grupo 2 com endotoxina + hidróxido de cálcio, o grupo 3 com solução salina e o grupo 4 não recebeu tratamento. Lesões periapicais semelhantes foram observadas nos grupos 1 e 4 após um período de 30 dias. A lâmina dura permaneceu intacta nos grupos 2 e 3. Os autores concluíram que o LPS causa lesões periapicais visíveis radiograficamente, mas quando associado ao hidróxido de cálcio, esta endotoxina foi inativada.

Jiang *et al.* (2003) determinaram os efeitos diretos do LPS na formação de células semelhantes a osteoclastos (CSO). O LPS foi utilizado nas concentrações de 1 µg/ml, 10 µg/ml e 100 µg/ml. Hidróxido de cálcio pó foi adicionado a metade das amostras numa concentração de 25 mg/ml. Células RAW 264.7 foram tratadas com um ligante de superfície que estimula a formação de osteoclastos e a atividade osteoclástica (RANKL) por 72 horas e posteriormente com as soluções preparadas com hidróxido de cálcio ou com RANKL como controle positivo por mais 48 horas. Os autores concluíram que o LPS estimula a formação de CSO e quando tratado com hidróxido de cálcio, tal atividade decresce significativamente.

Tanomaru *et al.* (2003) avaliaram o efeito de soluções irrigadoras e do hidróxido de cálcio sobre o LPS. Cento e quarenta raízes de pré-molares de sete cães foram preenchidos com uma suspensão preparada com 100 mg de endotoxina de *Escherichia coli* e 10 ml de solução salina permanecendo por 10 dias. As soluções irrigadoras utilizadas foram as seguintes: hipoclorito de sódio (1%, 2,5% e 5%), clorexidina 2% e solução salina. Em outro grupo o LPS foi mantido durante todo o período experimental e no último grupo o preparo biomecânico foi realizado com solução salina e os canais foram preenchidos com hidróxido de cálcio. Após 60 dias os animais foram sacrificados e foram avaliados: infiltrado inflamatório, espessura do ligamento periodontal, reabsorção cementária e reabsorção óssea. Pelos resultados obtidos, os autores concluíram que o preparo biomecânico com as soluções testadas não inativaram os efeitos da endotoxina, mas a medicação intracanal com hidróxido de cálcio pareceu inativar os efeitos induzidos pela endotoxina *in vivo*.

Jacinto *et al.* (2005) determinaram a concentração de endotoxina em canais com necrose pulpar e investigaram a possibilidade de relação entre tal concentração com sinais e sintomas clínicos. As amostras foram coletadas de 50 canais radiculares com necessidade de tratamento endodôntico devido à necrose pulpar. Foi utilizado o teste cromogênico quantitativo QCL-1000 para determinar a concentração de endotoxina em cada amostra. Unidades formadoras de colônias (ufc) foram detectadas através de cultura microbiana em todas as amostras. Nos casos em que os pacientes apresentaram dor espontânea, a média de ufc foi $1,43 \times 10^6$, enquanto que nos casos assintomáticos, foi de $9,1 \times 10^4$. A concentração média de endotoxinas encontrada nos casos com dor espontânea foi 18540 EU ml^{-1} , enquanto que nos casos assintomáticos a média foi de 12030 EU ml^{-1} . Foi encontrada correlação

positiva entre a concentração de endotoxina e os casos sintomáticos. Os autores concluíram que a endotoxina está presente em altas concentrações nos canais radiculares de dentes sintomáticos.

Oliveira *et al.* (2005a) avaliaram o efeito do hidróxido de cálcio e da polimixina B sobre as endotoxinas no canal radicular. Setenta e cinco incisivos superiores extraídos foram utilizados neste estudo. Suas coroas foram seccionadas para padronizar o comprimento das raízes. Após o preparo dos canais, as amostras foram irradiadas com cobalto 60 antes de serem contaminadas com 10 µl de uma solução padrão de endotoxina de *Escherichia coli*. Após 24 horas as medicações foram inseridas de acordo com o grupo: 1) hidróxido de cálcio, 2) polimixina B solução (10.000 UI/ml), 3) Otosporin (neomicina-polimixina B-hidro cortisona, 4) sem medicação - controle positivo e 5) raízes não contaminadas e sem medicação. A detoxificação das endotoxinas foi avaliada pelo teste do Lisado de Amebócito de *Limulus* e pela produção de anticorpos em cultura de linfócitos B. Sob as condições do experimento, os autores concluíram que o hidróxido de cálcio e a polimixina B como medicação intracanal detoxificaram endotoxinas no canal radicular e alteraram propriedades do LPS de estimular a produção de anticorpos por linfócitos B. A combinação de neomicina-polimixina B-hidro cortisona não exerceu tal atividade.

Oliveira *et al.* (2005b) avaliaram a habilidade da endotoxina difundir-se pelos túbulos dentinários e o tempo necessário para alcançar a superfície radicular externa. Trinta dentes humanos extraídos tiveram suas coroas e ápices removidos, antes que seus canais fossem preparados. Posteriormente tiveram sua superfície externa impermeabilizada com adesivo epóxi, deixando-se 10 mm da raiz exposta (terço médio). Os espécimes foram acondicionados em tubos plásticos e submetidos à radiação gama (cobalto 60). Foram divididos em dois grupos (n=15): 1) solução de endotoxina inoculada no canal radicular dos espécimes e 1 ml de água apirogênica no interior de cada tubo, 2) controle – inoculada água apirogênica nos canais e 1 ml de água apirogênica em cada tubo. Após 30 minutos, 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h e 7 dias, a água do interior dos tubos foi removida e substituída por outra. A alíquota removida foi testada para detectar-se a presença de endotoxina através da produção de anticorpos (IgM) em cultura de linfócitos B, pois a endotoxina é um ativador policlonal dessas células. Os resultados foram submetidos a análise estatística ANOVA (5%)

e teste de Tukey, em que foi verificado que a água removida dos tubos após 24 h, 48 h, 72 h e 7 dias induziu maior produção de anticorpos em relação aos demais grupos, com diferença significativa ($p < 0,05$). Assim, a endotoxina foi capaz de se difundir pelos túbulos dentinários em direção ao cimento, atingindo a região externa da raiz após 24 horas.

Oliveira *et al.* (2007) avaliaram os efeitos de irrigantes endodônticos sobre endotoxinas nos canais radiculares. Noventa e oito dentes humanos extraídos foram usados. Endotoxina de *Escherichia coli* foi inoculada em 84 canais. Todos os canais foram ampliados e divididos em 7 grupos ($n=14$), de acordo com a solução usada: 1) NaOCl 2,5 %; 2) NaOCl 5,25 %; 3) clorexidina 2 %, 4) hidróxido de cálcio 0,14 %; 5) polimixina B; 6) controle positivo, solução salina; 7) controle negativo (sem endotoxina). Foram coletadas amostras dos canais radiculares, uma imediatamente e outra após 7 dias. A detoxificação da endotoxina foi avaliada pelo teste do *Limulus* e produção de anticorpos em cultura de linfócitos B. Nas duas coletas, os grupos 4, 5 e 7 apresentaram os melhores resultados, com diferença significativa dos grupos 1, 2, 3 e 6 ($p < .05$). Os autores concluíram que a polimixina B e o hidróxido de cálcio inativaram a endotoxina e alteraram as propriedades do LPS de estimular a produção de anticorpos pelos linfócitos B. O hipoclorito de sódio e a clorexidina não inativaram as endotoxinas.

Vianna *et al.* (2007) quantificaram as endotoxinas presentes e bactérias cultiváveis em canais radiculares humanos com necrose pulpar, antes (S1) e após o preparo químico-mecânico com clorexidina 2% gel como substância química auxiliar (S2), e após 7 dias de medicação intracanal (S3), com o objetivo de avaliar os efeitos antimicrobianos e anti-endotóxicos. Foram selecionados 24 dentes, nos quais foi realizado o preparo químico-mecânico e o as seguintes medicações intracanal: pasta de hidróxido de cálcio; clorexidina 2% gel e a associação de ambas. Um teste cromogênico quantitativo de Lisado de Amebócito de *Limulus* mensurou as endotoxinas presentes. Foi realizada cultura microbiana para determinar a redução bacteriana através da contagem de unidades formadoras de colônia. Valores relativamente altos de endotoxina ainda estavam presentes no canal radicular após o preparo químico-mecânico, embora a maioria das bactérias tivesse sido eliminada. Nenhuma melhora foi obtida pela utilização da medicação intracanal por uma semana.

Lee *et al.* (2008) investigaram o efeito da solução de clorexidina 0,02% sobre o LPS e a interleucina-6 (IL-6) circulantes após o uso de ultrassom em pacientes com periodontite. Foi realizado o tratamento periodontal em 18 pacientes com o uso da solução de clorexidina 0,02% ou água estéril como irrigante, sendo que após a consulta foram coletadas três amostras de sangue de cada paciente, nos tempos: imediato, 5 e 120 minutos após o término do procedimento. Os resultados sugeriram que a instrumentação ultrassônica em pacientes com periodontite de moderada a avançada aumentou os níveis de LPS circulante após 5 minutos e as concentrações de IL-6 após 120 minutos, não havendo diferença significativa entre o uso da clorexidina 0,02% ou da água.

Martinho & Gomes (2008) quantificaram endotoxinas e bactérias cultiváveis em dentes com necrose pulpar e periodontite apical, antes e após o preparo químico-mecânico com NaOCl 2,5%; e investigar a possível correlação com sinais e sintomas. Vinte e quatro canais radiculares foram selecionados e foram realizadas coletas antes (S1) e após o preparo (S2). Os resultados demonstraram que os níveis mais altos de LPS foram encontrados nos dentes com sintomatologia clínica ($p < 0,05$). Na coleta S2, a média de redução de endotoxina foi 59,99 % e a redução bacteriana foi de 99,78 %. Os autores concluíram que o preparo químico-mecânico com NaOCl 2,5% foi moderadamente efetivo contra bactérias, mas menos efetivo contra endotoxinas presentes na infecção radicular. Além disso, foi encontrada associação positiva entre os altos níveis de endotoxina e sintomas clínicos.

3. PROPOSIÇÃO

- 1 – Avaliar *in vitro* se há interferência da clorexidina sobre o hidróxido de cálcio quanto a sua liberação de íons cálcio e no seu pH nos períodos de 24h, 7, 15 e 30 dias.
- 2 – Investigar por quantificação de endotoxinas *in vitro* a influência da clorexidina 2% gel sobre a capacidade do hidróxido de cálcio de reduzir endotoxinas dos canais radiculares, através de um teste cromogênico quantitativo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LIBERAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO E pH

Os procedimentos de análise química foram realizados no Laboratório de Química Analítica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo, campus de Piracicaba.

Foram preparados tubos cilíndricos de polietileno a partir de um Scalp 19 G (Embramac, São Paulo, Brasil) com 10 mm de comprimento e 1,3 mm de diâmetro interno, sendo 40 para cada grupo experimental e 8 para o grupo controle (Figura 1).



Figura 1 – Confecção dos corpos de prova com tubos de polietileno

Uma das extremidades foi selada termicamente com uma seladora (Barbi M-300, Itu, São Paulo, Brasil) e as respectivas medicações foram inseridas com o auxílio de espirais de Lentulo # 40 (Maillefer, Michigan, EUA). Os tubos do grupo controle permaneceram vazios.

Os grupos testados foram os seguintes:

Grupo 1: hidróxido de cálcio + soro fisiológico 0,9% - proporção 1:1 (v/v)

Grupo 2: hidróxido de cálcio + clorexidina 2% gel – proporção 1:1 (v/v)

Grupo 3: clorexidina 2% gel

Grupo 4 (controle): tubo vazio (sem medicação intracanal)

Cada espécime foi imerso em 10 ml de água destilada deionizada estéril em frascos plásticos tipo Falcon (Figura 2). As mensurações do pH e da liberação de íons cálcio foram realizadas nos períodos: 24 horas, 7, 15 e 30 dias após a inserção das medicações; sendo que em cada um dos tempos foram utilizadas 10 amostras de cada grupo experimental e 2 amostras do grupo controle, as quais foram posteriormente descartadas.

A mensuração do pH foi realizada com um peagâmetro de precisão (Hanna - modelo 9025) acoplado a um eletrodo convencional (Mettler Toledo), que possui a sua membrana de aferição da solução no vértice do eletrodo. O peagâmetro foi devidamente calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e 4,0 (Synth Ltda – Diadema – SP - Brasil) e as mensurações foram feitas nos períodos determinados diretamente na solução na qual cada espécime estava imerso. Entre cada leitura, o eletrodo foi lavado abundantemente com água destilada e secado com papel absorvente. Quando o eletrodo não estava sendo utilizado, o mesmo permanecia em contato com a solução tampão.

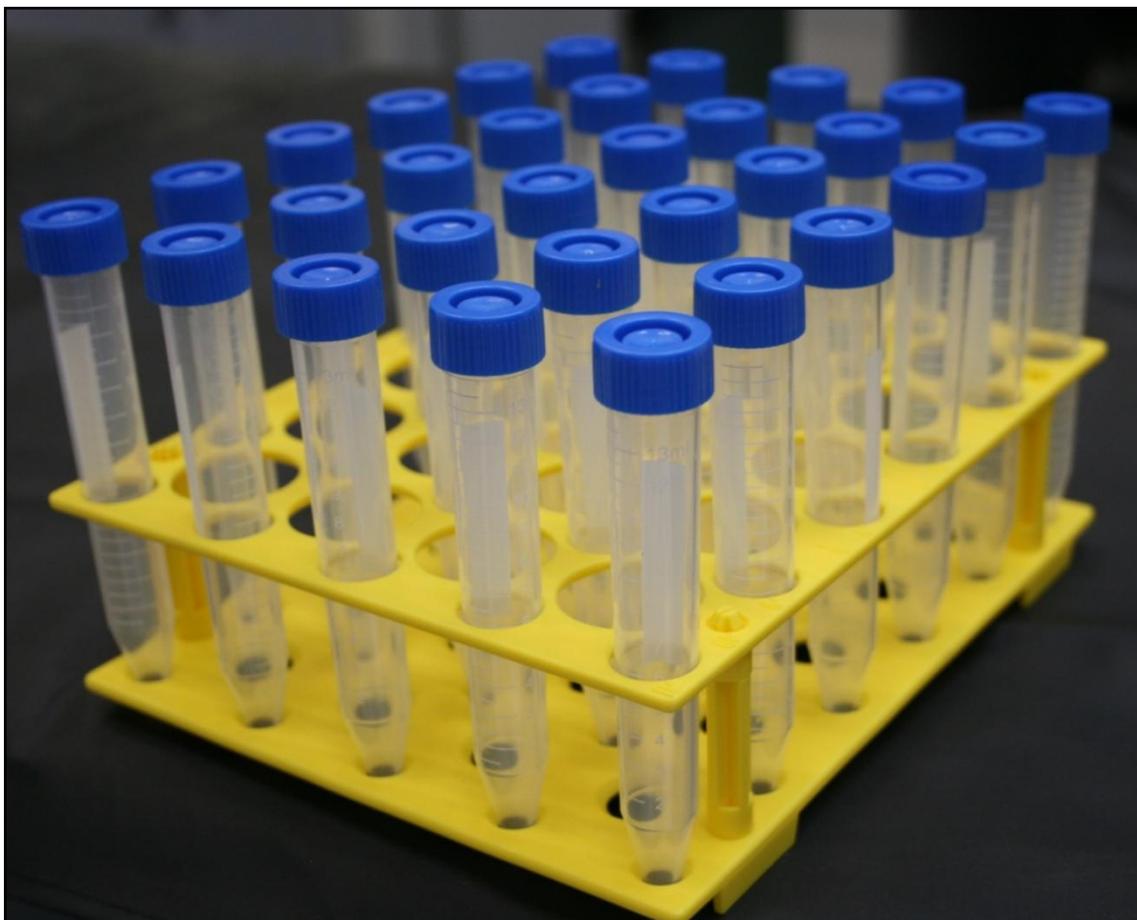


Figura 2 – Tubos tipo Falcon onde as amostras foram imersas em água destilada deionizada.

A análise do cálcio liberado pelas pastas testadas na solução foi realizada utilizando a espectrofotometria por absorção atômica, empregando-se o espectrofotômetro, modelo 4000 (Perkin-Elmer Corporation – Connecticut - USA). As concentrações de cálcio das amostras foram calculadas por meio da comparação com uma curva padrão de calibração, utilizando soluções padrões de concentrações de cálcio (Calcium Standard Solution – Merck – Darmstadt - Germany), em água ultra-pura. A cada leitura foram retiradas 100 µl das amostras com pipeta automática e diluídos em 2 ml de cloreto de potássio 0,15% (Reagen – Rio de Janeiro – RJ - Brasil). Com o objetivo de permitir uma melhor atomização do cálcio, foi acrescentado a essa diluição 250 µl de ácido nítrico p.a. (Merck – Darmstadt – Germany). O cálcio presente nas amostras foi processado na forma de aerossol, originado pela aspiração de 2 ml da solução, em chama, proveniente do gás acetileno e óxido nítrico, a uma temperatura aproximada de 2900°C. Os átomos de cálcio no estado fundamental, quando excitados, absorvem a radiação emitida pela lâmpada de cátodo oco (comprimento de onda 422,7 nm e corrente de 20 mA), específica para átomos de cálcio e magnésio, através de uma abertura de fenda de 0,7 nm e comprimento de queimador de 5,0 cm. As variações na quantidade de cálcio liberada, no decorrer dos períodos experimentais de 24 horas, 7, 15 e 30 dias foram impressas a partir de um programa instalado no computador acoplado ao espectrofotômetro.

Tanto as medidas do pH quanto as leituras da liberação de íons cálcio foram realizadas em duplicata e utilizadas as médias.

A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0.05$), com o uso do programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007).

4.2. REDUÇÃO DE ENDOTOXINAS

4.2.1. Preparo dos espécimes

Foram usados para o presente estudo 40 dentes humanos monorradiculares extraídos. A amostra, conservada em soro fisiológico, foi doada por cirurgiã-dentista da cidade de

Piracicaba, mediante termo de doação estabelecido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas (FOP - Unicamp). A seleção dos mesmos foi feita em relação às suas dimensões e similaridade na morfologia. Debris, cálculo e remanescentes de tecido mole foram removidos com o uso de uma cureta tipo Gracey e posteriormente os dentes foram armazenados em soro fisiológico 0,9% até seu uso. A coroa foi seccionada a fim de padronizar o comprimento em 12 mm. O comprimento de trabalho foi determinado 1 mm aquém dessa medida. Os canais foram ampliados neste comprimento até o diâmetro final com lima tipo K #60 (Maillefer, Michigan, EUA). O preparo químico-mecânico foi realizado preenchendo-se o conduto com clorexidina 2% gel no momento da instrumentação e irrigando-o com 5 ml de soro fisiológico após cada troca de lima. Após o preparo, os dentes foram irrigados com 3 ml de EDTA 17% por 3 minutos e 5 ml de soro fisiológico como irrigação final. Os canais foram secos com cones de papel (Dentsply Ind. Com. LTDA, RJ, Brasil) e a região apical foi selada com resina composta fotopolimerizável (Z250-3M Dental Products, St Paul, EUA). A superfície externa dos espécimes foi coberta com duas camadas de adesivo epóxico (Araldite-Brascola, SP, Brasil), com exceção da abertura cervical.

4.2.2. Esterilização dos espécimes

Todos os espécimes foram esterilizados em autoclave (20 minutos a 121o C) e enviados juntamente com os demais materiais utilizados nessa parte do experimento para irradiação com cobalto-60 para degradação de lipopolissacarídeos preexistentes. A irradiação das amostras foi realizada na EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiações; Cotia – SP – Brasil).

4.2.3. Contaminação com endotoxina

Endotoxina de *Escherichia coli* 055:B5 (Sigma, St Louis, EUA) foi usada para o experimento. Sob câmara de fluxo laminar (Pachane, Piracicaba, SP, Brasil), 20 µl de uma

solução padrão contendo endotoxina (1.000.000 UE ml⁻¹) foram inoculados nos canais radiculares de 35 espécimes usando uma micropipeta. Os dentes foram selados com algodão apirogênico e as microplacas contendo os espécimes foram fechadas, seladas e incubadas por 24 horas a 37° C em atmosfera umidificada.

4.2.4. Grupos experimentais

Após as 24 horas de incubação, os selamentos cervicais de cada amostra foram removidos, os canais foram secos com cones de papel absorvente e os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais (n=10) e dois grupos controle (n=5). Em cada um dos grupos os canais foram preenchidos com as pastas preparadas de cada medicação a ser testada, com exceção daqueles dos grupos controle.

GRUPO 1: hidróxido de cálcio + soro fisiológico 0,9% - proporção 1:1 (v/v)

GRUPO 2: hidróxido de cálcio + clorexidina 2% gel – proporção 1:1 (v/v)

GRUPO 3: clorexidina 2% gel

GRUPO 4: contaminado com endotoxina e sem medicação intracanal (controle positivo)

GRUPO 5: não contaminado com endotoxina e sem medicação intracanal (controle negativo)

A medicação foi inserida com o auxílio de espirais de Lentulo # 40 estéreis e apirogênicas. Todos os espécimes foram novamente selados com algodão apirogênico. As microplacas contendo os espécimes foram seladas e incubadas a 37° C em atmosfera umidificadas por 14 dias. Após esse período, os canais radiculares foram irrigados com 5 ml de água apirogênica para remoção de toda medicação intracanal e 2,5 ml do lavado de cada amostra foi coletada com uma seringa descartável de 3 ml (Figura 3D, 3E) . O tempo do procedimento irrigação/aspiração foi de 1 minuto para cada amostra, com a finalidade de padronizar o tempo de contato da água apirogênica com o conteúdo do canal.

4.2.5. Teste cromogênico quantitativo QCL-1000 (Cambrex, Walkerville, MD, USA)

Substâncias utilizadas para realização do teste:

1) Água apirogênica: foram fornecidos 2 vidros contendo 30 ml de água apirogênica cada, os quais foram usados para reconstituição de todos os reagentes e como controle negativo (Figura 3A).

2) Endotoxina de *E. coli*: um vidro contendo aproximadamente 15-30 UE de endotoxina liofilizada. A reconstituição foi feita pela adição de 1,0 ml da água apirogênica a temperatura ambiente. A atual concentração do vidro foi determinada pelo valor estabelecido no certificado de qualidade, que foi de 29 UE ml⁻¹. Procedeu-se agitação rigorosa em vórtex por 15 minutos (Figuras 3B, 3C).

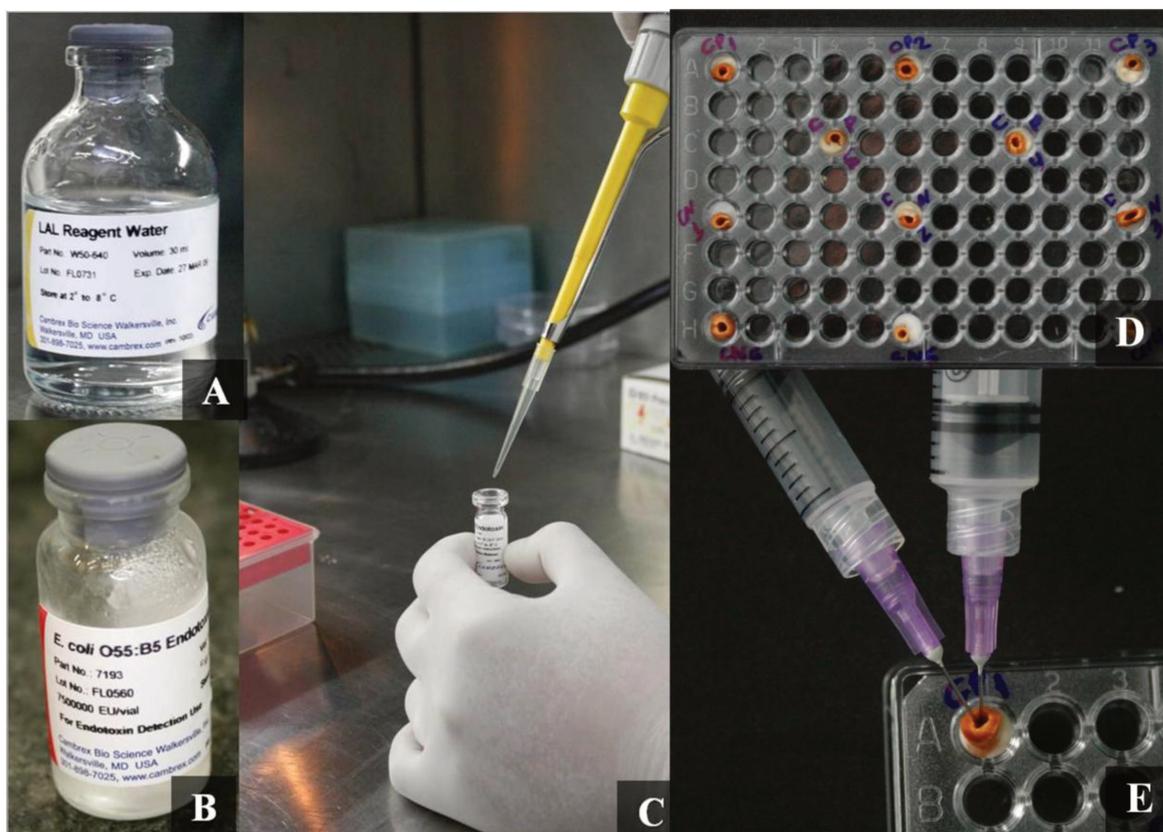


Figura 3 – A) Água apirogênica; B) Endotoxina liofilizada; C) Reconstituição; D, E) Coleta das amostras.

3) Substrato cromogênico: A reconstituição foi feita pela adição de 6,5 ml da água apirogênica para atingir uma concentração aproximada de 2 mM, sendo utilizados dois vidros contendo aproximadamente 7mg de substrato liofilizado.

4) Lisado de amebócito de *Limulus* (LAL): 5 vidros contendo o lisado liofilizado preparado dos amebócitos circulantes no sangue do *Limulus polyphemus*. Foram reconstituídos imediatamente antes do uso com 1,4 ml de água apirogênica.

4.2.6. Procedimentos

Durante os procedimentos uma série de precauções foi tomada para evitar a contaminação da amostra. Todos os materiais que entraram em contato com a amostra eram apirogênicos (livres de endotoxinas). Técnicas cuidadosas foram usadas para evitar a contaminação microbiana ou por endotoxinas. Adesão irrestrita aos tempos e temperaturas especificadas no manual de instruções do fabricante foi mantida durante todo o procedimento (Tabela.1). A curva padrão de endotoxina para avaliação cromogênica quantitativa através do lisado amebócito de *Limulus* (LAL) QCL-1000 foi gerada seguindo as recomendações do fabricante.

Tabela 1. Teste Cromogênico Quantitativo QCL-1000

	AMOSTRA	BRANCO
Amostra ou padrão a 20-25°C	50µl	
Água do reagente LAL		50µl
LAL	50µl	50µl
Agitação e incubação a 37°C	10 min	10 min
Solução do substrato a 37°C	100µl	100µl
Agitação e incubação a 37°C	6 min	6 min
Acido acético 25%	100µl	100µl
Agitação e leitura imediata		

A curva serviu como parâmetro para o cálculo da concentração de endotoxina na amostra, usando os materiais do kit (*Escherichia coli* O111: B4) com uma concentração conhecida [29 unidades de endotoxina (UE) ml⁻¹]. Após a incubação do LAL, as absorbâncias das soluções padrão de endotoxina foram medidas individualmente usando um leitor de ELISA (Ultramark, Bio-Rad, Foster City, CA, EUA). As amostras foram lidas em duplicata usando água apirogênica como branco. Curvas padrão de endotoxina foram obtidas pela comparação de cada absorbância com a concentração correspondente. Quatro soluções de endotoxina foram preparadas com concentrações de 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 UE ml⁻¹. Os valores de absorbância das soluções previamente preparadas foram espectrofotometricamente medidos a 405 nm no leitor de ELISA. A absorbância a 405 nm foi linear com os intervalos de concentração usados (Figura 4A, 4B).



Figura 4 – A) Leitor de ELISA conectado a computador; B) Placa posicionada dentro do leitor

4.2.7. Validação do Teste de Lisado do Amebócito de *Limulus*

Em 1987, o Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos publicou o “Guia de Validação do Teste de Lisado do Amebócito de *Limulus* como um teste de endotoxina para produtos acabados parenterais, produtos biológicos e dispositivos médicos de uso humano e animal”. O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semiquantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Ela deve

garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, alguns princípios foram observados para a execução do teste.

ESPECIFICIDADE

Habilidade do método em medir e diferenciar a endotoxina de componentes que possam estar presentes na amostra, tais como metabólitos, impurezas, compostos de degradação ou componentes da matriz. No ensaio cromogênico substâncias presentes nas amostras poderiam interferir na reação de LAL, resultando numa absorbância mais baixa. Para verificar a falta de inibição do produto, uma alíquota da amostra foi misturada com uma quantidade conhecida de endotoxina ($0,4 \text{ UE ml}^{-1}$). A solução misturada com endotoxina foi ensaiada juntamente com as outras amostras e suas respectivas concentrações determinadas. A diferença entre os dois valores calculados foi igual a concentração conhecida da mistura em $\pm 25\%$.

LINEARIDADE

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração de endotoxina na amostra, dentro de um intervalo especificado. A linearidade da curva padrão dentro do intervalo de concentração foi usada para determinar os valores de endotoxina e apresentou o coeficiente de correlação (r) igual a 1,0; sendo que o aceitável é $\geq 0,98$ (Figura 5). Caso o valor estivesse abaixo, o procedimento deveria ser repetido até atingir o nível aceitável para realização do teste com todas as amostras.

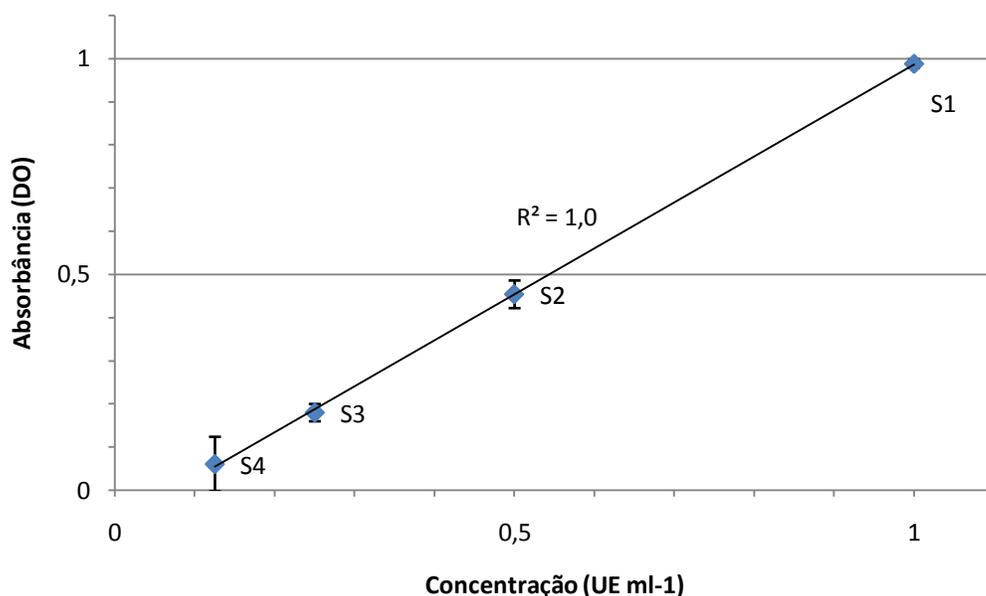


Figura 5 – Curva padrão utilizada como parâmetro para o cálculo das concentrações de endotoxinas das amostras.

REPRODUTIBILIDADE

Representa a precisão do método sob as mesmas condições operacionais, num curto período de tempo. As amostras replicadas devem ser executadas para estabelecer uma boa técnica e um baixo coeficiente de variação (CV). Este é igual a 100 vezes o desvio padrão de um grupo de valores dividido pela média e expresso em porcentagem. O CV de absorbância obtido manteve-se menor que 10%, que é a porcentagem exigida.

4.2.8. Teste

Diluições seriadas das amostras foram feitas até 10^{-4} . Água do reagente LAL (branco) foi usada como controle negativo. Todas as reações foram realizadas em duplicata para validar o teste. Uma microplaca de 96 poços (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) foi usada em bloco de aquecimento a 37 °C, onde permaneceu durante todo o procedimento. Inicialmente, 50 µl do branco foram adicionados à placa, seguido da

endotoxina padrão e das amostras consecutivamente adicionadas em cada poço. Este passo foi seguido pela adição de 50 µl do LAL em cada poço usando uma pipeta multicanal, então, a microplaca contendo o branco, endotoxina padrão e as amostras, mais o LAL foi brevemente agitada. Dez minutos depois, 100 µl da solução de substrato (pré-aquecida a 37°C) foram adicionados a cada poço, mantendo sempre a mesma seqüência. A placa foi agitada e incubada a 37 °C por 6 minutos, depois dos quais 100 µl do reagente neutralizador (ácido acético, 25% v/v) foram adicionados em cada poço. A absorbância (405 nm) foi lida usando espectrofotômetro.

4.2.9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0.05$), com o uso do programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007).

5. RESULTADOS

5.1. LIBERAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO E pH

A análise estatística foi baseada nas mensurações de liberação de íons cálcio e pH para cada grupo nos diferentes tempos. Foi utilizado análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0.05$).

A Tabela 2 permite comparar a liberação de íons cálcio, em mg/l, entre as diferentes medicações utilizadas e entre os diferentes períodos propostos. Dentro do mesmo tempo experimental, os valores dos grupos do hidróxido de cálcio associado ou não à clorexidina 2% gel não diferiram significativamente no período de 24 horas, 7 e 30; apresentando diferença apenas no período de 15 dias, com uma liberação significativamente menor apresentada pelo grupo da associação do hidróxido de cálcio com soro fisiológico. O maior valor encontrado foi no grupo do hidróxido de cálcio misturado ao soro fisiológico em 30 dias (151,21 mg/l), embora não tenha demonstrado diferença significativa com o grupo do hidróxido de cálcio associado a clorexidina no mesmo período (126,61 mg/l). O grupo da clorexidina 2% gel não apresentou leitura positiva para cálcio em nenhum dos períodos, sendo utilizado para excluir a possibilidade de resultados falso-positivos pela influência da substância. Da mesma forma se comportou o grupo contendo os tubos vazios (controle negativo).

Tabela 2 - Médias de liberação de cálcio em mg/l de acordo com a medicação intracanal e o período de avaliação

	Ca(OH) ₂ + Soro	Ca(OH) ₂ + CHX 2% Gel	CHX 2% Gel
24 horas	50,58 (±20,50) a C	54,02 (±12,44) a B	0 b A
7 dias	106,08 (±51,89) a AB	127,49 (±41,22) a A	0 b A
15 dias	96,42 (±36,78) b B	140,18 (±53,70) a A	0 c A
30 dias	151,21 (±34,45) a A	126,61 (±21,09) a A	0 b A

As letras indicam diferença estatística significativa; os valores de liberação de cálcio para grupos com as mesmas letras (a, b ou c) na mesma linha não diferem estatisticamente entre si; os valores de liberação de cálcio para grupos com as mesmas letras (A, B ou C) em uma mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (ANOVA, p<0,05; complementado pelo teste de Tukey, p<0,05).

Ainda com relação à Tabela 2, analisando as variações dentro de cada grupo, observamos que o hidróxido de cálcio associado ao soro fisiológico apresentou em 24 horas uma liberação de íons cálcio que aumentou significativamente após 7 dias e manteve-se sem diferença significativa até o décimo quinto dia do experimento. No período de 30 dias apresentou o maior valor de liberação de íons cálcio, diferindo estatisticamente dos períodos de 24 horas e 15 dias. O grupo do hidróxido de cálcio associado à clorexidina 2% gel apresentou um aumento significativo do intervalo de 24 horas para 7 dias, e depois manteve-se até o trigésimo dia sem alterações estatisticamente significativas, embora o maior valor tenha sido apresentado no período de 15 dias.

A Figura 6 representa o comportamento das três medicações estudadas ao longo dos 30 dias de observação quanto a liberação de íons cálcio em mg/l, demonstrando que, com exceção do grupo da clorexidina 2% gel que permaneceu inalterado por todo o período, os outros dois grupos apresentaram aumento considerável no intervalo de 24 horas a 7 dias. O período de 7 a 15 dias apresentou uma queda não significativa na liberação de cálcio no grupo do hidróxido de cálcio e soro, enquanto que sua associação com clorexidina 2% gel demonstrou uma pequena elevação. No trigésimo dia de observação o primeiro grupo apresentou elevação significativa, atingindo os valores mais altos durante todo o período

experimental, enquanto que o segundo apresentou queda não significativa em relação à mensuração anterior.

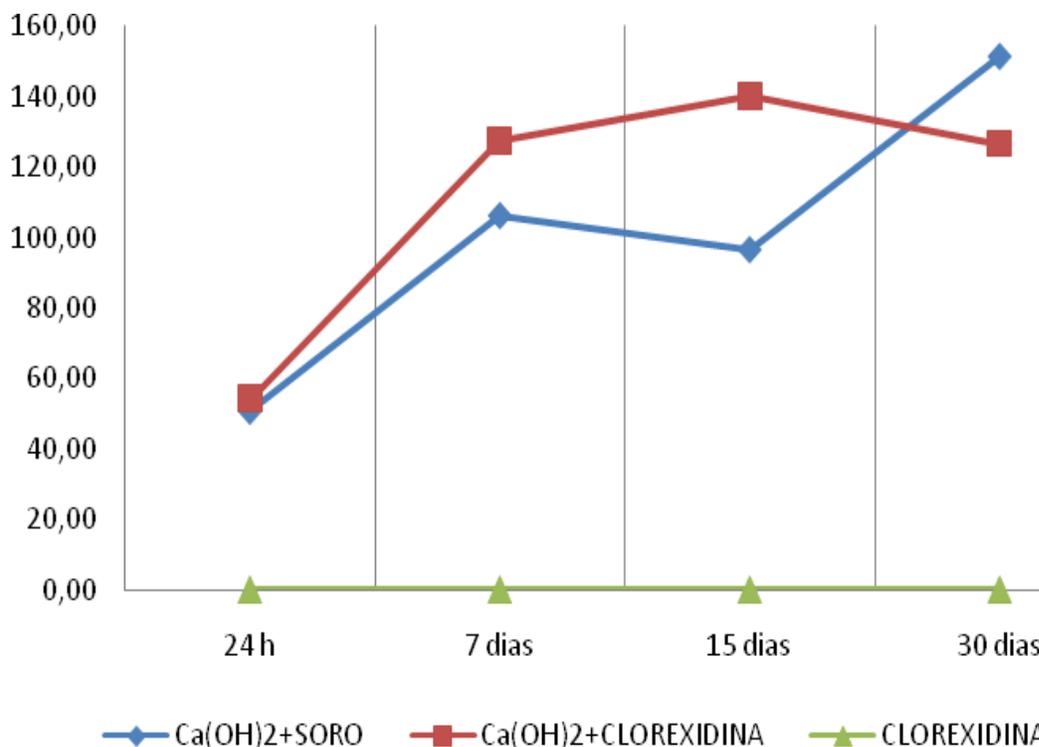


Figura 6 – Comparação das diferentes medicações avaliadas quanto a liberação de íons cálcio em mg/l nos quatro períodos experimentais.

Os valores do pH das medicações estão expressos na Tabela 3. Analisando as variações entre os diferentes grupos, observamos que os grupos contendo hidróxido de cálcio associado ou não à clorexidina 2% gel não apresentaram diferença significativa estatisticamente nos intervalos testados, com exceção do período de 30 dias, onde o hidróxido de cálcio associado ao soro apresentou o maior valor de pH. A clorexidina 2% gel apresentou valores significativamente menores que os outros dois grupos em todos os períodos experimentais. O grupo controle apresentou valores próximos do neutro durante todo o experimento.

Tabela 3 – Médias de pH de acordo com a medicação intracanal e o período de avaliação.

	Ca(OH) ₂ + Soro	Ca(OH) ₂ + CHX 2% Gel	CHX 2% Gel
24 horas	11,87 (±0,32) a B	11,95 (±0,19) a B	5,52 (±0,12) b B
7 dias	12,36 (±0,25) a A	12,33 (±0,26) a A	5,50 (±0,31) b B
15 dias	11,91 (±0,38) a B	12,12 (±0,24) a AB	6,88 (±0,79) b A
30 dias	12,43 (±0,11) a A	12,28 (±0,08) b A	5,58 (±0,13) c B

As letras indicam diferença estatística significante; os valores de pH para grupos com as mesmas letras (a, b ou c) na mesma linha não diferem estatisticamente entre si; os valores de pH para grupos com as mesmas letras (A, B ou C) em uma mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (ANOVA, $p < 0,05$; complementado pelo teste de Tukey, $p < 0,05$).

A análise das variações no pH dentro de cada grupo, mostra que no grupo do hidróxido de cálcio + soro, ocorreu um aumento significativo do pH no intervalo de 24 horas e 7 dias, seguido de queda estatisticamente significativa no décimo quinto dia e posterior elevação a valores próximos aos do sétimo dia no final do experimento em 30 dias. No grupo da associação do hidróxido de cálcio e da clorexidina, houve um aumento estatisticamente significativo do período de 24 horas para 7 dias, que se manteve sem alterações significativas até o trigésimo dia. O valor do pH após 15 dias não diferiu estatisticamente do valor do pH em 24 horas. Quanto ao grupo da clorexidina, o único período que apresentou alguma diferença significativa com relação aos demais, foi o de 15 dias, com maior valor.

O comportamento dos grupos nos intervalos experimentais está representado na Figura 7.

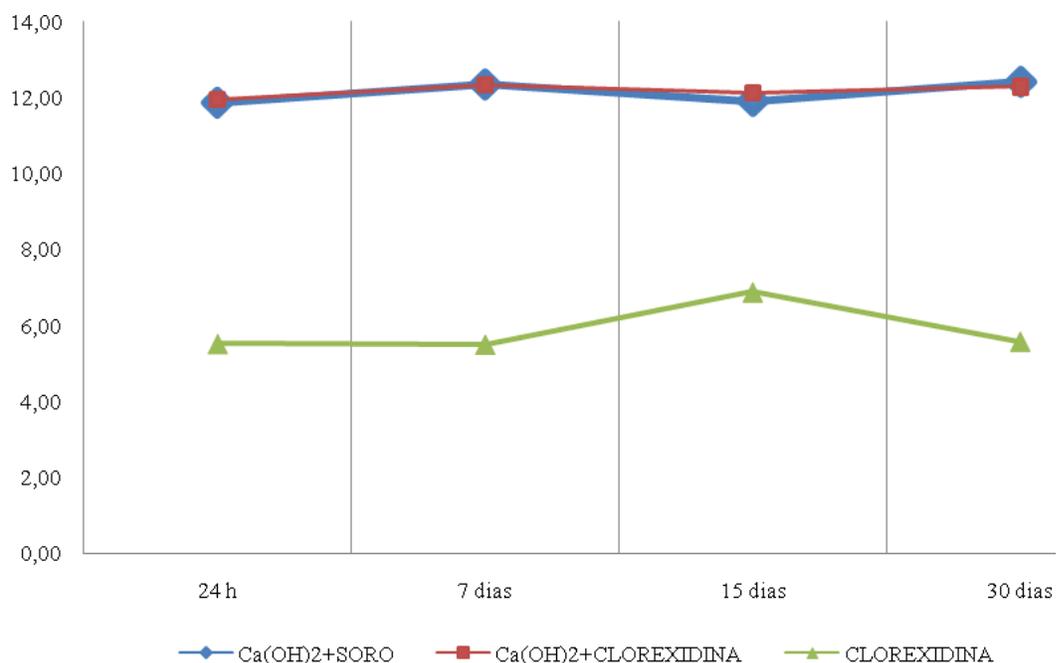


Figura 7 - Comparação das diferentes medicações avaliadas quanto às variações de pH nos quatro períodos experimentais.

5.2. REDUÇÃO DE ENDOTOXINAS

Quanto ao teste de lisado de amebócito de *Limulus* utilizado, os resultados obtidos estão representados na Tabela 3.

Tabela 4. Valores de endotoxina em UE/ml e porcentagem remanescente após o uso das respectivas medicações por 14 dias.

Contaminação inicial	Ca(OH) ₂ + Soro	Ca(OH) ₂ + CHX 2% Gel	CHX 2% Gel
20000	3573	2248	1674
100%	17,87% (b)	11,24% (a)	8,37% (a)

As letras indicam diferença estatística significativa (ANOVA, $p < 0,05$; complementado pelo teste de Tukey, $p < 0,05$).

O valor inicial em todas as amostras foi de 20.000 EU/ml, que correspondeu a 100% de endotoxina inoculada. Os valores estão também representados na Figura 8, através dos quais é possível observar a recuperação do conteúdo endotóxico dos canais após o uso das respectivas medicações e notar a maior redução do conteúdo endotóxico das amostras com o uso da clorexidina 2% gel (8,37%), apesar desta não diferir estatisticamente da redução obtida pelo grupo do hidróxido de cálcio associado à clorexidina (11,24%). O grupo que apresentou a maior porcentagem de endotoxina recuperada após o uso da medicação intracanal, foi o hidróxido de cálcio associado ao soro fisiológico, representando uma redução estatisticamente menor da quantidade de endotoxina inoculada inicialmente (17,87%). O grupo controle negativo, onde não foi inoculada endotoxina e nenhuma medicação foi utilizada, não apresentou valores de endotoxina presente. No grupo controle positivo foi detectada a presença de endotoxina em todas as amostras tendo ocorrido uma redução média de 50% em relação à endotoxina inoculada inicialmente.

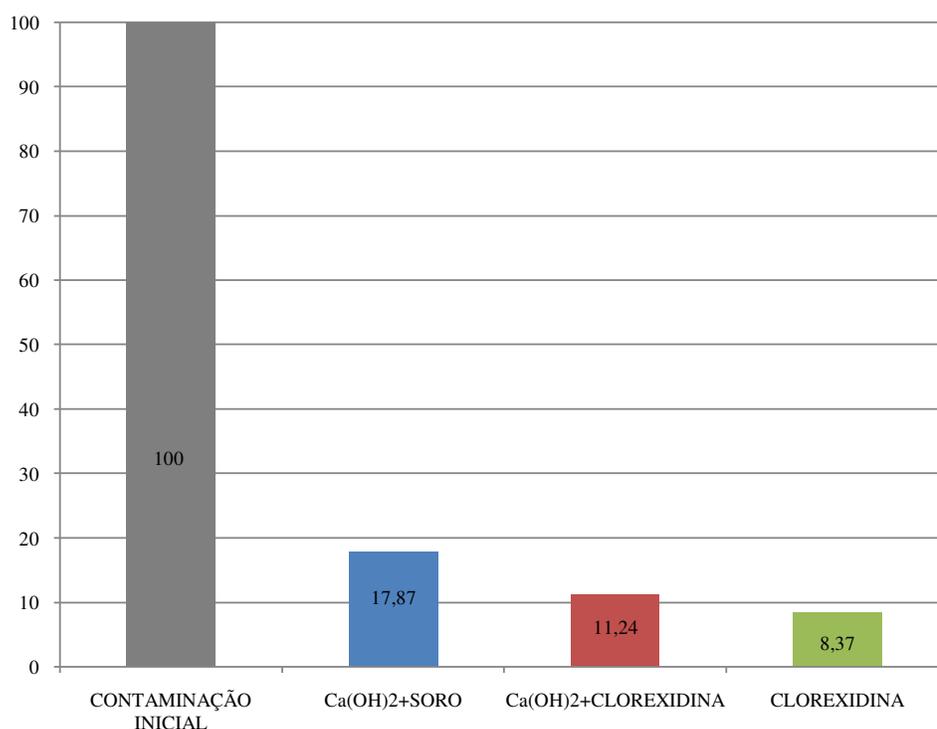


Figura 8 - Porcentagem inicial de endotoxinas e após o uso das respectivas medicações intracanal por 14 dias.

6. DISCUSSÃO

6.1. LIBERAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO E pH

Principalmente a partir da década de 70, o uso do hidróxido de cálcio foi amplamente difundido como medicação intracanal, persistindo até os dias atuais como o medicamento mais empregado na prática clínica. Essa escolha é resultado de uma somatória de propriedades favoráveis apresentadas por essa substância e estudada ao longo dos anos, tais como atividade antimicrobiana, ação mineralizadora e barreira física entre outros.

A dissociação iônica do hidróxido de cálcio em íons cálcio e hidroxila e a ação desses sobre os tecidos e microrganismos tem justificado o seu efeito mineralizador e antibacteriano. Como o pH do hidróxido de cálcio é cerca de 12, a maioria das espécies bacterianas isoladas de canais radiculares infectados é sensível aos seus efeitos, sendo eliminadas em curto período de tempo, quando em contato direto com essa substância, porém algumas, como o *Enterococcus faecalis* sobrevivem nesse meio alcalino (Siqueira & Lopes, 1999; Gomes *et al.*, 2002).

A difusão dos íons hidroxila através da dentina, e a conseqüente alteração de pH na mesma, tem sido alvo de alguns estudos na literatura (Tronstad *et al.*, 1981; Nerwich *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 1995).

A participação dos íons cálcio do hidróxido de cálcio tem sido observada em áreas de mineralização, nas barreiras de tecido mineralizado observadas em proteções pulpares, pulpotomias e nos selamentos biológicos apicais (Holland, 1971). É atribuída a esses íons, a capacidade de ativar a ATPase cálcio dependente, presente em áreas a serem mineralizadas (Tronstad *et al.*, 1981).

Frente a tais efeitos do hidróxido de cálcio, salienta-se a importância da manutenção das suas propriedades físico-químicas durante o preenchimento do espaço do canal radicular. Inúmeras substâncias já foram associadas ao hidróxido de cálcio a fim de agregar propriedades, porém estas não devem impedir sua dissociação iônica.

A clorexidina gel já foi citada como uma medicação intracanal eficaz devido principalmente ao seu amplo espectro antimicrobiano, baixa toxicidade e liberação gradual

prolongada (Ferraz *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2006; Souza-Filho *et al.*, 2008); além de reduzir o processo de reabsorção inflamatória (Lindskog *et al.*, 1998). Entretanto não funciona como barreira física dentro do canal e sua difusão pelos túbulos dentinários resulta num espaço vazio, propício a recontaminação (Gomes *et al.*, 2003).

Quando a clorexidina é associada ao hidróxido de cálcio, tem uma redução na sua atividade antimicrobiana, entretanto tal ação ainda é superior ao hidróxido de cálcio não associado (Gomes *et al.*, 2003). O objetivo, portanto, quando é realizada tal associação, é adicionar propriedades antimicrobianas ao hidróxido de cálcio, sem interferir nas demais propriedades deste (Souza-Filho *et al.*, 2008).

No presente estudo *in vitro*, foram realizadas observações em quatro tempos dentro do período experimental de 30 dias para determinar a liberação de íons hidroxila e íons cálcio de três medicações intracanal testadas. O modelo de estudo utilizando tubos de polietileno foi selecionado a fim de padronizar o mesmo volume de medicação inserida em cada amostra. Já o volume da água contida nos tubos individuais nos quais as amostras foram submersas foi determinado baseado num estudo piloto, que demonstrou que tal volume era suficiente para mensuração do pH e da liberação do cálcio.

A metodologia empregada para a determinação da liberação dos íons hidroxila, através do emprego de eletrodo acoplado a um peagâmetro deu-se devido à facilidade de técnica e pelo fato de oferecer uma padronização para a reprodutibilidade das medidas. A análise do cálcio contido nas pastas utilizando a espectrofotometria por absorção atômica tem sido utilizada por ser um método confiável, seguro e rápido e muito utilizado por outros autores (Leonardo *et al.* 1993, Maniglia *et al.*, 2003). A determinação da concentração de íons cálcio presentes em uma solução pode ser feita, também, através da técnica de titulação condutimétrica, a qual se baseia na variação da condutância da solução, pela substituição de íons presentes devido a uma reação química. Em suma, o método consiste em titular uma solução desconhecida de cálcio com uma solução padrão de EDTA.

Os valores do pH das pastas que continham hidróxido de cálcio pouco variaram e os valores de pH da clorexidina 2% gel mantiveram-se na faixa de 5,50 a 6,88; como esperado e em concordância com os valores já citados na literatura (Zerella *et al.*, 2005). Apesar de a clorexidina ter apresentado uma faixa de pH com valores mais baixos, sua associação ao

hidróxido de cálcio não interferiu na alcalinização do meio promovida por este, corroborando os resultados obtidos por outros autores (Basrani *et al.*, 2004; Souza-Filho *et al.*, 2008) e indicando que a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio promovida pelo alto pH permaneceu inalterada.

O comportamento das pastas com hidróxido de cálcio foi semelhante no início, ocorrendo um aumento significativo no pH de ambas no período de 24 horas a 7 dias; diferindo posteriormente. Isso indica que diferentes veículos permitem liberação de hidroxila em graus diferentes, o que está de acordo com estudos anteriores que avaliaram diferentes associações (Estrela *et al.*, 1995a; Simon *et al.*, 1995; Camões *et al.*, 2003; Camargo *et al.*, 2006; Souza-Filho *et al.*, 2008). Tal fato é relevante quando se tem que selecionar qual medicação intracanal utilizar em determinada situação clínica.

Foi possível observar que as duas pastas de hidróxido de cálcio permitiram a liberação progressiva de cálcio em todos os momentos do experimento. No início a liberação em ambas foi menor, com aumento gradativo e períodos de estabilização. Como aconteceu com as mensurações do pH das pastas, pode ser observado os maiores valores de íons cálcio ao final de 30 dias no grupo do hidróxido de cálcio associado ao soro, que é um veículo aquoso. Por outro lado, quando associado à clorexidina 2% gel, que é um veículo viscoso, a liberação foi significativa, porém sofreu menores variações durante o experimento.

Os valores encontrados neste estudo foram superiores aos encontrados em outros trabalhos, como o de Simon *et al.* (1995). Este fato pode ter sido resultado das diferenças no modelo de estudo. Eles utilizaram dentes humanos extraídos, selados apicalmente e coronariamente, sendo avaliada, portanto, a difusão através da dentina. No presente estudo os tubos de polietileno tinham diâmetro interno de 1,3 mm; ou seja, uma área de contato direto com o meio aquoso muitas vezes maior que aquela proporcionada pelo trabalho citado anteriormente. Além disso, por não ter sido feito com dentes humanos, não foi submetido ao efeito tampão da dentina (Haapasalo *et al.*, 2000).

Evidências científicas demonstram que o íon cálcio tem um papel no reparo e regeneração dos tecidos (Tronstad *et al.*, 1981), portanto, juntamente com o pH, sua liberação é considerada benéfica para uma medicação intracanal.

Dentro das limitações deste estudo, a associação do hidróxido de cálcio à clorexidina 2% gel possibilitou o aumento do pH e a liberação de íons cálcio a semelhança de quando foi utilizado o soro fisiológico como veículo, demonstrando que a mesma pode ser associada com o objetivo de agregar propriedades entre as duas substâncias.

6.2. ENDOTOXINAS

A presença de microrganismos Gram-negativos e endotoxinas têm sido associadas na endodontia aos casos que apresentam sintomatologia (Schein & Schilder, 1975; Jacinto *et al.*, 2005).

Endotoxinas são antígenos não específicos, fracamente neutralizados pelos anticorpos. São também capazes de ativar uma reação em cascata do sistema complemento sem a presença de anticorpos e gerar anafilotoxinas, que são potentes vasodilatadores e apresentam quimiotaxia para neutrófilos e monócitos. Além disso, atuam na ativação de plaquetas, mastócitos, basófilos e células endoteliais. A ativação do sistema complemento também envolve a formação de cinina, prostaglandina e bradicinina, que são importantes mediadores da inflamação e indutores de reabsorção óssea (Seltzer & Farber, 1994).

Esses possíveis danos causados pela endotoxina deixam evidente a necessidade de que sejam avaliadas substâncias utilizadas na prática endodôntica, quanto à capacidade de neutralização do LPS. Modelos de estudo comumente encontrados empregam o LPS de *E. coli*, como foi o caso do presente trabalho, mesmo sabendo que as respostas inflamatórias induzidas por este, possam ser diferentes daquelas promovidas pelo LPS de bactérias da cavidade bucal (Silva *et al.*, 2002; Tanomaru *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005a; 2007). Como o objetivo deste estudo foi comparar as medicações propostas quanto a sua ação anti-endotóxica, e não a potência de diferentes endotoxinas optou-se pela utilização da endotoxina de *E. coli* como endotoxina padrão.

O tempo de 24 horas aguardado entre a inoculação da endotoxina e a inserção da medicação foi determinado segundo os resultados de Oliveira *et al.* (2005b), no qual o tempo de 24 horas foi o mínimo requerido para que houvesse difusão das endotoxinas pelos túbulos dentinários até a superfície radicular externa.

O teste cromogênico quantitativo QCL-1000 é baseado na detecção enzimática e quantificação de endotoxina biologicamente ativa, porém os níveis exatos de LPS necessários para causar efeitos maléficos no canal radicular ainda não foram determinados (Vianna *et al.*, 2007). A concentração utilizada no presente modelo de estudo (20000 EU ml⁻¹) tomou por base os valores aproximados encontrados por Jacinto *et al.* (2005) nos casos com necrose pulpar e sintomáticos. A redução na concentração de endotoxina inicialmente inoculada no grupo controle positivo já era esperada devido à degradação do LPS que ocorre em função do tempo, porém, as condições de armazenamento foram as mesmas em todos os grupos e os valores do grupo controle não indicaram uma diferença que pudesse influenciar nos resultados.

De uma maneira geral, os trabalhos anteriores da literatura apresentaram resultados positivos do hidróxido de cálcio atuando sobre o LPS. Safavi & Nichols (1993, 1994) sugeriram que o hidróxido de cálcio poderia degradar o LPS bacteriano. Utilizando modelo de estudo diferente, porém também chegando a um resultado favorável ao hidróxido de cálcio, Silva *et al.* (2002) realizaram análise histológica em cães e Nelson Filho *et al.* (2002) fizeram a mesma observação em cães, só que radiograficamente, chegando a conclusão que o hidróxido de cálcio teve capacidade de neutralizar endotoxinas.

Oliveira *et al.* (2005a) afirmaram que além do hidróxido de cálcio, a polimixina B foi eficaz em inativar LPS no canal radicular. Tais resultados foram confirmados por outro trabalho (Oliveira *et al.*, 2007), que avaliou além destas medicações, o hipoclorito de sódio (2,5% e 5,25%) e a clorexidina 2%, com a diferença que estas últimas substâncias não foram eficazes sobre as endotoxinas, quando utilizadas pelo período de sete dias.

Diferente destes trabalhos citados, os resultados do presente estudo indicaram que nenhuma das medicações utilizadas neutralizou totalmente a endotoxina existente nos canais radiculares, concordando com o trabalho de Vianna *et al.* (2007).

De acordo com nossos resultados, houve uma redução parcial do conteúdo endotóxico com diferenças entre as medicações testadas pelo período de 14 dias, com a clorexidina atuando de forma a potencializar a ação do hidróxido de cálcio sobre o LPS. Com relação a esse aspecto, Vianna *et al.* (2007) não observaram melhora nos resultados com a associação da clorexidina 2% gel. Tal diferença pode ter ocorrido pelos modelos de estudo terem sido

diferentes (*in vitro* e *in vivo*), ou mesmo pelos diferentes períodos de permanência da medicação, que foi de 14 dias no presente estudo ao invés de sete dias.

O resultado positivo da clorexidina discorda de Tanomaru *et al.* (2003), que verificaram que a clorexidina 2% aquosa não reduziu a ação do LPS quanto a sua capacidade de induzir lesão periapical em cães. Entretanto, eles compararam canais que foram instrumentados com as soluções irrigadoras, dentre elas a clorexidina 2%, e posteriormente deixados vazios por 60 dias. Isso pode ter favorecido a recolonização microbiana dos canais, perpetuando as lesões periapicais, ou seja, impedindo de qualquer forma que houvesse o reparo tecidual esperado.

O fato dos melhores resultados estarem associados aos grupos contendo clorexidina pode ser explicado pelo fato dela ser uma bisbiguanida anfipática, que neutraliza componentes da parede celular bacteriana, como o LPS (Zorko & Jerela, 2008). Isso somado às suas outras propriedades, como amplo espectro antimicrobiano, agindo inclusive contra *E. faecalis* e *C. albicans* (Gomes *et al.*, 2006); substantividade (Almyroudi *et al.*, 2002), relativa ausência de citotoxicidade (Jeansonne & White, 1994) e não interferência na dissociação iônica do hidróxido de cálcio, como demonstrado na análise de liberação de cálcio e pH; faz dessa substância uma opção eficaz para ser associada ao hidróxido de cálcio, como medicação intracanal.

7. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos nas condições experimentais deste trabalho, foi concluído que:

1. A associação da clorexidina 2% gel ao hidróxido de cálcio não influenciou na liberação de íons cálcio das pastas. Além disso, nos períodos finais a associação hidróxido de cálcio e clorexidina 2% gel manteve valores mais estáveis.
2. O pH das duas pastas com hidróxido de cálcio permaneceu alcalino (por volta de 12,0) durante todo o experimento, de forma que a associação com a clorexidina 2% não alterou o pH nos diferentes tempos do estudo, porém o maior valor atingido foi pelo hidróxido de cálcio + soro fisiológico no período de 30 dias.
3. Os grupos da clorexidina 2% gel e da clorexidina 2% gel associada ao hidróxido de cálcio, apresentaram os melhores resultados quanto à redução da quantidade de endotoxinas nos canais radiculares, diferindo estatisticamente do grupo do hidróxido de cálcio e soro fisiológico.
4. Nenhuma das substâncias foi capaz de neutralizar totalmente a endotoxina inoculada nos canais radiculares.
5. A clorexidina 2% gel não interferiu nas propriedades químicas do hidróxido de cálcio quando em associação com este e potencializou sua capacidade de neutralizar o conteúdo endotóxico do canal.

8. REFERÊNCIAS*

1. Almyroud A, Manckenzie D, McHugh S, Saunders WP. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an *in vitro* study. J Endod. 2002; 28: 163-7.
2. Amabis JM. Biologia. São Paulo: Ed. Moderna; 1976.
3. Ayres M, Ayres Junior M, Ayres DL, Santos AAS. BioEstat: aplicações estatísticas nas ares das Ciências Biomédicas. Sociedade Civil Mamirauá: Belém, Pará – Brasil. 2007. 324p.
4. Ballal V, Kundabala M, Acharya S, Ballal M. Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. Aust Dent J. 2007; 52(2): 118-21.
5. Barbosa CAM, Goncalves RB, Siqueira Jr JF, Uzeda MD. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. J Endod. 1997; 5(23): 297-300.
6. Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. Int Endod. J 1997; 30: 155-9.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

7. Basrani B, Ghanem A, Tjaderhane L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. *J Endod.* 2004; 6(30): 413-18.
8. Basrani B, Santos M, DDS, Tjaderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, Lawrence HP, Friedman S, Ontario T. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94: 240-5.
9. Basrani B, Tjaderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, Friedman S. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96: 618-24.
10. Bonacorsi C, Raddi MSG, Carlos IZ. Cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to murine macrophages and its effect on hydrogen peroxide and nitric oxide induction. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37: 207-12.
11. Bos MP, Robert V, Tommassen J. Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol.* 2007; 61: 191-214.
12. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, and Adelberg's medical microbiology. 21 ed. Stamford: Appleton & Lange; 1998.
13. Buck RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. *J Endod.* 2001; 27(5): 325-27.
14. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg.* 1983; 55: 307-12.

15. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res.* 1981; 89:321-8.
16. Camargo CHR, Bernardineli N, Valera MC, de Carvalho CAT, Oliveira LD, Menezes MM, Afonso SE, Mancini MNG. Vehicle influence on calcium hydroxide pastes diffusion in human and bovine teeth. *Dent Traumatol.* 2006; 22: 302–306.
17. Camoes ICG, Salles MR, Chevitarese O, Gomes GC. Influence on pH of vehicle containing glycerin used with calcium hydroxide. *Dent Traumatol.* 2003; 19: 132-38.
18. Cervone F, Tronstad L, Hammond B. Antimicrobial effect of chlorhexidine in a controlled release delivery system. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 1: 33-6.

chlorhexidine irrigant on circulating levels of lipopolysaccharides and interleukin-6. *J Clin Periodontol.* 2008; 35: 415–19.
19. Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins Pathologic basis of disease.* 6 ed. Philadelphia; 1999.
20. Csako G, Elin RJ, Hochstein HD, Tsai CM. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infect Immunol.* 1983; 41: 190-6.
21. Dahlén G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res.* 1980; 59: 1033-40.
22. Dahlén G, Hofstad T. Endotoxic activities of lipopolysaccharides of microorganisms isolated from an infected root canal in *Macaca cynomolgus*. *Scand J Dent Res.* 1977; 85:272-8.
23. Dahlén G, Magnusson BC, Moller A. Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Fusobacterium nucleatum* on the

- periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*. Arch Oral Biol. 1981; 26: 591-8.
24. De Rossi A, Silva LAB, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA. Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide/1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005; 99: 628-36.
25. Delany GM, Patterson SS, Miller MS, 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.
26. Deveaux E, Lille2 D, Dufour D, Boniface B. Five methods of calcium hydroxide intracanal placement. An *in vitro* evaluation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000; 3(89): 343-55.
27. Dwyer TG, Torabinejad M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. J Endod. 1980; 7:31-5.
28. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. Scan J Dent Res. 1977; 85: 255-65.
29. Ercan E, Dalli M, Dülgergil T, Yaman F. Effect of intracanal medication with calcium hydroxide and 1% chlorhexidine in endodontic retreatment cases with periapical lesions: an *in vivo* study. J Form Med Assoc. 2007; 106(3): 217–24.
30. Estrela C, Pesce HF. 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. 1996; 7: 41-6.

31. Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann L. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *J Endod.* 1999; 25: 416-8.
32. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Junior O. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. *Rev Fac Odont Bauru.* 1994; 4(2): 31-8.
33. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Junior O. Mechanism of calcium hydroxide and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J.* 1995; 6: 85-90. (b)
34. Estrela C, Sydney GB, Pesce HF, Felipe Junior O. Dentinal diffusion of hydroxyl ions of various calcium hydroxide pastes. *Braz Dent J.* 1995; 6: 5-9. (a)
35. Estrela C. Eficácia antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio [tese-livre docência]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 1997.
36. Evans MD, Baumgartner JC, Khemalelakul S, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod.* 2003; 5(29): 338-9.
37. Farber PA, Seltzer S. Endodontic microbiology. 1. Etiology. *J Endod.* 1988; 14: 363-71.
38. Farhad A, Mohammadi Z. Calcium hydroxide: a review. *Int Dent J.* 2005; 55: 293–301.
39. Ferraz CCR, Gomes BPF, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2001; 7(27): 452-55.

40. Ferreira FBA, Silva & Souza PAR, Vale MS, Moraes IG, Granjeiro JM. Evaluation of pH levels and calcium ion release in various calcium hydroxide endodontic dressings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97: 388-92.
41. Fuss Z, Rafaeloff R, Tagger M, Szajkis S. Intracanal pH changes of calcium hydroxide pastes exposed to carbon dioxide *in vitro*. *J Endod* 1996; 7(22): 362-64.
42. Gomes BPF, Carvalho SS, Ferraz CCR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antibacterial activity of chlorhexidine gel and calcium hydroxide separately and combined on infected bovine root dentin. *Int Endod J.* 2003; 36: 267-75. (a)
43. Gomes BPF, 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.
44. Gomes BPF, Ferraz CCR, Vianna ME, Rosalen PL, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. *Braz Dent J.* 2002; 13: 155-61.
45. Gomes BPF, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod.* 2006; 32 (10): 937-40.
46. Gomes BPF, Sato E, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2003; 36: 604-9. (b)

47. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. J Period. 1986; 57: 370-7.
48. Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TMT, Orstavik D, Haapasalo MPP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an *in vitro* study. Int Endod J 2000; 33:126–31.
49. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. Int Endod J 2003; 36: 75-85.
50. Heithersay GS. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. J Br Endod Soc. 1975; 2(8): 74-93.
51. 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. (a)
52. Heling I, Steinberg D, Kenig S, Gavrilovich I, Sela MN, Friedman M. Efficacy of a sustained-release device containing chlorhexidine and calcium hydroxide in preventing secondary infection of dentinal tubules. Int Endod J. 1992; 25: 20-4. (b)
53. Hermann BW. Calciumhydroxyd als mittel zum behandein und füllen von zahnwurzelkanalen (dissertation). Würzburg. Med Diss. 1920. Apud Siqueira Jr JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. Int Endod J. 1999; 32: 361-69.
54. Holland R. Histochemical response of amputated pulps to calcium hydroxide. Rev Bras Pesq Med Biol. 1971; 2(4): 83-95.

55. Holland R. Reparação dos tecidos periapicais com diferentes formulações de hidróxido de cálcio – estudos em cães. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 1999; 53: 327-31.
56. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H, Ozeki M. Cytotoxicity against various cell lines of lipopolysaccharides purified from *Bacteroides*, *Fusobacterium* and *Veillonella* isolated from infected root canals. *J Endod.* 1989; 15: 530-4.
57. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radicular radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1991; 71: 492-95.
58. Horiba N, Maekawa Y, Matsumoto T, Nakamura H. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. *J Endod.* 1990; 16: 331-4.
59. Hosoya N, Takahashi G, DMD, Arai T, Nakamura J. Calcium concentration and pH of the periapical environment after applying calcium hydroxide into root canals *in vitro*. *J Endod.* 2001; 5(27): 343-46.
60. Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol.* 2005; 54: 777-83.
61. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod.* 1994; 20: 276-8.
62. Jiang J, Zuo J, Hurst IR, Holliday LS. The synergistic effect of peptidoglycan and lipopolysaccharide on osteoclast formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96: 738-43.

63. Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91: 587-93.
64. Komorowshi R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *J Endod.* 2000; 26: 315-7.
65. Kontakiotis E, Nakou M, Georgopoulou M. *In vitro* study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *Int Endod J.* 1995; 28: 285-89.
66. Kontakiotis EG, Tsatsoulis IN, Papanakou SI, Tzanetakis GN. Effect of 2% chlorhexidine gel mixed with calcium hydroxide as an intracanal medication on sealing ability of permanent root canal filling: A 6-month follow-up. *J Endod.* 2008; 7(34): 866-70.
67. Lee MK, Ide M, Coward PY, Wilson RF. Effect of ultrasonic debridement using a chlorhexidine irrigant on circulating levels of lipopolysaccharides and interleukin-6. *J Clin Periodontol.* 2008; 35: 415-19.
68. 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.
69. Leonardo MR, Silva LAB, Leonardo RT *et al.* Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. *J Endod.* 1993; 19: 348-52.

70. Leonardo MR, da Silva LA, Assed S, Tanomaru Filho M, Bonifacio KC, Ito IY. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *J Endod.* 2000; 26: 391-4.
71. Levin J, Bang FB. A description of cellular coagulation in the *Limulus* blood. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1964; 115: 337 (b).
72. Levin J, Bang FB. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1964; 115: 265 (a).
73. Lindskog S, Pierce AM, Blomlof L. Chlorhexidine as a root canal medicament for treating inflammatory lesions in the periodontal space. *Endod Dent Traumatol.* 1998; 14: 186-90.
74. Martich GD, Boujoukos AJ, Suffredini AF. Response of man to endotoxin. *Immunobiology.* 1993; 187: 403-16.
75. Martinho FC, Gomes BPF. Quantification of endotoxin and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2,5% sodium hypochlorite. *J Endod.* 2008; 34(3): 268-71.
76. Millar SJ, Goldstein EG, Levine MJ, Hausmann E. Modulation of bone metabolism by two chemically distinct lipopolysaccharide fractions from *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun.* 1986; 51: 302-6.
77. Montagner F, Gomes BPF, Berber VB, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza Filho FJ. Ação antimicrobiana de medicações intracanaís na superfície radicular externa frente a diferentes microrganismos. In: 23ª Reunião da Sociedade de Pesquisa Odontológica Brasileira, 2006, Atibaia. *Braz Oral Res.* São Paulo: Editora da USP, 2006; 20: 126-36.

78. Morse DR. Endodontic microbiology in the 1970s. *Int Endod J.* 1981; 14: 69-79.
79. Nelson-Filho P, Efeito da endotoxina (LPS), associada ou não ao hidróxido de cálcio, sobre os tecidos apicais e periapicais de dentes de cães, avaliação histopatológica. [tese] Faculdade de odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2000.
80. Nelson-Filho P, Leonardo ML, Silva LAB, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod.* 2002; 28: 694-6.
81. Nerwich A, Figdor D, Endo D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4 week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod.* 1993; 96: 302-6.
82. Nolte WA. *Oral microbiology.* 4 ed. London: Mosby; 1982: 3-37.
83. Ohara P, Torabinejad M, Kettering JD. Antibacterial effects of various endodontic medicaments on selected anaerobic bacteria. *J Endod.* 1993; 19: 498-500.
84. Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JAP. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J.* 2004; 37: 38-41.
85. Oliveira LD, Carvalho CAT, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. *Braz Oral Res.* 2005; 19(1): 5-10 (b).
86. Oliveira LD, Jorge AOC, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Valera MC. *In vitro* effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104: 135-42.

87. Oliveria LD, Leão MV, Carvalho CA, Camargo CH, Valera MC, Jorge AO, Unterkircher CS. *In vitro* effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. J Dent. 2005; 33(2): 107-14 (a).
88. Pacios MG, Casa MLL, Bulacio MLA, Lopez MH. Calcium hydroxide's association with different vehicles: In vitro action on some dentinal components. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003; 96: 96-101.
89. Panopoulos P, Kontakiotis E. Changes in pH and weight of Ca(OH)₂ pastes. Int Endod J. 1990; 23: 56-7.
90. Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. Int Endod J. 2002; 35: 698-702.
91. Pitts DL, Williams BL, Morton TH Jr. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. J Endod. 1982; 8: 10-8.
92. Podbielski A, Spahr A, Haller B. Additive antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on common endodontic bacterial pathogens. J Endod. 2003; 5(29): 540-45.
93. Rabelo RTS. Penetrabilidade de diferentes pastas à base de hidróxido de cálcio na dentina radicular de dentes decíduos e permanentes. Avaliação pH e da liberação de íons cálcio [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo; 2003.
94. Rangel-Frausto MS. Sepsis: still going strong. Arch Med Res. 2005; 36: 672-81.
95. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. Sci Am. 1992; 267: 54-61.
96. Safavi K, Nakayama TA. Influence of mixing vehicle on dissociation of calcium hydroxide in solution. J Endod. 2000; 11(26): 649-51.

97. Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biologic properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J.Endod.* 1994; 20(3): 127-9
98. Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod.* 1993; 19: 76-8.
99. Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod.* 1975; 1: 19-21.
100. Schonfeld SE, Greening AB, Glick DH, Frank AL, Simon JH, Herles SM. Endotoxic activity in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982; 53(1): 82-7.
101. Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1994; 78: 634-645.
102. Silva LAB, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin *in vitro*. *J Endod.* 2002; 2(28): 94-8.
103. Simon ST, Bhat KS, Francis R. Effect of four vehicles on the calcium hydroxide and the release of calcium ion. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 1995; 4(80): 459-64.
104. Simon, B. I., Goldman, H. M., Ruben, M. P. & Baker, E. The role of endotoxin in periodontal disease. Correlation of the amount of endotoxin in human gingival exudate with the histologic degree of inflammation. *J Periodontol* 1971; 42: 210–216.
105. Siqueira JR JF, Batista MD, Fraga RC. Antibacterial effects of endodontic irrigants on Black-pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod.* 1998; 24: 414-6.

106. Siqueira Jr JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999; 32: 361-69.
107. Siqueira Junior JF, Paiva SSM, Rôças IN. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *J Endod.* 2007; 5(33): 541-47.
108. Siqueira Junior JF, Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod.* 1997; 3(23): 167-69.
109. Siren EK, Haapasalo MPP, Waltimo TMT, Ørstavik D. *In vitro* antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112: 326–331.
110. Souza-Filho FJ, Soares AJ, Vianna ME, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPFA. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J.* 2008; 19(1): 28-33.
111. Spangberg L. Biological effects of root canal filling materials 7. Reaction of bony tissue to implanted root canal filling material in guinea pigs. *Odont Tids.* 1969; 77: 133-59.
112. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Anibal, FF; Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J.* 2002; 35: 735-9.
113. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LAB. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J.* 2003; 36: 733-9.

114. Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canals filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1981; 7: 17-21.
115. Trope M, Moshonov J, Nissan R, Buxt P, Yesilsoy C. Short vs. long-term calcium hydroxide treatment of established inflammatory root resorption in replanted dog teeth. *Endod Dent Traumatol*. 1995; 11: 124-8.
116. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration. Guideline on validation of the *Limulus* Amebocyte Lysate test as an endproduct endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. 1987.
117. Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 1(97): 79-84.
118. Vianna ME, Horz H-P, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22: 411–18.
119. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc; 1995.
120. Wakabayashi H, Morita S, Koba K, Tachibana H, Matsumoto K. Effect of calcium hydroxide paste dressing on uninstrumented root canal wall. *J Endod*. 1995; 11(21): 543-45.
121. Waltimo TM, Sirén E, Torkko H, Olsen I, Haapasalo M. Fungi in therapy resistant apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997; 30: 96-101.

122. Wesselink PR, Thoden van Velzen SK, Makkes PC. Release of endotoxin in an experimental model simulating the dental root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1978; 45: 789-95.
123. Westphal O. Bacterial endotoxins. The second Carl Prausnitz Memorial Lecture. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1975; 49(1-2):1-43.
124. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod* 1997; 4(23): 229-31.
125. Wildfeuer A, Heymer B, Schleifer KH, Haferkamp O. Investigations on the specificity of the *Limulus* test for the detection of endotoxin. *Appl Microbiol.* 1974; 28(5): 867-71.
126. Yücel AÇ, Aksoy A, Ertas E, Güvenç D. The pH changes of calcium hydroxide mixed with six different vehicles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103: 712-7.
127. Zerella JA, Fouad AF, Spangberg LSW. Effectiveness of a calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate mixture as disinfectant during retreatment of failed endodontic cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 100: 756-61.
128. Zmener O, Pameijer CH, Banegas G. An *in vitro* study of the pH of three calcium hydroxide dressing materials. *Dent Traumatol.* 2007; 23: 21–25.
129. Zorko M, Jerala R. Alexidine and chlorhexidine bind to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and prevent cell activation by antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62(4): 730-7.

ANEXO

1. Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
CERTIFICADO	
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Avaliação das propriedades químicas do hidróxido de cálcio, da clorexidina 2% gel e da associação de ambos e da sua ação sobre endotoxinas", protocolo nº 040/2008, dos pesquisadores FERNANDA GRAZIELA CORRÊA SIGNORETTI e ROGÉRIO DE CASTILHO JACINTO, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 26/05/2008.</p>	
<p>The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Evaluation of the chemical properties and habitability of inactivating endotoxins of calcium hydroxide, 2% chlorhexidine gel and the association of both", register number 040/2008, of FERNANDA GRAZIELA CORRÊA SIGNORETTI and ROGERIO DE CASTILHO JACINTO, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 26/05/2008.</p>	
Prof. Pablo Agustin Vargas Secretário CEP/FOP/UNICAMP	Prof. Jacks Jorge Júnior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP
<p>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</p>	