UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

UNICAMP

FÁBIO ROBERTO DAMETTO

Cirurgião-dentista

ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IMEDIATA E MEDIATA DA CLOREXIDINA GEL 2% USADA COMO IRRIGANTE ENDODÔNTICO CONTRA *Enterococcus faecalis*

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

PIRACICABA
2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

FÁBIO ROBERTO DAMETTO

Cirurgião-dentista

ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IMEDIATA E MEDIATA DA CLOREXIDINA GEL 2% USADA COMO IRRIGANTE ENDODÔNTICO CONTRA *Enterococcus faecalis*

Este exemplar foi devidamente corrigido, de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 11/02/03
Assinatura do Orientador

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

Orientador: Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho

Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz

PIRACICABA
2002

UNIDADE BC
Nº CHAMADA UNICAMP D183e
V ____ EX ____
TOMBO BC/ 54245
PROC. 124/03
C ☐ D ☑
PREÇO R$ 11,00
DATA 12/06/03
Nº CPD ____

CM00185225-4

BIB ID 293787

Ficha Catalográfica

~~D182e~~
D183e

Dametto, Fábio Roberto.
Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana imediata e mediata da clorexidina gel 2% usada como irrigante endodôntico contra *enterococcus faecalis*. / Fábio Roberto Dametto. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002.
xiv, 87f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Irrigação. 3. Bactérias. I. Ferraz, Caio Cezar Randi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

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

UNICAMP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 02 de Dezembro de 2002, considerou o candidato FÁBIO ROBERTO DAMETTO aprovado.

1. Prof. Dr. CAIO CEZAR RANDI FERRAZ _____

2. Prof. Dr. MARIO TANOMARU FILHO _____

3. Profa. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES _____

UNICAMP

"A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso".

Jhon Ruskin

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Aos meus pais Sebastião e Maria Helena, pelo exemplo de luta e conquista de um ideal;

pelo amor, carinho, ensinamento, afeto e dedicação que iluminaram meus caminhos obscuros;

pela renúncia de seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus.

Aos meus avós, Pedro, Antônia, Carolina e Augusto (in memorian), pelo exemplo de coragem, perseverança e dignidade para enfrentar as dificuldades que a vida nos impõe.

À Juliana pelo amor, carinho, paciência e

todo apoio para lutar por nosso ideal.

AGRADECIMENTOS

À DEUS,

Se vencemos, Alguém esteve conosco.

Se nada conseguimos, Ele continua junto a nós.

Se persistirmos juntos, veremos realmente que

Quem nos fez continuar sorrirá para nós, mesmo que

Dele, na felicidade, nós tenhamos esquecido.

Ao meu orientador

Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz

A você, que quando deveria ser simplesmente professor,

foi meu Mestre,

Que quando deveria ser simplesmente mestre,

foi meu Amigo

E em sua amizade me compreendeu e me incentivou a seguir meu caminho.

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

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.

À **Prof. Dr. Lourenço Correr Filho**, coordenador geral do curso de pós-graduação da FOP/UNICAMP.

À **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, coordenadora do curso de pós-graduação em Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP, pela dedicação e pelo apoio recebido.

Ao **Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho**, responsável pela área de Endodontia da FOP/UNICAMP, pelo exemplo profissional, seriedade e pelo apoio para realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, Prof. Dr. Fabrício Batista Teixeira e Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, professores da disciplina de Endodontia da FOP/UNICAMP, pelos ensinamentos transmitidos, pelo exemplo de união e pela inestimável amizade.

Aos amigos de Mestrado em Endodontia, **Daniel, Douglas, Helena, Iadasa, Morgana, Nilton e Rogério**, pela amizade, companheirismo e colaboração.

Aos amigos de pós-graduação **Cícero Gadê Neto, Érica Pinheiro, Ezilmara Rolim, Ronaldo Rodrigues, Flaviana Ferreira e Eduardo Gurgel** pelo convívio e pelo auxílio na solução de algumas dificuldades.

Aos amigos de moradia, **Giovani, Rogério e Wagner**, os quais dividi as dificuldades do dia-a-dia recebendo sempre palavras de conforto e uma amizade inestimável.

Aos funcionários da Disciplina de Endodontia **Adailton dos Santos Lima, Denize Lumena de Pinho, Maria Aparecida Buscariol e Rubens Marques Payão**, pela amizade e pelo auxílio recebido para realização deste trabalho.

Aos estagiários do laboratório de Microbiologia da área de Endodontia, **Neyla, Patrick, Fernanda, Débora, Danila e Maraisa** pela convivência e amizade.

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

SUMÁRIO

CAPÍTULO		Página
	LISTAS	1
	I. Tabelas	2
	II. Figuras	3
	III. Gráficos	4
	RESUMO	6
	ABSTRACT	8
1.	**INTRODUÇÃO**	10
2.	**REVISÃO DA LITERATURA**	14
2.1	Microbiota dos canais radiculares infectados	14
2.2	Propriedades físico-químicas das soluções irrigadoras	19
3.	**PROPOSIÇÃO**	33
4.	**MATERIAIS E MÉTODOS**	35
4.1	Materiais	35
4.1.1	Dentes	35
4.1.2	Microrganismo	35
4.1.3	Meios de cultura	35
4.1.4	Irrigantes testados	35
4.1.5	Soluções neutralizadoras	36
4.2	Métodos	36
4.2.1	Seleção dos dentes	36
4.2.2	Preparo dos dentes	36
4.2.3	Tratamento da dentina para remoção da smear layer	37
4.2.4	Divisão dos espécimes em grupos	39
4.2.5	Esterilização dos espécimes	39
4.2.6	Contaminação *in vitro* dos espécimes com *Enterococcus faecalis*	40

CAPÍTULO **Página**

4.2.7	Ação antibacteriana dos irrigantes endodônticos no interior dos canais radiculares infectados *in vitro*	43
4.2.7.1	Inicial	43
4.2.7.2	Tratamento	45
4.2.7.3	Coleta final	46
4.2.7.4	Diluição e plaqueamento das coletas	46
4.2.7.5	Análise Estatística	48
5.	**RESULTADOS**	50
5.1	Resultados da Coleta Inicial	51
5.2	Redução de *E. faecalis* após o preparo químico mecânico	53
5.3	Contagem de UFC 7 dias após o preparo químico-mecânico	55
6.	**DISCUSSÃO**	58
7.	**CONCLUSÃO**	66
8.	**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**	68
	ANEXOS	82
	Anexo I – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa	83
	Anexo II – Contagem de UFC nos tempos estudados e as porcentagens relativas	84

LISTAS

I - LISTA DAS TABELAS

Página

Tabela 1- Distribuição dos espécimes (n) por grupo de acordo com as substâncias irrigadoras testadas..... 39

Tabela 2- Comparação entre os grupos da contagem de UFC da coleta inicial..... 52

Tabela 3- Comparação do efeito antimicrobiano da coleta pós-tratamento..... 54

Tabela 4- Comparação do efeito antimicrobiano da coleta final..... 56

II - LISTA DAS FIGURAS

Página

Figura 1- Superfície dentinária após tratamento com NaOCl 5,25% + EDTA 17% totalmente livre de *smear layer* (1500X)..... 38

Figura 2- **Infecção *in vitro* dos espécimes** - A – *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); B – Suspensão microbiana; C – Agitação mecânica; D – Concentração 1,0 escala Mc Farland; E – Contaminação dos espécimes; F - Incubação 41

Figura 3- **Identificação do *Enterococcus faecalis*** - A – Morfologia microscópica; B – Teste da catalase; C – Kit de identificação api 20 Strep..... 42

Figura 4- *Enterococcus faecalis* na superfície dentinária e no interior dos túbulos dentinários após período de 7 dias de contaminação *in vitro*..... 43

Figura 5- **Contagem microbiológica** - A – Dentes dispostos na plataforma metálica; B – Irrigação; C – Coleta do canal radicular; E – Transporte para BHI..... 44

Figura 6-. **Incubação dos espécimes** - A e B – Armazenagem do espécime..... 46

Figura 7- **Contagem de UFC de *E. faecalis*** - A – Diluição; B – Agitador; C – D – E – Plaqueamento; F – UFC..... 47

III - LISTA DOS GRÁFICOS

Página

Gráfico 1- Médias das contagens de UFC de *Enterococcus faecalis* da coleta inicial..... 51

Gráfico 2- Médias das porcentagens de UFC de *Enterococcus faecalis* da contagem pós-tratamento em relação à contagem inicial..... 53

Gráfico 3- Médias das porcentagens de UFC de *Enterococcus faecalis* da contagem final em relação à contagem inicial..... 55

RESUMO

Resumo

O desenvolvimento e manutenção das alterações pulpares e periapicais ocorrem devido a presença de microrganismos no interior do sistema de canais radiculares. Sabendo que as células de defesa do hospedeiro não atingem as bactérias que se estabelecem no sistema de canais radiculares, o combate das infecções endodônticas é realizado com procedimentos mecânicos auxiliados por substâncias químicas. Sendo assim, muita atenção tem sido dada às propriedades químicas das soluções irrigadoras, visando o controle da infecção e compatibilidade aos tecidos periapicais. Portanto, este trabalho teve como proposta avaliar e comparar *in vitro* a atividade antibacteriana da clorexidina gel 2% frente a *Enterococcus faecalis* em relação a outros irrigantes (clorexidina líquida 2% e hipoclorito de sódio 5,25%). Para tal avaliação, 80 raízes de pré-molares inferiores humanos foram preparadas através de instrumentação seriada, autoclavadas e contaminadas por um período de 7 dias com monoculturas de *Enterococcus faecalis* . Em seguida, os dentes foram divididos em 5 grupos e submetidos a preparo químico-mecânico padronizado, variando-se apenas o meio químico auxiliar. Para se avaliar o potencial antimicrobiano das substâncias químicas auxiliares, foram realizadas 3 coletas bacteriológicas: inicial (coleta antes do preparo químico-mecânico); pós-tratamento (imediatamente após o preparo químico-mecânico) e final (7 dias após o preparo químico-mecânico). Obtidas as coletas, estas foram cultivadas a fim de se determinar a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os resultados foram analisados estatisticamente através do programa BioEstat 2.0. O gluconato de clorexidina 2,0%, tanto na forma gel quanto líquida, promoveu uma redução significante nas coletas imediata e final. Já o hipoclorito de sódio 5,25% apenas reduziu UFC na coleta imediata, constatando crescimento bacteriano na coleta final. Conclui-se que, dentre os meios químicos auxiliares testados como irrigante endodôntico, o potencial antimicrobiano do gluconato de clorexidina 2%, gel e líquida, foi mais efetivo que o NaOCl 5,25%, em manter baixas as contagens de *Enterococcus faecalis* na coleta microbiológica final.

Palavras-chaves: clorexidina gel e líquida, hipoclorito de sódio e *E. faecalis.*

ABSTRACT

Abstract

The initiation and perpetuation of pulpal and periapical disease occur due to the presence of bacteria and their degradatory by products in the root canal. The host defense cells are unable to reach bacteria harbored in the root canal system thus, the root canal therapy must be performed combining mechanical procedures and chemical substances. For that reason, much attention has been focused on the chemical properties of the endodontic irrigants, seeking the infection control and the biocompatibility to the periapical tissues. Therefore, the aim of the present study was to assess *in vitro* the antibacterial activity of the 2% chlorhexidine gel against *E. faecalis* comparing to other endodontic irrigants (2% chlorhexidine liquid and 5.25% sodium hypochlorite). For this evaluation, 80 roots of human mandibular premolars were prepared by the serial instrumentation technique, autoclaved and contaminated for 7 days with *E. faecalis* monocultures. The roots were then divided into 5 groups according to the irrigant substance used during the standardized biomechanical preparation. In order to evaluate the antimicrobial action of the irrigants substances, 3 microbial samples were taken: pretreatment (before the biochemical preparation); post treatment (immediately after the biochemical preparation) and final (7 days after the biochemical preparation). The microbiological samples were plated to count the Colony-Forming Units (CFU). Data were statistically analyzed by the program BioEstat 2.0. The 2% chlorhexidine gel and 2% chlorhexidine liquid reduced significantly the *E. faecalis* CFU in the post treatment and final microbiological samples. On the other hand, the 5.25% sodium hypochlorite also reduced the *E. faecalis* CFU in the post treatment however, bacterial growth were detected in the final sample. It was concluded that, among the substances assessed, the 2% chlorhexidine gluconate, gel and liquid, antimicrobial ability was more effective than the 5.25% NaOCl in keep low CFU of E. faecalis after 7 days.

Key words: chlorhexidine gel and liquid, sodium hypochlorite and *Enterococcus faecalis.*

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A presença de microrganismos na estrutura dentária foi evidenciada primeiramente por MILLER (1894), o qual examinando microscopicamente esfregaços obtidos de canais radiculares com polpas necrosadas, atestou uma ampla variedade de morfotipos bacterianos. Pôde também afirmar que a câmara pulpar dos dentes abertos ao meio bucal contém bactérias, as quais diferem daquelas localizadas mais apicalmente no canal radicular.

À partir de então, inúmeras investigações (KAKEHASHI *et al.*,1965; WITTGOW *et al.*, 1975; WALTON *et al.*, 1992; TANI-ISHI *et al.*, 1994) correlacionaram a invasão microbiana na cavidade pulpar com as alterações inflamatórias da polpa dentária que podem levar à necrose pulpar. Com a presença do conteúdo tóxico-séptico intracanal, a infecção tende a se propagar em direção ao ápice dental promovendo, se não controlada, o desenvolvimento de reações periapicais (KAKEHASHI *et al.*, 1965; TANI-ISHI *et al.*, 1994).

Com intuito de eliminar as bactérias, subprodutos bacterianos e substratos orgânicos, surgiram inúmeras técnicas de tratamento dos canais radiculares, que utilizam métodos químico-mecânicos.

WALKER em 1936, introduziu na Endodontia a solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), em diferentes concentrações, como solução irrigadora, uma vez que, além de possuir propriedades clareadoras e de dissolução dos tecidos

(GORDON *et al.*, 1981), tem-se mostrado efetivo como agente desinfetante (BLOOMFIELD & MILES, 1979).

No entanto, algumas desvantagens são atribuídas ao uso do NaOCl quando utilizado em altas concentrações durante o tratamento dos canais radiculares, como seu efeito oxidativo nos tecidos vitais da região periapical e, a reação inflamatória desencadeada (BECKING, 1991).

Ademais, a capacidade de o NaOCl remover a *smear layer* tem se mostrado deficiente (BERG *et al.*, 1986; BAUMGARTNER & MADER, 1987; FERRAZ *et al*, 2001), necessitando então, do uso de um agente quelante, como o EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetracético) (WHITE *et al.*, 1984).

Estudos têm avaliado o uso do gluconato de clorexidina líquida na Endodontia, tanto como solução irrigadora quanto medicação intracanal (DELANY *et al.*, 1982; RINGEL *et al.*, 1982; JEANSONNE & WHITE , 1994), devido suas propriedades de inibir o crescimento de bactérias comumente encontradas nas infecções endodônticas (CERVONE *et al.*, 1990), efeito residual (WHITE *et al.*, 1997), e biocompatibilidade (OHARA *et al.*, 1993; JEANSONNE & WHITE, 1994; TANOMARU FILHO *et al.* 2002).

A clorexidina na forma de gel já foi estudada, na Endodontia, como medicação intracanal (SIQUEIRA & UZEDA, 1997), apresentando bons resultados. Já FERRAZ, em 1999, avaliou a clorexidina gel como irrigante

endodôntico, demonstrando maior número de culturas microbiológicas negativas, após instrumentação endodôntica *in vitro*, e maior remoção da *smear layer*, quando comparada com a clorexidina líquida 2% e o NaOCl 5,25%.

Consciente de que os procedimentos endodônticos devam estar orientados para o controle da infecção e o respeito à biologia dos tecidos periapicais, substâncias biocompatíveis e com potente ação antimicrobiana, como a clorexidina gel 2%, devem ser mais profundamente pesquisadas como irrigante endodôntico.

REVISÃO DA LITERATURA

2. Revisão da literatura

2.1 Microbiota dos canais radiculares infectados

A Endodontia, embora empiricamente, já vinha sendo praticada desde o século I, tendo como único objetivo imediato o alivio da dor. Desta forma, por muitos anos o tratamento endodôntico restringiu-se apenas a trocas sucessivas e intermináveis de medicação intracanal sem a preocupação com a limpeza do canal radicular (KUTTLER, 1961).

Somente em 1878, PASTEUR definiu que as infecções eram causadas por germes específicos a cada tipo de doença. Na odontologia ROGERS (1878) relatou que os microrganismos eram os principais causadores dos problemas endodônticos e, em 1894, MILLER, através de análise bacteriológica de esfregaços obtidos de canais com polpas necróticas, evidenciou a presença de bactérias.

Contudo, somente em 1965, KAKEHASHI *et al.* associaram a presença destes microrganismos com o desenvolvimento e perpetuação das alterações pulpares e periapicais. Os autores utilizando ratos convencionais e *germ-free* promoveram a exposição das polpas dentais ao meio bucal. Desta forma, concluíram que nos animais convencionais ocorreu o desenvolvimento de inflamação crônica ou necrose pulpar, sempre associada a lesões perirradiculares. Já nos ratos *germ-free* a resposta pulpar foi caracterizada pela

presença mínima de inflamação e por deposição de dentina neoformada na área exposta, ou seja, uma excelente capacidade reparadora da polpa na ausência de infecção.

No entanto, mesmo estabelecendo-se esta correlação entre a etiologia e a presença de microrganismos, o desconhecimento das técnicas avançadas de anaerobiose somente permitia o isolamento, predominantemente, de bactérias anaeróbias facultativas do grupo dos estreptococos, enterococos, micrococos, difteróides, estafilococos, lactobacilos, bactérias entéricas a partir de canais radiculares com polpas necrosadas (MORSE, 1987; GOMES, 1995).

À partir da década de 70, o desenvolvimento das técnicas de transporte, isolamento e cultivo de anaeróbios estritos possibilitou que SUNDQVIST(1976) avaliasse as condições bacteriológicas de 32 canais de dentes unirradiculares com coroas hígidas e com polpas necrosadas em decorrência de trauma dentário, e constatasse que mais de 90% das cepas bacterianas isoladas eram anaeróbias estritas, confirmando o importante papel destas bactérias e seus produtos na origem e perpetuação das doenças pulpares e periapicais.

MÖLLER *et al.* (1981) ao induzir a necrose pulpar em dentes de macacos, de forma asséptica em um grupo de dentes e, em outro grupo através da exposição pulpar à microbiota oral, também verificaram que lesões perirradiculares se desenvolveram apenas nos casos de polpas infectadas.

Estes achados de SUNDQVIST (1976) e MÖLLER *et al.* (1981) foram confirmados por BYSTRÖM & SUNDQVIST (1983); BAUMGARTNER & FALKLER (1991); SUNDQVIST (1992a); GOMES *et al.* (1994a,b; 1996a,b) pela constatação da prevalência de bactérias anaeróbias estritas nos canais radiculares infectados.

Estudos vêm indicando que certas espécies bacterianas anaeróbias estritas estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento de alguns sinais e sintomas clínicos de origem endodôntica (YOSHIDA *et al.*, 1987; GOMES *et al.*, 1994a, 1996a,b).

GROSSMAN (1981), ao afirmar que bactérias anaeróbias estritas uma vez em contato com o ar, instrumentos e agentes químicos utilizados durante a terapia endodôntica seriam destruídas, questionou, o significado dos anaeróbios estritos no tratamento endodôntico. No entanto, o papel das bactérias anaeróbias estritas, principalmente as Gram-negativas, no desenvolvimento das doenças pulpares e periapicais é evidente, pois enquanto alguns anaeróbios estritos são rapidamente destruídos à exposição do ar atmosférico, outros podem apenas cessar o crescimento até que as condições anaeróbias sejam restauradas (GOMES *et al.*, 1996c).

Ademais, já está bem definido na literatura endodôntica que as infecções por aneróbios estritos ocorrem na presença de tecido necrótico, suprimento sanguíneo tecidual comprometido ou após infecção por aeróbios e anaeróbio facultativos capazes de diminuir o potencial de oxirredução nos tecidos

e promover interações positivas e antagônicas entre as bactérias (BERGENHOLTZ & CRAWFORD, 1989; MARSH & MARTIN, 1992; SUNDQVIST, 1992a; SUNDQVIST, 1994; GOMES *et al.* 1994a,b; 1996a,b).

Desta forma, algumas espécies aeróbias ou anaeróbias facultativas estão associadas à infecções persistentes do canal radicular podendo comprometer o sucesso da terapia endodôntica. Dentre estas destacam-se os *Streptococcus sp.,* o *Enterococcus faecalis, Pseudomona aeroginosa* e *Candida sp.* (ENGSTRÖM & FROSTELL, 1964; RANTA *et al.,* 1988; SUNDQVIST *et al.,* 1998).

O *Enterococcus faecalis* tem sido um dos poucos microrganismos anaeróbios facultativos associados à periodontite apical persistente (ENGSTRÖM & FROSTELL, 1964; HAAPASALO *et al.,* 1983), aos casos de *flare-up* (MATUSOW, 1995), às infecções secundárias e aos casos de retratamento com lesões perirradiculares refratárias (SUNDQVIST *et al.,* 1998). À propósito, SUNDQVIST (1992a), enfatizou que os *Enterococcus faecalis* são capazes de causar e manter infecções de difícil tratamento porque são microrganismos resistentes a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos.

MOLANDER *et al.* (1998) examinaram microbiologicamente 100 dentes tratados endodonticamente com lesões perirradiculares. Os microrganismos anaeróbios facultativos corresponderam a 68% das cepas bacterianas isoladas,

das quais 32% foram *Enterococcus faecalis*, sugerindo fortemente que este microrganismo exerce um papel importante nas falhas endodônticas.

Da mesma forma, SUNDQVIST *et al.* (1998) avaliaram 54 dentes tratados endodonticamente, assintomáticos, porém com evidência radiográfica de lesões periapicais. Constataram a presença microbiana em 24 dentes, dos quais em 38% foram isolados *Enterococcus faecalis.*

Com isso, a presença do *Enterococcus faecalis* nas infecções endodônticas determina um sério problema terapêutico, uma vez que, este apresenta um potencial patogênico conhecido para causar e manter infecções de difícil tratamento (HAAPASALO *et al.*, 1983), tolera alto pH variando entre 9,0 e 11,5 (FISHER & HUERTA, 1984; BYSTRÖM & SUNDQVIST., 1985; SPERANÇA *et al.*, 1989; FOREMAN & BARNES, 1990) e podem sobreviver no interior dos túbulos dentinários por ser resistente a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos (SUNDQVIST, 1992b; SIREN *et al.*, 1997) voltando a recolonizar o espaço do canal radicular.

Portanto, é reconhecido o papel dos microrganismos como uma das causas determinantes do insucesso da terapêutica endodôntica (SJÖGREN *et al.*, 1990; SJÖGREN *et al.*, 1997). Por isso, a eliminação ou a máxima redução dos microrganismos e de seus subprodutos e a prevenção da reinfecção do sistema de canais radiculares têm sido os principais objetivos da prática endodôntica moderna.

2.2 Propriedades físico-químicas das soluções irrigadoras

Tendo em vista a intima relação entre a Microbiologia e a Endodontia, ou seja, o envolvimento direto dos microrganismos nas doenças pulpares e nos tecidos periapicais, é essencial que se compreenda a Microbiologia para se entender as fases do preparo químico-mecânico e da obturação dos canais radiculares (WEINE, 1989), uma vez que, a terapia endodôntica é essencialmente um procedimento de desinfecção.

O melhor e mais seguro método para se descontaminar o canal radicular é a criteriosa limpeza do conteúdo séptico-necrótico (SHILDER, 1974), pois, ali, os microrganismos não podem ser alcançados pelas células de defesa do hospedeiro (TAKAHASHI, 1989). Sendo assim, as infecções endodônticas devem ser tratadas principalmente por procedimentos mecânicos auxiliados por substâncias químicas, buscando-se romper o equilíbrio do ecossistema microbiano, visando promover a desinfecção do sistema de canais radiculares (SELTZER *et al.*, 1963; BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1981).

Sabe-se, no entanto, que a ação mecânica dos instrumentos, mesmo associada a substâncias químicas com reconhecida ação antimicrobiana, não é capaz de eliminar todos os microrganismos presentes nos canais radiculares infectados, devido a incapacidade de se atingir a intimidade dos túbulos dentinários e complexidades anatômicas dos canais radiculares tais como, istmos, canais laterais, delta apicais e cemento apical, onde, provavelmente, estão

alojadas as bactérias sobreviventes ao preparo do canal (SELTZER *et al.*, 1963; BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1981). Desta forma, se os microrganismos persistentes sobrevivem em número suficiente e na presença de nutrientes capazes de favorecer o seu crescimento, estes, poderão multiplicar-se e restabelecer a contaminação clínica do espaço pulpar (BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1985; BERGENHOLTZ & CROWFORD, 1989; ANDO & HOSHINO, 1990).

No entanto, é importante ressaltar a necessidade da utilização de soluções irrigadoras com o intuito de se promover uma significativa redução dos depósitos bacterianos nos canais radiculares, uma vez que, auxiliarão na lubrificação do canal radicular durante a ação de corte dos instrumentos, na remoção da *smear layer*, na desinfecção, dissolução do exudato, dissolução do tecido pulpar necrosado e pré-dentina (SPANGBERG, 1982).

Várias soluções irrigadoras têm sido utilizadas com este propósito, dentre elas destacam-se o hipoclorito de sódio (NaOCl), solução fisiológica, EDTA, ácido cítrico, gluconato de clorexidina, solução de acetato de bis-dequalenio (Salvizol) dentre outras. No entanto, um irrigante que reúna todas as propriedades postuladas por SPANGBERG, 1982, ainda não foi encontrado.

Segundo INGLE *et al.*, em 1985, a eficiência de uma solução irrigadora não depende apenas de sua natureza química, mas também de sua quantidade, temperatura, tempo de contato, profundidade de penetração da agulha irrigadora, calibre da agulha, tensão superficial do irrigante e tempo de fabricação da solução.

Dentre as substâncias já citadas, o hipoclorito de sódio (NaOCl), em diferentes concentrações, têm sido amplamente utilizado como irrigante desde sua introdução na Endodontia por WALKER, em 1936, pois possue propriedades clareadoras, dissolução de tecidos (GORDOM *et al.*, 1981), e ainda, tem se mostrado efetivo com agente desinfetante (BLOOMFIELD & MILES, 1979).

O efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio a 0,5%, como solução irrigadora de canais radiculares, foi avaliada por BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1983. O preparo biomecânico foi realizado em 30 dentes unirradiculares, apresentando coroa intacta, necrose pulpar e lesão periapical. Todas as amostras bacteriológicas iniciais colhidas dos canais radiculares evidenciaram crescimento bacteriano, sendo isoladas 169 espécies bacterianas, com 80% de incidência de anaeróbios. Na maioria das culturas houve mais de uma espécie por amostra, com média de 4 espécies por canal radicular, sendo *Fusobacterium, Eubacterium, Peptostreptococcus e Bacteroides* os gêneros mais freqüentemente isolados. Foi realizado um total de 4 preparos biomecânicos, com intervalos de 2 a 4 dias, obtendo-se em cada sessão a colheita bacteriológica. Após o tempo preestabelecido, foram feitos testes bacteriológicos dos canais. Os resultados evidenciaram culturas negativas em 12 dos 15 espécimes tratados com hipoclorito de sódio a 0,5% e 8 dos 15 tratados com soro fisiológico. Os resultados sugerem melhor efetividade da solução de hipoclorito de sódio a 0,5% como irrigante de canais em comparação ao soro fisiológico.

Também SHIH *et al.*, em 1970, avaliaram *in vitro* a ação bactericida da solução de hipoclorito de sódio a 5,25% empregando teste de diluição. Observaram que a solução de hipoclorito de sódio é um potente bactericida e que promoveu a desinfecção em 100% dos canais radiculares inoculados com "*Streptococcus faecalis*" e *Staphylococcus aureus*. Porém, culturas realizadas dois a sete dias após o preparo biomecânico revelaram elevado índice de contaminação dos canais radiculares. Concluíram que o hipoclorito de sódio a 5,25% é altamente bactericida, no entanto, não permite a esterilização completa do sistema de canais radiculares.

Da mesma forma SJÖGREN & SUNDQVIST, em 1987, avaliaram *in vivo* a ação antibacteriana após a realização do preparo biomecânico em 31 dentes unirradiculares, portadores de necrose pulpar intacta e lesão periapical visível radiograficamente. O sistema de instrumentação ultra-sônico foi empregado usando a solução de hipoclorito de sódio a 0,5% como solução irrigadora. Culturas bacteriológicas, em anaerobiose, foram realizadas decorridos sete dias da primeira e segunda sessões, apresentando 29% e 22,5% de culturas bacteriológicas positivas, respectivamente.

Outros estudos (CVECK, 1972; SPANGBERG *et al.*, 1973; SIMÕES *et al.*, 1989), também constataram o efeito antibacteriano do hipoclorito de sódio e, ainda seu grande potencial de dissolução tecidual (GROSSMAN & MEIMAN, 1941; THÉ *et al.*, 1979; GORDON *et al.*, 1981), sendo este, diretamente proporcional à sua concentração (HAND *et al.*, 1978).

Também RAPHAEL *et al*, em 1981, realizaram estudo *in vitro* da eficiência antibacteriana da solução de hipoclorito de sódio a 5,25%, empregada em diferentes temperaturas. Foram utilizados dentes humanos extraídos, os quais foram esterelizados e tiveram os canais radiculares instrumentados e inoculados com *"Streptococcus faecalis", Staphilococcus aureus* ou *Pseudomonas aeroginosa.* Os canais radiculares foram irrigados com solução de hipoclorito de sódio nas temperaturas de 21°C até 31°C ou com solução salina a 0,9%, usada como controle. Os resultados obtidos demonstraram que não há relação direta entre a temperatura da solução de hipoclorito de sódio e sua ação antimicrobiana, uma vez que, o aumento de temperatura não proporcionou diferença quanto ao número de culturas negativas.

O hipoclorito de sódio também foi estudado (BUTLLER & CRAWFORD, 1982) na detoxificação de duas endotoxinas provenientes da *Escherichia coli* e da *Salmonella typhosa.* A avaliação foi realizada após o contato por uma hora a temperatura ambiente, das soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações 0,58%, 2,7% e 5,2% com as endotoxinas. Os resultados revelaram que todas as concentrações foram efetivas na completa detoxificação das endotoxinas estudadas (na concentração de 100ng/*mL* de solução).

Segundo BAUMGARTNER & IBAY, em 1987, as propriedades solvente e antimicrobiana da solução de hipoclorito de sódio ocorrem, primariamente, devido à capacidade de oxidação e hidrólise de proteínas celulares, liberação de

cloro fornecido pelo ácido hipocloroso e, em parte, à sua ação osmótica, retirando líquido da célula (plasmólise).

No entanto, várias complicações têm sido relatadas com o uso do hipoclorito de sódio durante o tratamento de canais radiculares. A literatura contém vários casos de injeções acidentais deste irrigante em tecido periapical (KAUFMAN & KEILA, 1989; SABALA & POWELL, 1989; BECKING, 1991). Pelo fato do hipoclorito de sódio ser agressivo aos tecidos, tais acidentes são de relevância clínica por poderem gerar dor severa, rápido desenvolvimento de edema, hematoma, necrose e abscessos. Estes danos são causados devido ao efeito oxidativo do hipoclorito de sódio nos tecidos vitais da região periapical e pela reação inflamatória desencadeada (BECKING, 1991).

PASHLEY *et al.*, em 1985, avaliaram a citotoxidade de várias diluições da solução de hipoclorito de sódio, empregando três modelos de testes biológicos. Em estudo *in vitro*, foram adicionados 10 mL de solução salina isotônica, água destilada ou diferentes concentrações de Clorox® em solução salina a 50μL de suspensões de eritrócitos mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos. Os tubos foram então centrifugados por 10 minutos e porções do sobrenadante analisadas quanto à proteína total pelo método de Lowry. Foram realizados também, estudos *in vivo* por meio do teste de contato com olho de coelho e injeção subcutânea em ratos. Os resultados demonstraram que mesmo em diluições 1:1000 ocorreu completa hemólise de eritrócitos no teste de

citotoxicidade. As soluções não diluída ou diluída na proporção 1:10 promoveram irritação moderada a severa em olhos de coelhos, com resolução após 24 a 48 horas. As injeções subcutâneas das soluções não diluída, 1:1, 1:2 e 1:4 levaram a ulcerações de pele nos animais. Desta forma, concluíram que, embora a solução de hipoclorito de sódio a 5% seja altamente efetiva durante o preparo biomecânico e clinicamente aceitável, ela deve ser usada com cautela para prevenir que a mesma alcance o periápice desencadeando severas reações inflamatórias.

Além disso, a capacidade de remoção de *smear layer* do hipoclorito de sódio tem se mostrado deficiente, uma vez que, durante o após a instrumentação endodôntica, tem ação apenas sobre a camada mais superficial da *smear layer* (BERG *et al.*, 1986; BAUMGARTNER & MADER, 1987). A remoção de tecido orgânico e da *smear layer* tem sido obtida satisfatoriamente com o uso do hipoclorito de sódio alternado com um agente quelante, como o EDTA (WHITE *et al.*, 1984; BAUMGARTNER & MADER, 1987; CENGIZ *et al.*, 1990).

O EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetracético) é o agente quelante mais comum, e reage com íons cálcio da dentina, formando quelatos solúveis de cálcio. Tem capacidade de descalcificar 20 a 30 μm de dentina, em 5 minutos, porém seu efeito quelante no terço apical dos canais radiculares é deficiente (FEHR & NYGAARD-OSTBY, 1963; FRASER, 1974), já tendo sido sugerido a adição de soluções tenso-ativas, como o brometo de amônio quaternário, ao EDTA com a finalidade de reduzir sua tensão superficial e aumentar a penetrabilidade (FEHR &

NYGARD-OSTBY, 1963). Estas combinações são eficientes na remoção da *smear layer*, no entanto, a limpeza do terço apical dos canais ainda é comprometida (McCOMB & SMITH, 1975).

Tendo em vista algumas desvantagens da utilização do hipoclorito de sódio, o gluconato de clorexidina, utilizado na Periodontia devido sua ampla ação antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (UNSAL *et al.*, 1994), passou a ser estudado na Endodontia. A ação antibacteriana da clorexidina se dá pela ligação de suas moléculas catiônicas às paredes celulares das bactérias que são carregadas negativamente. Em altas concentrações seu efeito é bactericida, pois age rompendo a parede celular, interferindo no mecanismo de transporte e secundariamente na coagulação do citoplasma pela alta afinidade a proteínas. Em baixas concentrações apresenta ação bacteriostática, inibindo as funções da membrana, sendo seu efeito mantido por várias horas depois da aplicação, devido sua excelente substantividade, ou seja, efeito residual (HUGO & LONGWORTH, 1964 e 1965; RÖLLA *et al.*, 1970; RÖLLA & MELSEN, 1975; GREENSTEIN *et al.*, 1986).

A clorexidina passou a ser usada na Endodontia, como solução irrigadora e medicação intracanal (DELANY *et al.*, 1982; RINGEL *et al.*, 1982; JEANSONNE & WHITE, 1994). Sua ação como irrigante endodôntico tem se mostrado interessante devido sua propriedade de inibir o crescimento de bactérias comumente encontradas nas infecções endodônticas (CERVONE *et al.*, 1990; FERRAZ *et al.*, 2001), possuir efeito residual (WHITE *et al.*, 1997;

KOMOROWSKY *et al.*, 2000), e biocompatibilidade (OHARA *et al.*, 1993; JEANSONNE & WHITE, 1994; TANOMARU FILHO *et al.*, 2002).

HELING *et al*, em 1992, avaliaram o efeito da solução de clorexidina como medicação intracanal, por meio de estudo *in vitro* utilizando cilindros de dentina bovina inoculadas com *"Streptococcus faecalis"*. Os medicamentos testados foram a solução de gluconato de clorexidina a 0,2%, gluconato de clorexidina num dispositivo de liberação controlada (1,2mg) e paramonoclorofenol canforado. O grupo controle não se utilizou medicação. Através de análise em espectrofotômetro, os grupos experimentais obtiveram melhores resultados antimicrobianos que o grupo contole.

No mesmo ano, a atividade antimicrobiana da solução de clorexidina foi comparada com o hidróxido de cálcio utilizando-se dentina radicular bovina inoculada com *"Streptococcus faecalis"*. Os resultados demonstraram que a solução de clorexidina reduziu significantemente a contaminação. O hidróxido de cálcio não apresentou esta capacidade nos períodos testados, de até 7 dias (HELING *et al*, 1992).

VAHDATY *et al.*, em 1993, avaliaram *in vitro* as soluções de clorexidina 0,2% e 2%, de hipoclorito de sódio a 0,2% e 2%, e o soro fisiológico com relação à eficiência na desinfecção de túbulos dentinários. Raízes de incisivos bovinos extraídos foram preparadas, autoclavadas e infectadas com *"Streptococcus faecalis"*. Os canais radiculares foram irrigados com 20 mL de uma das soluções

irrigadoras e, amostras de dentina foram removidas nas profundidades de 100, 100-300 e 300-500 μm, para análise da presença e quantificação dos microrganismos remanescentes. Os resultados demonstraram que as soluções de clorexidina e de hipoclorito de sódio apresentaram efetividade semelhantes nas mesmas concentrações contra o microrganismo em estudo.

JUNG *et al.*, em 1999, conduziram estudo para avaliação da eficiência da solução de clorexidina na prevenção de reinfecção coronária dos tratamentos endodônticos. Foram utilizados canais de dentes bovinos, instrumentados, autoclavados e imersos em clorexidina, solução de hipoclorito de sódio ou solução salina, por 5 minutos, antes de serem obturados. As raízes foram montadas de tal forma que na porção coronária pudesse ser colocada em contato com o inóculo bacteriano e o ápice radicular ficasse imerso em meio de cultura. A turbidez do meio foi observada em 80% dos espécimes tratados com solução salina e 70% com solução de hipoclorito de sódio após 24 horas. O tratamento com solução de clorexidina apresentou a turbidez após o mesmo período em apenas 20% dos espécimes, demonstrando maior eficiência na prevenção da infiltração bacteriana.

Da mesma forma LEONARDO *et al.*, em 1999, ao avaliar em *in vivo* atividade antimicrobiana da solução de clorexidina a 2%, demonstraram uma redução de 100% de *S. mutans* imediatamente após a instrumentação e, 77,78% de redução numa coleta realizada após 48 horas.

Este efeito residual do gluconato de clorexidina já havia sido demonstrado por WHITE *et al*, em 1997. Os autores realizaram o preparo biomecânico em dentes extraídos empregando-se as soluções de clorexidina a 2% e 0,12%, sendo os canais radiculares, posteriormente, preenchidos com água destilada. Foram realizadas coletas microbiológicas do canal radicular, com cones de papel absorvente, em diferentes períodos de tempo (6, 12, 24, 48 e 72 horas) após o tratamento. A solução de clorexidina a 2% apresentou atividade antimicrobiana em todos os dentes no período de 72 horas, enquanto que, na concentração 0,12%, na maioria dos dente a atividade antimicrobiana foi constatada nos períodos de 6 a 24 horas. Os resultados constataram que a clorexidina apresenta substantividade quando utilizada como irrigante endodôntico.

Muita atenção tem sido dada às propriedades químicas, porém pouco tem se estudado com a finalidade de melhorar a ação mecânica das soluções irrigadoras. As substâncias para limpeza do sistema dos canais radiculares durante o preparo químico-mecânico normalmente são utilizadas na forma de solução. STEWART *et al.*, em 1961, sugeriram a utilização de um irrigante endodôntico viscoso com base de glicerina anídrica, que mostrou ter boa ação lubrificante além de aumentar a capacidade antimicrobiana do peróxido de uréia. Porém, desde então, poucos trabalhos foram realizados dando ênfase à forma de apresentação dos irrigantes endodônticos.

O gel de clorexidina tem mostrado bons resultados em Odontologia no controle de cárie dental devido sua ação na redução de *Streptococcus mutans* e espécies de *Lactobacillus* (EPSTEIN *et al.*, 1991; CLARCK *et al.*, 1991; BONDESTAM *et al.*, 1996). Quando aplicado subgengivalmente, demonstra eficiência no auxílio do tratamento periodontal, embora não substitua o tratamento convencional (OOSTERWAAL *et al.*, 1989; KELTJENS *et al.*, 1991).

Na Endodontia, a clorexidina gel foi estudada como medicação intracanal, apresentando bons resultados. Devido sua maior viscosidade, acredita-se que a clorexidina gel possa manter o princípio ativo mais tempo na região aplicada (SIQUEIRA & UZEDA, 1997).

Quando usada como irrigante endodôntico pode auxiliar na remoção dos debris da dentina e tecido necrótico criados pela instrumentação, além de possuir propriedades químicas semelhantes a clorexidina em solução e promover a lubrificação do mesmo durante o corte da dentina pelos instrumentos endodônticos. Além disso, a grande vantagem do gel de clorexidina é que a base gel utilizada, o Natrosol, tem pH entre 6,0-9,0 e é solúvel em água ou álcool (FERRAZ *et al.*, 2001).

FERRAZ, em 1999, realizou estudo avaliando as seguintes soluções irrigadoras: solução de clorexidina a 2%, clorexidina gel 2% e solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25%. Avaliou *in vitro* a ação antimicrobiana das substâncias em difusão em ágar, capacidade de remoção do

smear layer sob MEV e eliminação de *Enterococcus faecalis*. Os resultados demonstraram que a clorexidina gel apresentou maiores halos de inibição contra os microrganismos testados em difusão em ágar e, ainda, promoveu maior remoção da *smear layer* que as demais soluções testadas. O gel de clorexidina e a solução de hipoclorito de sódio a 5,25% promoveram culturas negativas mais rapidamente que os demais agentes irrigantes, quando em contato com o *Enterococcus faecalis*.

É certo que, comprovadamente, a clorexidina apresenta um amplo espectro antibacteriano, substantividade e relativa ausência de citotoxidade, no entanto, a mesma não apresenta algumas propriedades inerentes a solução de hipoclorito de sódio, tais como a capacidade de dissolução tecidual, que a torna substância de escolha para a irrigação dos canais radiculares (JEANSONNE & WHITE, 1994).

Claramente a terapia endodôntica é incapaz de remover todas as bactérias do sistema de canais radiculares, não somente pela complexidade anatômica do espaço pulpar que impede a sua total remoção mas também porque, alguns nutrientes capazes de favorecer o crescimento de organismos residuais irão, inevitavelmente, permanecer. Entretanto, alguns organismos persistentes poderão ser "compatíveis com o hospedeiro" e não causar reinfecção (GOMES *et al.*, 1996c).

PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi comparar o potencial antimicrobiano, imediato e mediato, do gluconato de clorexidina gel 2% com o gluconato de clorexidina líquida 2% e hipoclorito de sódio 5,25% na eliminação *in vitro* de *Enterococcus faecalis* em dentes humanos, previamente contaminados.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Dentes

➢ 80 Pré-molares inferiores humanos recém-extraídos e armazenados em solução fisiológica.

4.1.2 Microrganismo

➢ *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)

4.1.3 Meios de cultura

➢ Brain Heart Infusion Broth (BHI) – Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, Inglaterra

➢ Brain Heart Infusion Agar (BHIA) – Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, Inglaterra

4.1.4 Irrigantes testados

➢ Gluconato de clorexidina gel 2% (Endogel®, Essencial Farma, Itapetininga, Brasil)

➢ Gluconato de clorexidina líquida 2% (Essencial Farma, Itapetininga, Brasil)

➢ Hipoclorito de sódio 5,25% (Essencial Farma, Itapetininga, SP)

➢ Água destilada

➢ Gel de natrosol (Essencial Farma, Itapetininga, Brasil) – gel inerte (hidroxietilcelulose) não iônico e hidrossolúvel (MIYAMOTO *et al.*, 1989) usado

como veículo do Endogel®.

4.1.5 Soluções neutralizadoras

- Tiossulfato de sódio a 0,6% - para o hipoclorito de sódio
- Tween 80 a 0,5% (Sigma Chemical Com. – St Louis, USA) + Lecitina de soja a 0,07% (Proderma Farm. Manip. – Piracicaba, SP) – para a clorexidina, líquida e gel (GOMES *et al.*, 2001).

4.2 Métodos

4.2.1 Seleção dos dentes

Foram selecionados 80 pré-molares inferiores humanos, hígidos, com ápices completos, raízes retas (SCHNEIDER, 1971) e canais únicos, extraídos por problemas periodontais ou indicação ortodôntica. Sua utilização foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em humanos da Faculdade de Odontologia de Piracicaba –UNICAMP **(ANEXOI)**.

4.2.2 Preparo dos dentes

Os dentes foram cuidadosamente limpos com curetas periodontais para remoção do tecido periodontal ou ósseo, que poderiam estar aderidos à superfície radicular. As coroas dentais foram removidas com discos de carburundum (KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri, SP) ao nível da junção amelo-cementária, facilitando o acesso cervical.

Limas # 10 (Dentsply Maillefer – Baillaigues, Suiça) foram introduzidas no canal até que sua ponta ultrapassasse 1mm além do forame apical do dente, ficando visível. Posteriormente, recuou-se 2mm para se obter o comprimento real de trabalho (CRT). Os canais foram inicialmente preparados através de instrumentação seriada, utilizando limas tipo K (Dentsply Maillefer, Baillaigues - Suíça) para ampliação do espaço pulpar. Durante este preparo inicial, utilizou-se 1mL de água destilada estéril como irrigante, a cada troca de lima, sendo padronizada a lima K # 25 como lima de memória no CRT. Os dentes foram mantidos em gazes estéreis umedecidas durante a instrumentação para se evitar desidratação.

4.2.3 Tratamento da dentina para remoção da smear layer

A *smear layer* formada durante a instrumentação inicial foi removida **(FIG. 1)** lavando-se os espécimes por 10 minutos em EDTA 17%, seguido por mais 10 minutos em NaOCl 5,25%, sempre sob agitação (AGITADOR-AQUECEDOR FANEM, São Paulo, Brasil) (PEREZ *et al.*, 1993; FERRAZ, 1999). Para remoção de possíveis resíduos de EDTA e NaOCl, os espécimes foram então submetidos a nova lavagem com solução de fosfato tamponado por 10 minutos, seguida de água destilada por 1 hora (PEREZ *et al.*, 1993).

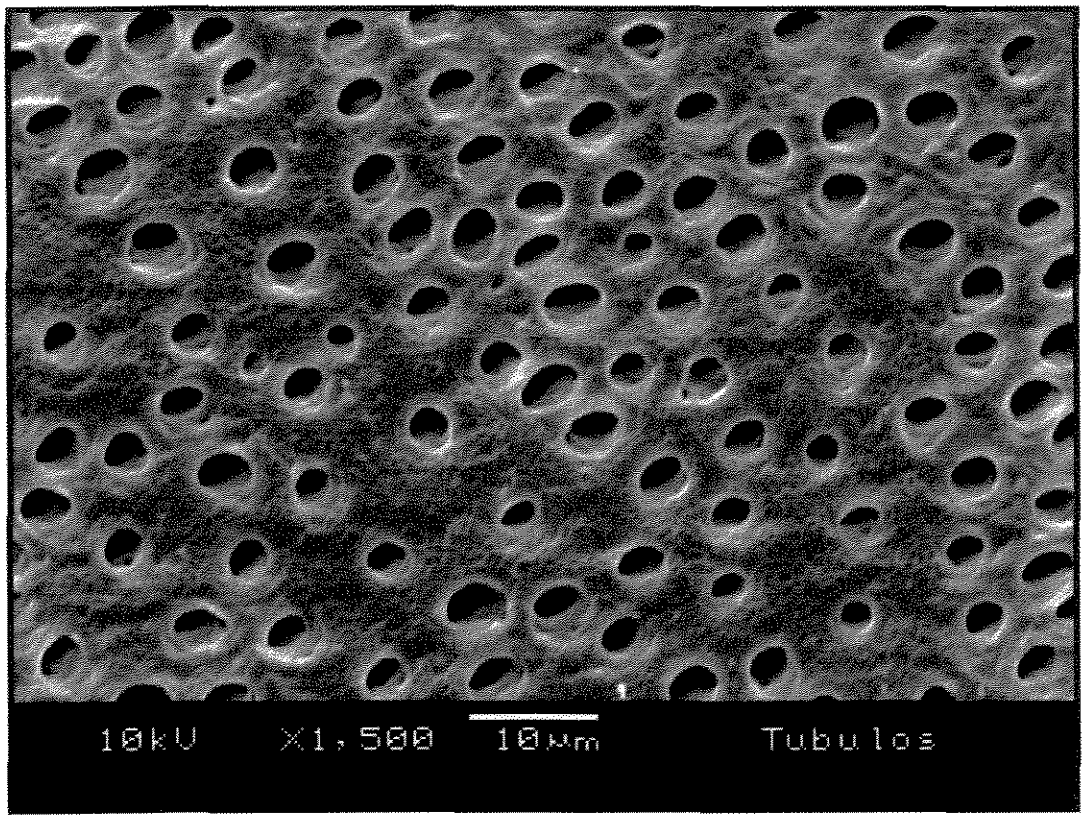

FIGURA 1 – Superfície dentinária do terço médio do canal radicular livre de *smear layer*, após tratamento com NaOCl 5,25% + EDTA 17%, observado em microscopia eletrônica de varredura (1500X).

4.2.4 Divisão dos espécimes em grupos

Os 80 espécimes foram divididos em 05 grupos, sendo 03 experimentais e 02 controles, como mostra a **TAB. 1**.

TABELA 1– Distribuição dos espécimes (n) por grupo de acordo com as substâncias irrigadoras testadas.

GRUPOS	SOLUÇÕES IRRIGADORAS	ESPÉCIMES (n)
Grupo 1	Clorexidina Gel 2%	20
Grupo 2	Clorexidina Líquida 2%	20
Grupo 3	Hipoclorito de Sódio 5,25%	20
Grupo 4	Água Destilada	10
Grupo 5	Natrosol	10

Grupos 1, 2 e 3 – Grupos experimentais; Grupos 4 e 5 – Grupos controle

4.2.5 Esterilização dos espécimes

Uma vez promovida a remoção da *smear layer*, todos os espécimes tiveram seus forames apicais selados com resina epóxi, e posteriormente, grupos de 10 raízes foram autoclavadas (H3000 Cristófoli Ltda – Campo Mourão, PR) a 121 °C, 1 atm, por 30 minutos, em frasco de vidro com tampa rosqueável contendo 5mL de BHI. Finalmente, após a autoclavagem, os dentes foram mantidos por 48 horas em estufa a 37°C em atmosfera de 10% de CO_2, para comprovação de esterilidade (HAAPASALO & ØRSTAVIK, 1987).

4.2.6 Contaminação *in vitro* dos espécimes com *Enterococcus faecalis*

Culturas puras de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 em caldo de BHI foram utilizadas como contaminantes dos espécimes. Estas bactérias foram subcultivadas em BHIA + 5% de sangue desfibrinado de carneiro (Ebefarma, Araras, SP) e incubadas a 37°C em atmosfera de 10% CO_2, por 24 horas.

Após este período, colônias isoladas **(FIG. 2A)** foram suspensas em tubos com tampas rosqueáveis, contendo 5,0 mL BHI **(FIG. 2B)**. Esta suspensão foi agitada mecanicamente (VORTEX MA 162, Marconi. Piracicaba, SP) **(FIG. 2C)** e ajustada em espectrofotômetro (FEMTO 432, Marconi. Piracicaba, SP) **(FIG. 2D)** com absorbância de 800 nm, até obter-se a concentração equivalente a 1,0 da escala de McFarland ($3,0 \times 10^8$ bactérias/mL) (SUNDQVIST, 1992).

O frasco contendo os espécimes esterilizados foram abertos em câmara de fluxo lâminar para substituição do BHI estéril por 5,0 mL da suspenção de *Enterococcus faecalis,* utilizando-se pipetas mecânicas com pontas descartáveis estéreis **(FIG. 2E)**. Em seguida, o frasco foi vedado e incubado em estufa a 37°C e atmosfera de 10% CO_2 por 7 dias **(FIG. 2F)** (HAAPASALO & ØRSTAVICK, 1987; FERRAZ, 1999; SOUZA, 2000), com trocas de 1,0 mL de BHI contaminado por 1 mL de BHI estéril, a cada 2 dias, a fim de se evitar a saturação do meio, respeitando todo rigor de assepsia exigido para este procedimento.

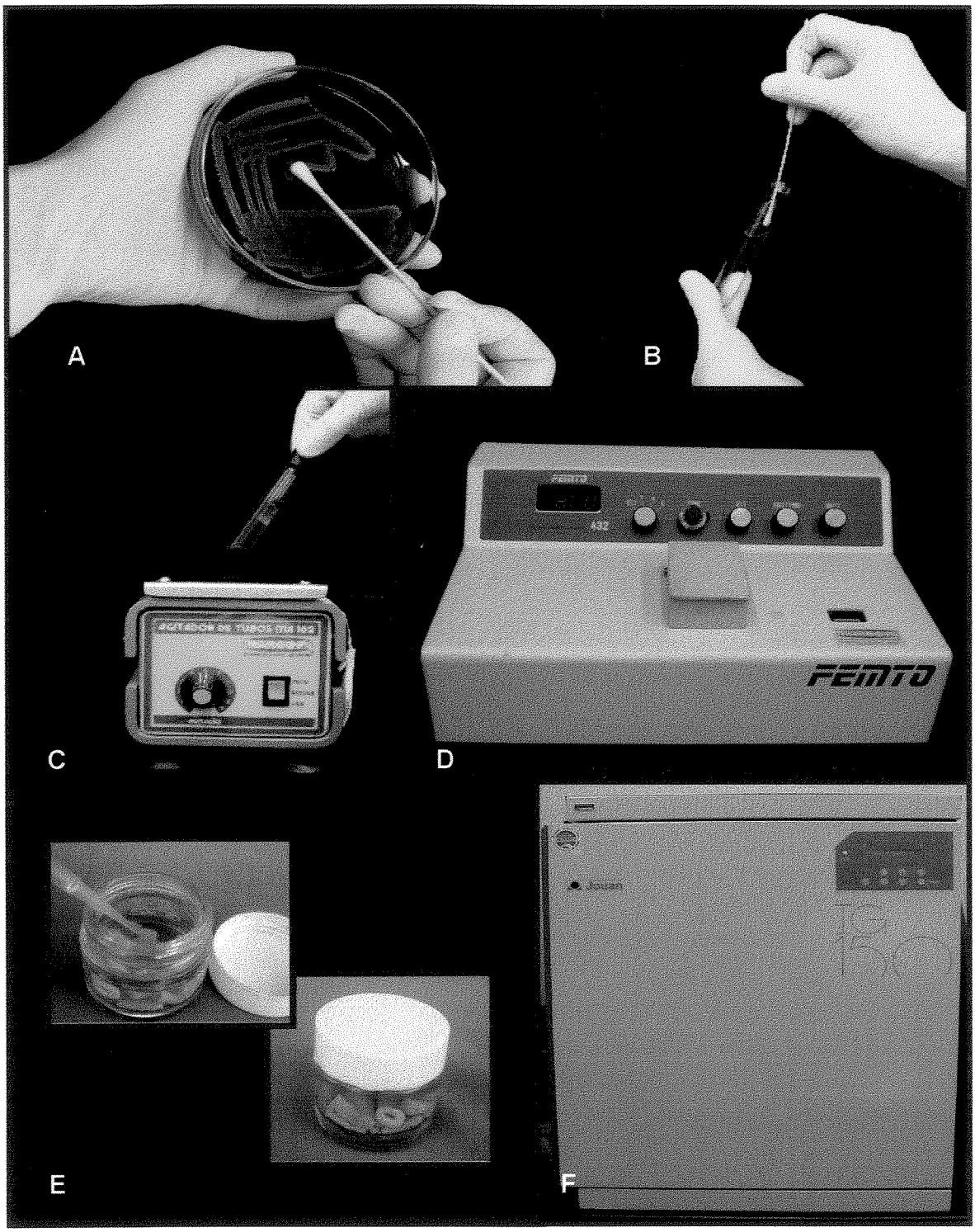

FIGURA 2 – Infecção *in vitro* dos espécimes - A – *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); B – Suspensão microbiana; C – Agitação mecânica; D – Concentração 1,0 escala Mc Farland; E – Contaminação dos espécimes; F – Incubação.

O crescimento bacteriano durante o período de incubação foi constatado pela presença da turbidez do meio, sendo a pureza das culturas confirmada através da morfologia das colônias plaqueadas em BHI ágar-sangue e, através da coloração de Gram, teste de catalase e método bioquímico de identificação bacteriana Api 20 Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) **(FIG. 3)**.

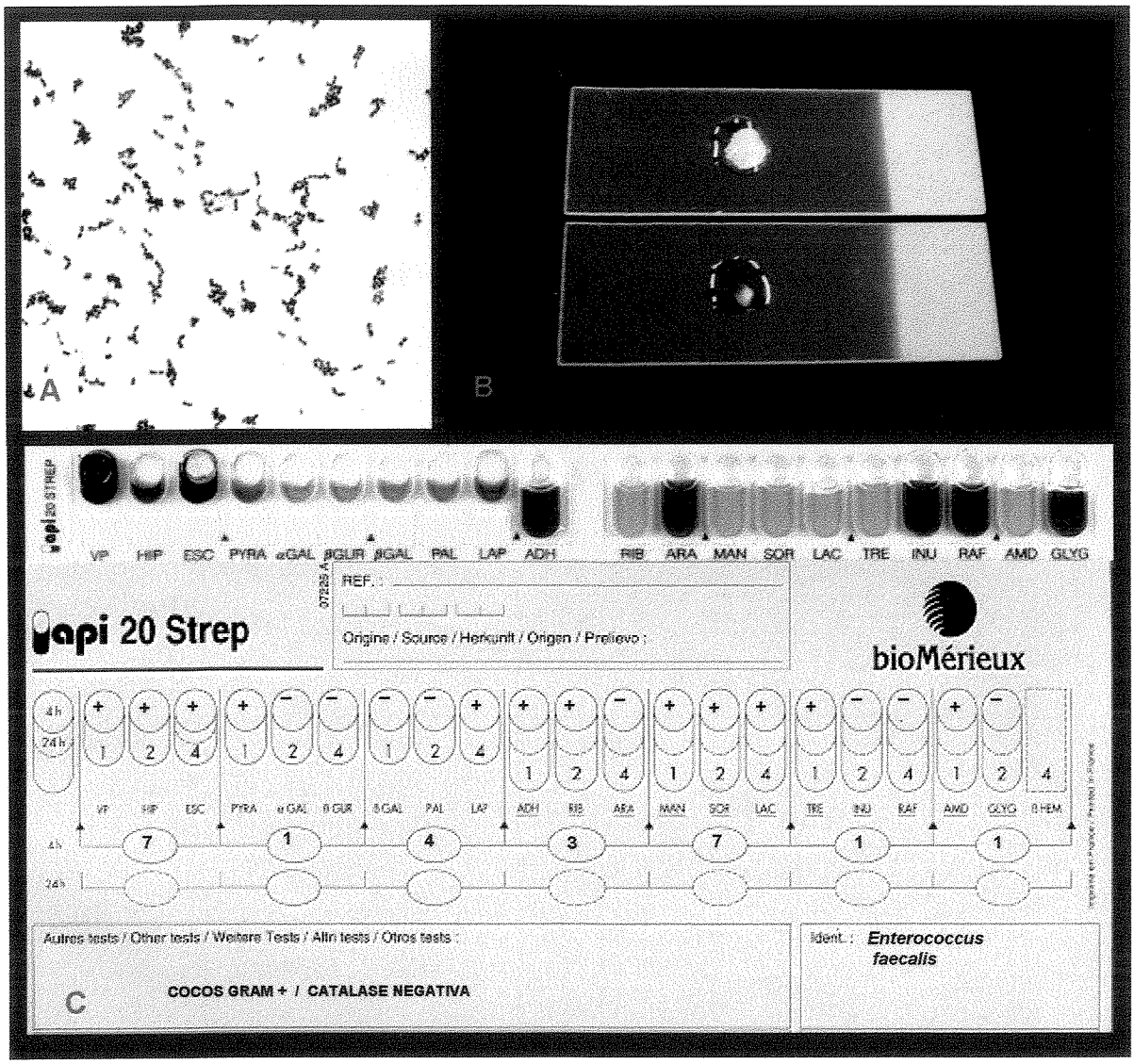

FIGURA 3 – Identificação do *E. faecalis* – A – Morfologia microscópica; B – Teste da catalase; C – Kit de identificação api 20 Strep.

A confirmação da penetração bacteriana nos túbulos dentinários foi constatada com auxílio da Microscopia Eletrônica de Varredura em avaliações preliminares ao presente estudo **(FIG. 4)**.

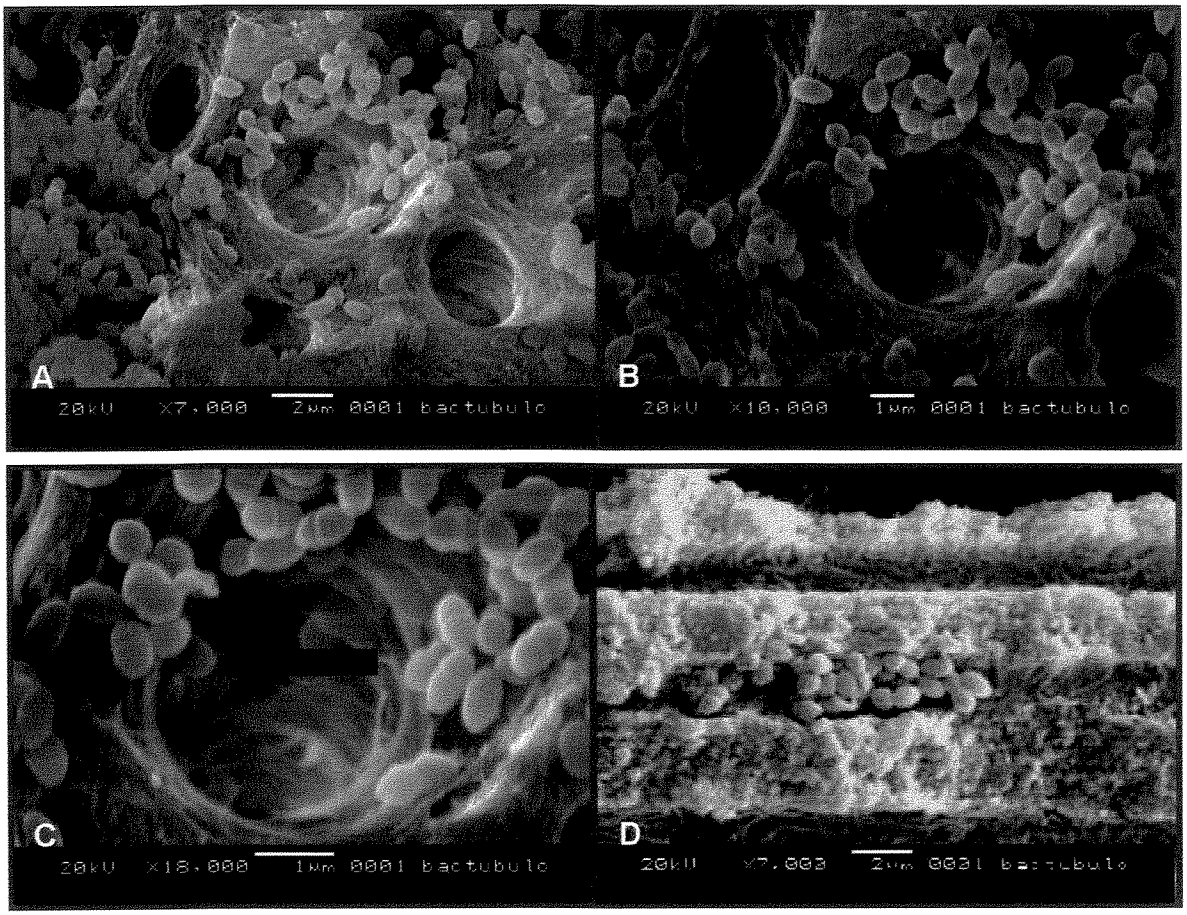

Figura 4 – *Enterococcus faecalis* na superfície dentinária (A, B) e no interior dos túbulos dentinários (C, D), após período de 7 dias de contaminação *in vitro.*

4.2.7 Ação antibacteriana dos irrigantes endodônticos no interior dos canais radiculares infectados *in vitro*

4.2.7.1 Inicial

Após o período de contaminação, os espécimes foram levados à câmara de fluxo lâminar e dispostos em uma plataforma metálica estéril **(FIG. 5A)**, na qual foram irrigados **(FIG. 5B)**, um a um, com 3 mL de solução salina estéril. Posteriormente, os canais radiculares foram secos com pontas de papel absorvente estéreis # 25 (TANARI, Tanarian Industrial Ltda, Macapurú - Amazonas) **(FIG. 5C)**, sendo estas, depositadas em tubos individuais tipo *eppendorf* (Elkay Products Inc.- Shrewsbury, USA) contendo 1 mL de BHI estéril **(FIG. 5D)**. Esta coleta foi denominada "Inicial".

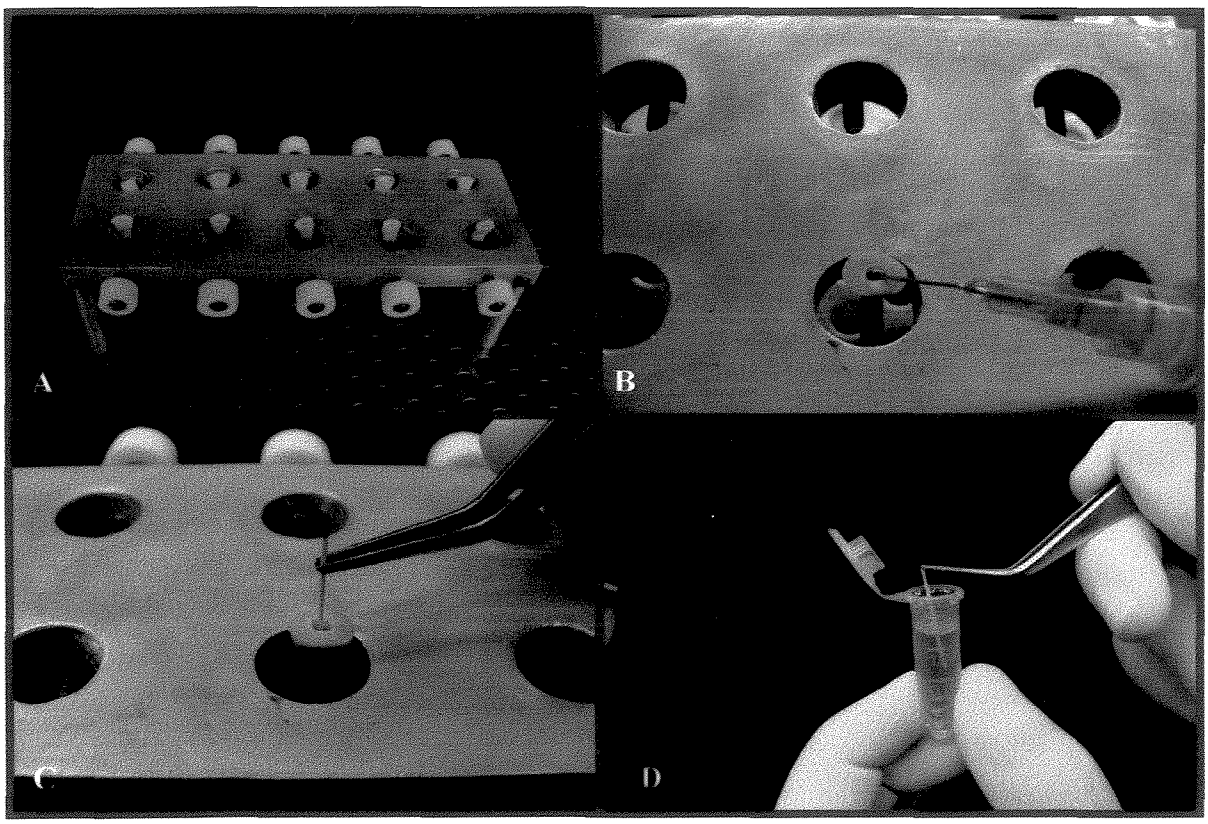

FIGURA 5 – Coleta microbiológica - A – Dentes dispostos na plataforma metálica; B – Irrigação; C – Coleta do canal radicular; D – Colocação dos cones de papel em BHI.

4.2.7.2 Tratamento

Uma vez realizada a coleta inicial os canais foram novamente instrumentados pela técnica "step-back" (MULLANEY & PETRICH, 1968) até atingir a lima memória # 35 e, finalizando com o recuo programado até a lima # 50. Entre cada troca de lima os espécimes foram irrigados com 1mL da solução teste escolhida (de acordo com o grupo) com auxílio de seringa estéril descartável BD de 10mL e agulha 20X5,5, colocando-se a agulha o mais próximo possível do comprimento de trabalho sem que houvesse travamento dentro do canal. Após a instrumentação, foi realizada nova irrigação com 3 mL da solução teste, seguida de irrigação com 3 mL do neutralizador específico da solução teste empregada para se evitar ação residual dos irrigantes nas coletas microbiológicas. Por fim, realizou-se uma irrigação final com 3 mL da salina estéril.

Uma vez realizada a irrigação final com salina, os canais foram novamente secos com pontas de papel absorvente estéreis e depositadas em *eppendorfs* individuais, seguindo-se as mesmas orientações realizadas na coleta "inicial". Esta nova coleta foi classificada como "pós-tratamento".

Todos espécimes submetidos ao tratamento foram preenchidos com BHI, selados com guta-percha bastão e colocados em *eppendorfs* individuais contendo 60μL de BHI estéril para manutenção da hidratação **(FIG. 6A e 6B)**. Posteriormente, foram novamente incubados a 37°C em atmosfera de 10% CO_2 por 7 dias.

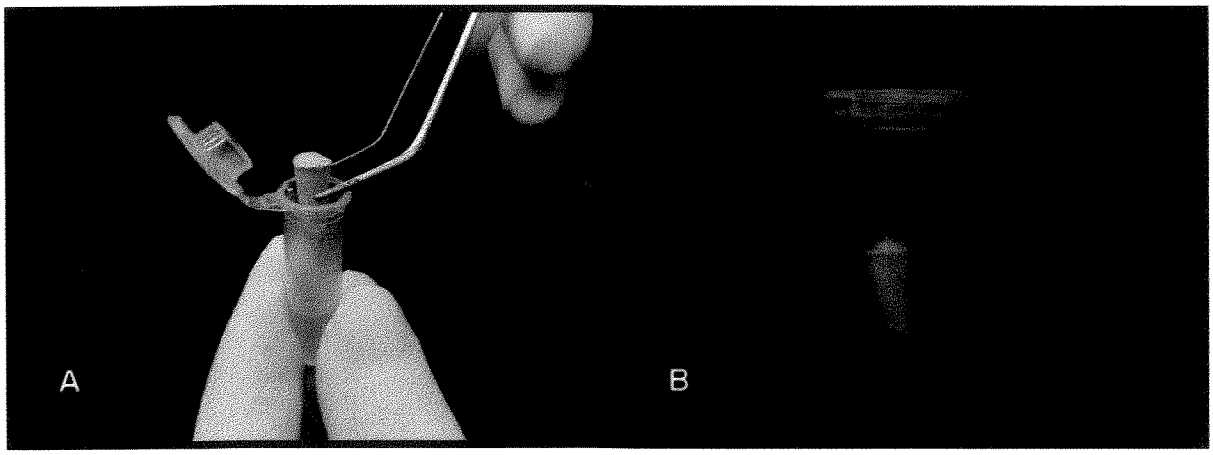

FIGURA 6 – Incubação dos espécimes - A e B – Armazenagem do espécime.

4.2.7.3 Coleta final

Transcorrendo-se o período de 7 dias, os espécimes foram removidos dos *eppendorfs*, dispostos novamente na plataforma metálica estéril, e realizou-se a irrigação com 3 mL de salina estéril. Os canais radiculares foram secos com pontas de papel absorvente estéreis, sendo estas, posteriormente, depositadas em *eppendorfs* individuais contendo 1 mL de BHI estéril. Esta última coleta foi denominada "final".

4.2.7.4 Diluição e plaqueamento das coletas

Todas coletas microbiológicas no transcorrer da elaboração do experimento, ou seja, imediatamente após a realização de cada coleta, foram agitadas por aproximadamente 60 segundos, e diluídas 1/10, 1/100, em BHI estéril **(Fig. 7A)**. A seguir, 50µl da diluição 10^{-2} foram plaqueados **(Fig. 7B, C, D e E)** em triplicata em BHIA sangue e incubados a 37°C em atmosfera de 10% de CO_2. Após o período de 48 horas, as colônias de microrganismos **(Fig. 7F)** que

estavam presentes nestas placas foram contadas determinando-se as unidades formadoras de colônias (UFC). Novamente a pureza das culturas foi confirmada através da morfologia das colônias plaqueadas em BHIA sangue e, através da coloração de Gram, teste de catalase e método bioquímico de identificação bacteriana (Api 20 Strep, BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França). Uma vez constatada a pureza das colônias, para obtenção das unidades formadoras de colônias por mL (UFC), foi necessária a multiplicação do número de UFC obtidas na contagem das placas **(Fig. 7F)** em 2000 vezes, representando assim, o número de colônias descontando-se as diluições feitas durante o estudo (100 vezes) e o plaqueamento de 50μL (20 vezes menor que 1mL). A média das três placas de cada coleta foi utilizada como valor final da contagem.

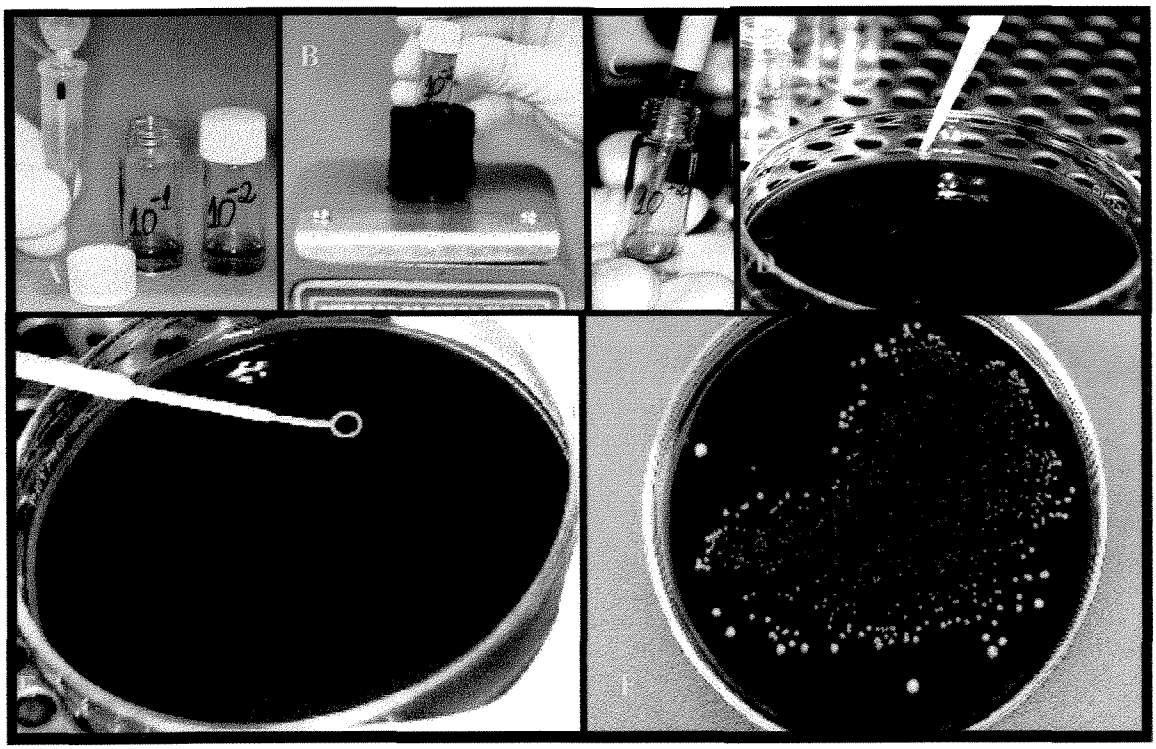

FIGURA 7 – Contagem de UFC de *E. faecalis* A – Diluição; B – Agitador; C, D e E – Plaqueamento; F – UFC

4.2.7.5 Análise Estatística

Os valores obtidos apresentaram distribuição não-normal ao redor da média e variâncias heterogêneas, descrevendo um histograma de freqüências assimétrico e não compatível com a curva normal de Gauss. Desse modo, foi necessário o uso do teste estatístico não-paramétrico para múltiplas comparações de amostras independentes. Os valores em porcentagem foram ordenados e transformados em postos, sendo analisados através do teste de Kruskal-Wallis (Programa BioEstat 2.0) para testar a hipótese nula de que as porcentagens representativas dos diferentes grupos apresentam apenas variações ocasionais (não controladas) entre si, sendo estatisticamente iguais. A significância estabelecida foi ao nível de 5%.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Todos os resultados analisados foram baseados nas médias das contagens de UFC realizada para cada espécime em triplicata, nas três coletas realizadas. Posteriormente, calculou-se a porcentagem das UFC residuais "pós-tratamento" em relação às UFC "iniciais" por espécime, e porcentagem das UFC "finais"em relação às UFC "iniciais" por espécime. As porcentagens obtidas foram os valores utilizados na análise estatística. Todos esses dados foram organizados em planilhas e estão no **ANEXO II**.

5.1 Resultados da Coleta Inicial

As médias das contagens de UFC, em log 10, obtidas na coleta inicial, por grupo, estão representadas no **GRÁF. 1**.

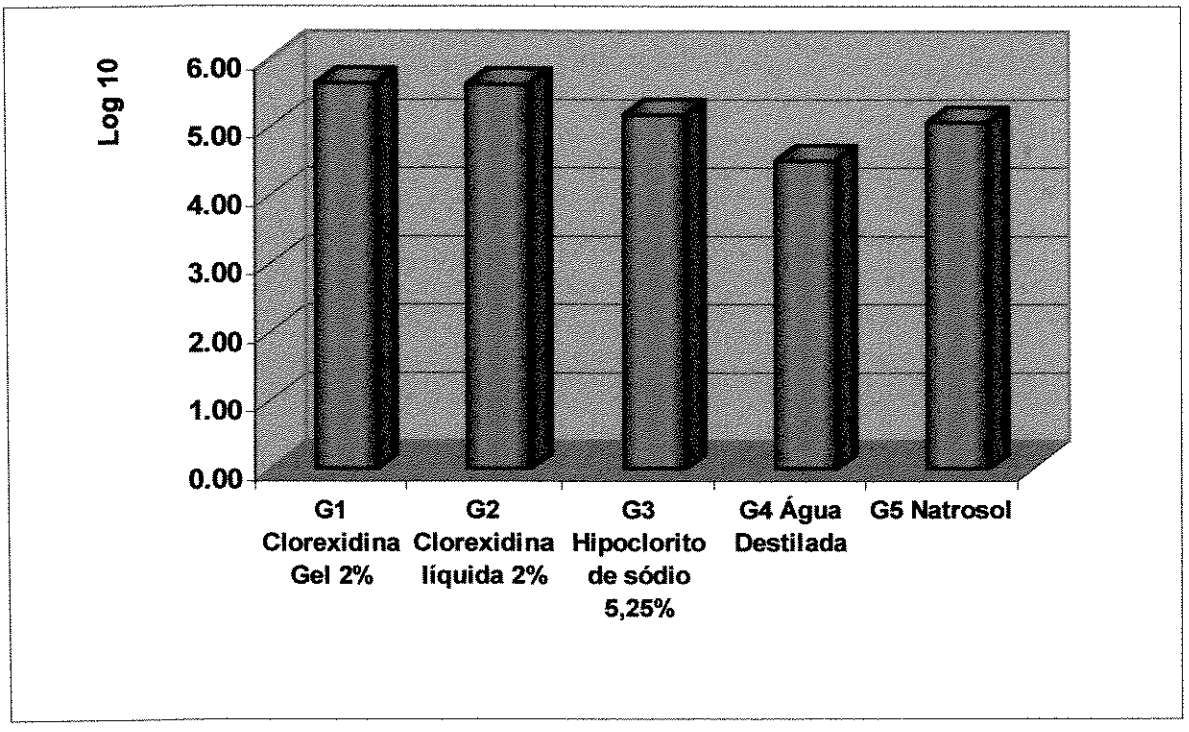

GRÁFICO 1 – Médias das contagens de UFC de *Enterococcus faecalis* da coleta inicial.

Pode-se verificar no **GRAF. 1** que em todos os grupos foi possível a coleta de *Enterococcus faecalis.* A comparação da contagem de UFC inicial está disposta na **TAB. 2**.

TABELA 2 – Comparação entre os grupos da contagem de UFC da coleta inicial

GRUPOS	SOMA DOS POSTOS	POSTO MÉDIO
G1- Clorexidina Gel	449	47.40 **ab**
G2 – Clorexidina Líquida	1114	55.70 **a**
G3 – Hipoclorito de Sódio	724	36.20 **bd**
G4 – Água Destilada	178	17.80 **c**
G5 - Natrosol	276	27.60 **cd**

Postos médios seguidos por letras diferentes representa diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos G1 e G2 ($p>0,05$). Ainda demonstrou não haver diferença estatisticamente significante entre os grupos G1 e G3, entre os grupos G3 e G5 e, entre os grupos G4 e G5. Desta forma, os resultados da coleta inicial demonstraram uma disparidade na contagem de UFC entre os grupos estudados. Entretanto, independente da variação da contagem de UFC, os valores obtidos foram considerados 100%, sendo este, dentro de cada grupo, a referência para avaliar o efeito antimicrobiano das substâncias testadas.

5.2 Redução de *Enterococcus faecalis* após o preparo químico-mecânico

Houve redução da contagem de *Enterococcus faecalis* após o preparo biomecânico em relação à contagem inicial em todos os grupos estudados. As médias das porcentagens de UFC obtidas para os cinco grupos, em relação às contagens iniciais, estão representadas no **GRAF. 2**.

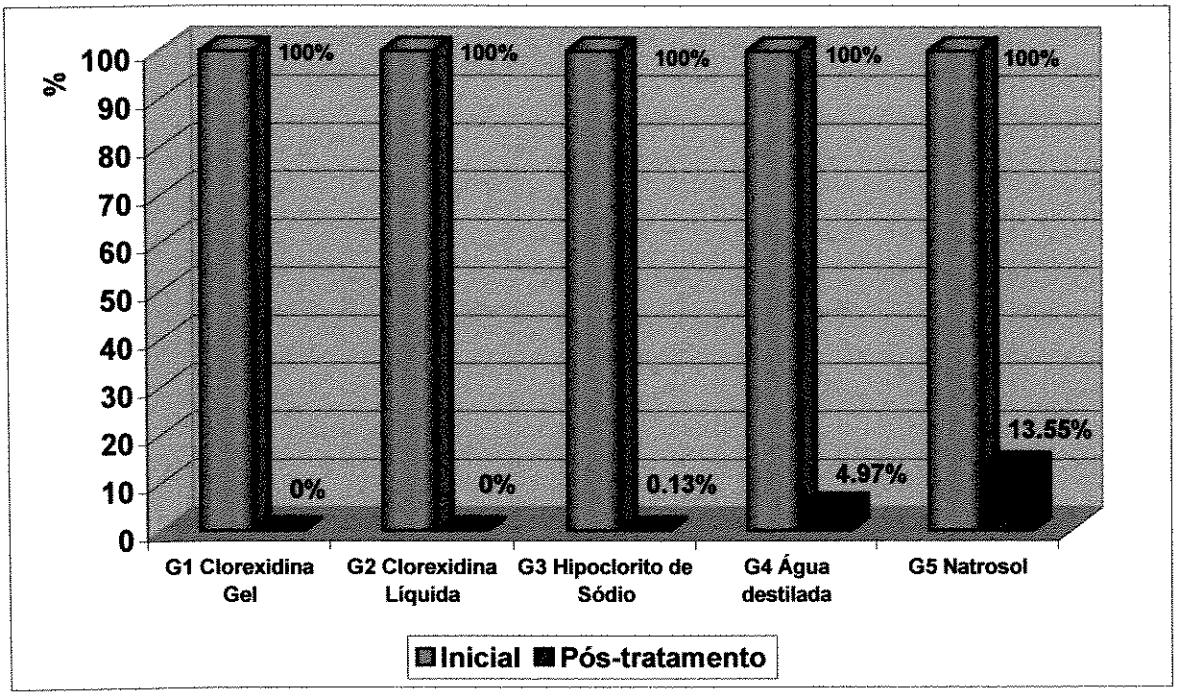

GRÁFICO 2 – Médias das porcentagens de UFC de *Enterococcus faecalis* da contagem pós-tratamento em relação à contagem inicial

Os grupos controle, G4 e G5, por utilizarem soluções auxiliares à instrumentação sem atividade antimicrobiana, apresentaram menor redução de *Enterococcus faecalis* em relação aos grupos G1,G2 e G3. Os grupos G1,G2 e G3, por sua vez, apresentaram os melhores resultados na redução bacteriana

devido a associação do efeito antimicrobiano do agente irrigante e a ação mecânica dos instrumentos endodônticos.

A comparação do efeito antimicrobiano das substâncias testadas está disposta na **TAB. 3**.

TABELA 3 – Comparação do efeito antimicrobiano da Coleta Pós-tratamento

GRUPOS	SOMA DOS POSTOS	POSTO MÉDIO
G1- Clorexidina Gel	690	34.50 **a**
G2 – Clorexidina Líquida	724	36.22 **a**
G3 – Hipoclorito de Sódio	762	38.10 **a**
G4 – Água Destilada	467	46.75 **ab**
G5 - Natrosol	596	59.60 **b**

Postos médios seguidos por letras diferentes representa diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

Quanto maior o valor do posto médio, menor foi a redução da contagem de UFC pós-tratamento em relação à inicial. Assim sendo, a análise dos postos médios não apresentaram diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) entre os grupos G1, G2, G3 e G4. Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) entre os grupos G4 e G5.

5.3 Contagem de UFC 7 dias após o preparo químico-mecânico

O crescimento bacteriano após a neutralização do agente irrigante foi analisado calculando-se a porcentagem das contagens de UFC final em relação às contagens de UFC iniciais. As médias das porcentagens de UFC obtidas na coleta final para os cinco grupos em estudo estão representadas no **GRAF. 3**.

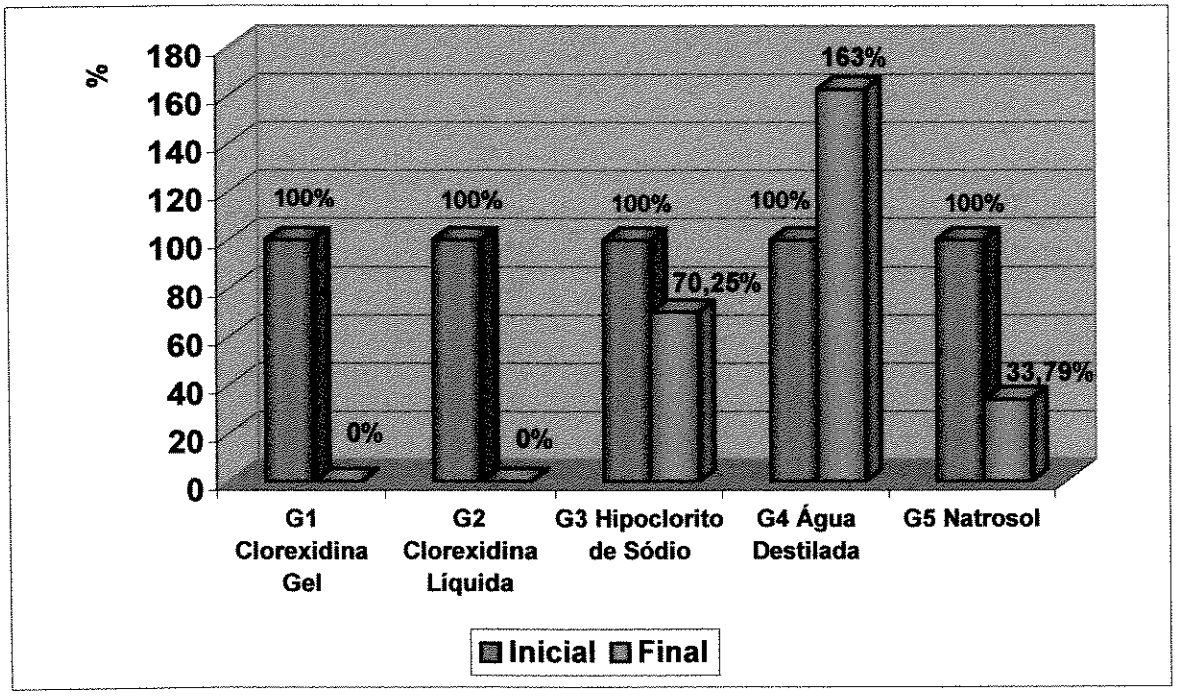

GRÁFICO 3 - Médias das porcentagens de UFC de *Enterococcus faecalis* da contagem final em relação à contagem inicial

O **GRAF. 3** mostra que os grupos G1 e G2 na coleta final, ou seja, 7 dias após o preparo químico-mecânico, mantiveram a ação antimicrobiana contra o *Enterococcus faecalis*, constatando-se o efeito residual do gluconato de clorexidina. Em contrapartida, o grupo G3, assim como os grupos controle, G4 e

G5, permitiram a recolonização de *Enterococcus faecalis* 7 dias após o preparo químico-mecânico.

A comparação do efeito antimicrobiano das substâncias testadas está disposta na **TAB. 4**.

TABELA 4 – Comparação do efeito antimicrobiano da Coleta Final

GRUPOS	SOMA DOS POSTOS	POSTO MÉDIO
G1- Clorexidina Gel	430	21.50 **a**
G2 – Clorexidina Líquida	430	21.50 **a**
G3 – Hipoclorito de Sódio	1203	60.15 **b**
G4 – Água Destilada	602	60.20 **b**
G5 - Natrosol	575	57.50 **b**

Postos médios seguidos por letras diferentes representa diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

Os resultados confirmam o que foi observado graficamente, ou seja, os grupos G1 e G2 não apresentaram diferença estatisticamente significante entre si ($p>0,05$), demonstrando que ambos os grupos que contêm gluconato de clorexidina 2% na composição preveniram, de forma mais eficiente, a recolonização dos canais radiculares por *Enterococcus faecalis*.

O grupo G3, hipoclorito de sódio 5,25%, não apresentou diferença estatisticamente significante em relação aos grupos controle G4 e G5 ($p<0,05$), mostrando não possuir efeito antimicrobiano residual.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O presente estudo utilizou o *E. faecalis* no método de infecção utilizando a concentração do inóculo equivalente ao padrão McFarland 1 para anaeróbios facultativos, pois este corresponde, aproximadamente, ao número de células bacterianas encontradas nos canais radiculares (SUNDQVIST, 1992b). Assim como em outros trabalhos (HAAPASALO & ØRSTAVICK, 1987; FERRAZ, 1999), a contaminação dos espécimes foi constatada após o período de 7 dias de incubação dos dentes, uma vez que, foi possível recuperar e identificar culturas puras de *Enterococcus faecalis*, além da visualização através da microscopia eletrônica de varredura da penetração bacteriana no sistema de túbulos dentinários. Ademais, em todas as coletas realizadas inicialmente foi possível a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Nas coletas microbiológicas realizadas imediatamente após o preparo mecânico padronizado, no qual, variou-se as substâncias testadas como irrigante, tanto a clorexidina 2%, em solução ou em gel, como o NaOCl 5,25% promoveram a desinfecção em quase 100% dos canais radiculares. Resultados estes, também já constatados por SHIH *et al.*, 1970, SPANGBERG, 1973, SJÖGREN & SUNDQVIST, 1987, FERRAZ *et al.*, 2001. Deve-se também ressaltar que as substâncias utilizadas como controle quando associadas à ação mecânica dos instrumentos endodônticos promoveram uma significativa redução bacteriana, confirmando os achados de BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1981, 1983. No entanto, ressaltam os autores que não ocorre uma completa eliminação dos

microrganismos, e sim, uma redução bacteriana que dificulta a coleta do interior do canal. As bactérias que sobrevivem a instrumentação e irrigação proliferam rapidamente, num curto período de tempo, recontaminando o canal radicular.

Visando verificar a manutenção da desinfecção promovida pelos irrigantes testados em uma nova coleta microbiológica realizada após 7 dias do preparo químico-mecânico, foram utilizados neutralizadores específicos, garantindo que nenhum traço do irrigante livre fosse adicionado ao meio de cultura e, assim, evitando alteração no crescimento bacteriano. Com isso, podemos considerar que os irrigantes agiram apenas durante os procedimentos de instrumentação, ou então, se mantiveram ligados quimicamente à dentina, no caso da clorexidina (HUGO & LONGWORTH, 1964 e 1965; RÖLLA *et al.*, 1970; RÖLLA & MELSEN, 1975; GREENSTEIN *et al.*, 1986).

Estudos preliminares (não publicados), utilizando teste de difusão em ágar, demonstraram, que quando o tiossulfato de sódio 0,6% e o Tween 80 0,5% + Lecitina de soja 0,07% são adicionados na proporção 1:1 ao hipoclorito de sódio e à clorexidina, respectivamente, não ocorre a formação de halo de inibição contra *Enterococcus faecalis*. Entretanto, quando os agentes neutralizadores não são utilizados ambas soluções promovem halos de inibição (FERRAZ, 1999).

Outros dois testes foram realizados utilizando blocos de dente bovino. Grupos de 5 espécimes foram imersos em frascos contendo clorexidina gel 2%, clorexidina líquida 2% e NaOCl 5,25% por 1 hora. Para cada substância avaliada

foram utilizados 10 espécimes, sendo 5 espécimes neutralizados e 5 não neutralizados. O teste de difusão em ágar com blocos de dentes bovino, demonstrou a formação de halo de inibição pelo hipoclorito de sódio 5,25% e pela clorexidina 2%, gel e líquida, sem estes, terem sido submetidos à neutralização. No entanto, após a neutralização, o halo de inibição somente se manteve ao redor dos blocos tratados com clorexidina 2%, gel e líquida. A Espectroscopia Dispersiva de Raios-X demonstrou uma alta quantidade de cloro (Cl) na superfície dos espécimes não submetidos à neutralização; substância esta, que faz parte da composição química do hipoclorito de sódio e da clorexidina. Em contrapartida, após a neutralização ocorreu uma alta diminuição do cloro no grupo do hipoclorito de sódio. Já no grupo da clorexidina, gel e líquida, ocorreu uma diminuição insignificante do cloro, fato este que explica a manutenção do halo de inibição no teste de difusão em ágar. Isto é explicado devido a capacidade de adsorção da clorexidina à hidroxiapatita (HUGO & LONGWORTH, 1964 e 1965; RÖLLA *et al.*, 1970; RÖLLA & MELSEN, 1975; GREENSTEIN *et al.*, 1986; WHITE *et al.*, 1997), o que permitiu a neutralização apenas das moléculas livres da clorexidina.

As contagens de UFC realizadas a partir das coletas finais, demonstraram que após a neutralização do NaOCl 5,25%, os espécimes tornaram-se passíveis a recolonização bacteriana em todo sistema de canais radiculares após 7 dias. Desta forma, a terapia endodôntica foi incapaz de remover todas as bactérias do sistema de canais radiculares devido a complexidade anatômica do espaço pulpar que impede a total desinfecção e

remoção de nutrientes capazes de favorecer o crescimento de organismos residuais (GOMES *et al.*, 1996c).

Estes resultados confirmam os achados de SHIH *et al.* (1970) e SJÖGREN & SUNDQVIST (1987), nos quais os autores demonstraram que o NaOCl 5,25% é altamente bactericida, no entanto, não permite a desinfecção completa do sistema de canais radiculares, uma vez que, constataram elevado índice de contaminação em culturas realizadas 2 a 7 dias após o preparo químico-mecânico.

BYSTRÖM & SUNDQVIST, em 1985, ao comparar o efeito antibacteriano do hipoclorito de sódio 0,5% e 5%, concluíram não haver diferença estatisticamente significante entre as concentrações, ocorrendo a recontaminação do canal no período de 2 a 4 dias. Segundo o autor, o hipoclorito reage com debris e restos orgânicos facilitando a limpeza, no entanto, esta reação inativa o hipoclorito reduzindo a capacidade antimicrobiana.

É certo que o NaOCl apresenta outras propriedades, tais como, o grande potencial de dissolução tecidual e baixa tensão superficial (GROSSMAN & MEIMAN, 1941; HAND *et al.*, 1978). Em contra partida, várias complicações têm sido relatadas com o uso do NaOCl durante o tratamento endodôntico, tais como, dor severa, desenvolvimento de edema, hematoma, necrose e abscessos, causados pelo efeito oxidativo do NaOCl quando em contato com os tecidos

periapicais (KAUFMAN & KEILA, 1989; SABALA & POWELL, 1989; BECKING, 1991).

A clorexidina, outra substância estudada, já foi amplamente empregada na Medicina para desinfecção da pele e na Odontologia, principalmente na Periodontia, utilizando-a como substância inibidora da placa dental e gengivite (FARDAL & TURNBULL, 1986). Na Endodontia têm sido usada como solução irrigadora na forma de solução (DELANY *et al.*, 1982; RINGEL *et al.*, 1982; JEANSONNE & WHITE, 1994) e na forma de gel (FERRAZ *et al.*, 2001) tendo como veículo o natrosol (hidroxietilcelulose) que é um agente espessante não iônico altamente eficiente, inerte e hidrossolúvel. Este é utilizado para espessamento de xampus, géis e sabonetes à base de tensoativos aniônicos, como o gluconato de clorexidina, aos quais apresenta excelente compatibilidade (MIYAMOTO *et al.*, 1989).

Os resultados do presente estudo demonstraram, na contagem de UFC da coleta Final, que a clorexidina, em solução ou em forma de gel, mesmo após a neutralização com Tween 80 a 0,5% e Lecitina de soja 0,07% realizada ao final da instrumentação, manteve a desinfecção do sistema de canais radiculares, impossibilitando a coleta de possíveis microrganismos persistentes. Isto pode ser explicado pela sua ampla ação antibacteriana e efeito residual, ou seja, a habilidade de se aderir a substratos aniônicos, tais como, a hidroxiapatita e glicoproteínas salivares, fato este, que prolonga a atividade antimicrobiana protegendo o canal da reinfecção por horas após a instrumentação (HUGO &

LONGWORTH, 1964 e 1965; RÖLLA *et al.*, 1970; RÖLLA & MELSEN, 1975; GREENSTEIN *et al.*, 1986; WHITE *et al.*, 1997).

Sabe-se que a clorexidina é uma molécula catiônica que se liga através de uma interação eletrostática aos íons fosfato que estão presentes na superfície bacteriana. Isto promove uma desorganização da membrana celular, ou seja, ocorre uma alteração do equilíbrio osmótico. A molécula de clorexidina promove o deslocamento de íons cálcio afetando o transporte, através da membrana, de metabólitos e outros íons essenciais à bactéria, caracterizando assim, o efeito antimicrobiano da clorexidina (HUGO & LONGWORTH, 1964 e 1965).

Segundo GREENSTEIN *et al.*, em 1986, estando a clorexidina presente em baixas concentrações, terá efeito bacteriostático inibindo as funções da membrana. Em altas concentrações seu efeito é bactericida, pois promove o rompimento da parede celular interferindo no mecanismo de transporte e acarretando a precipitação do conteúdo citoplasmático que resultará na morte celular.

É certo que a clorexidina em solução apresenta a desvantagem de não ter a capacidade de dissolução de tecido orgânico. No entanto, a clorexidina gel, devido sua viscosidade, promove uma ação mecânica capaz de remover restos de dentina e restos pulpares (FERRAZ *et al.*, 2001), além de possuir a atividade antimicrobiana, constatada no presente estudo, e promover a ação lubrificante facilitando a ação dos instrumentos endodônticos. Por ser altamente hidrossolúvel,

a clorexidina gel 2% (Endogel®), utilizada neste estudo, é removida completamente após a irrigação final com solução salina, não prejudicando o selamento final obtido na obturação do canal radicular (VIVACQUA-GOMES *et al.*, 2002).

O gluconato de clorexidina tem sido usado na odontologia sem causar reações adversas que possam contra-indicar seu uso como irrigante endodôntico (GREEINSTEIN *et al.*, 1986). BONESVOLL, em 1977, ao avaliar enxagues bucais de clorexidina a 4% que eram eventualmente engolidos, concluiu que, 90% da droga foi excretada nas fezes e o remanescente eliminado pelo trato urinário. Portanto, a pobre absorção da clorexidina é o fator que caracteriza sua baixa toxicidade.

Baseado nas atuais evidências, a desinfecção do sistema de canais radiculares promovida pela ação mecânica da instrumentação associada ao uso de NaOCl ou clorexidina são igualmente eficientes. No entanto, devido seu efeito residual, a clorexidina, tanto gel quanto líquida, permite a manutenção desta desinfecção por um maior período de tempo após o preparo químico-mecânico. Portanto, a clorexidina, na forma de gel, é uma alternativa como substância irrigadora durante o preparo químico-mecânico.

CONCLUSÃO

7. Conclusão

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

1-) O preparo mecânico dos canais radiculares promove grande redução na população de *Enterococcus faecalis*, independente da substância irrigante utilizada, mostrando que a fase de instrumentação é essencial para o sucesso do tratamento endodôntico.

2-) A clorexidina 2%, gel e líquida, apresentou efeito residual mantendo menores contagens de UFC de *Enterococcus faecalis*, quando comparada ao hipoclorito de sódio 5,25%, 7 dias após o preparo químico-mecânico, com diferenças estatisticamente significantes.

3-) O hipoclorito de sódio 5,25% não apresentou diferença estatisticamente significante em relação aos grupos controle na manutenção de baixas contagens de *Enterococcus faecalis*, 7 dias após o preparo químico-mecânico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

1. ANDO N., HOSHINO E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. **Int. Endodon. J.**, v. 23, p. 20-7, 1990.

2. BAUMGARTNER J. C., IBAY, A. C. The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. **J. Endodon.**, v. 13, p. 47-51, 1987.

3. BAUMGARTNER J. C., MADER C. L. A scanning microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. **J. Endodon.**, v. 13, p. 147-57, 1987.

4. BAUMGARTNER J. C., FALKLER JR W. A. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. **J. Endodon.**, v. 17, p. 380-3, 1991.

5. BECKING A. G. Complications in the use sodium hypochlorite during endodontic treatment. **Oral Surg.**, v. 71, p. 346-8, 1991.

6. BERG M. S., JACOBSEN E. L., BEGOLE E. A., RAMEIKIS N. A. A comparison of five irrigating solutions: scanning electron microscopic study. **J. Endodon.**, v. 12, p. 192- 96, 1986.

7. BERGENHOLTZ G., CRAWFORD J. J. Endodontic Microbiology. In: **WALTON, RE & TORABINEJAD, M ed. Principles and practice of Endodontics**, 1st ed. Philadelphia, P. A. USA: W. B. Saunders Co., 267-82, 1989.

8. BLOOMFIELD S. F., MILES G. A. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 46, p. 65-73, 1979.

9. BONDESTAM O., GAHNBERG L., SUND M. L., LINDER L. effect of chlorhexidine gel treatment on the prevalence of mutans streptococci and lactobacilli in patients with impaired salivary secretion rate. **Spec. Care Dentist.**, v. 16, p. 123-7, 1996.

10. BONESVOLL P. Oral pharmacology of clhorhexidine. **J. Clin. Periodontol.**, v. 4, p. 49-65, 1977.

11. BUTLLER T. K., CRAWFORD J. J. The detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypoclhoride on endotoxins. **J. Endodon.**, v. 8, p. 59-66, 1982.

12. BYSTRÖM A., SUNDQVIST G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 89, p. 821-8, 1981.

13. BYSTRÖM A., SUNDQVIST G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in Endodontic therapy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 55, p. 307-12, 1983.

14. BYSTRÖM A., SUNDQVIST G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. **Int. Endodon. J.**, v. 18, p. 35-40, 1985.

15. CENGIZ T., AKTENER B. O., PISKIN B. The effect of dentinal tubule orientation on removal of smear layer by root canal irrigant. A scanning electron microscopic study. **Int. Endodon. J.**, v. 23, p. 1-9, 1990.

16. CERVONE F., TRONSTAD L., HAMMOND B. Antimicrobial effect of chlorhexidine in a controlled release delivery system. **Endod. Dent. Traumatol.**, v. 6, p. 33-6, 1990.

17. CLARK D. C., MORGAN J., MACENTEE M. I. Effects of 1% chlorhexidine gel on the cariogenic bacteria in high-risk elders: a pilot study. **Spec. Care Dentist.**, v. 11, p. 101-3, 1991.

18. CVEK M. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. I. Follow-up of periapical repair and apical closure of immature roots. **Odontol. Revy.**, v. 23, p. 27-44, 1972.

19. DELANY G. M., PATTERSON S. S., MILLER C. H., NEWTON C. W. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the canal flora of freshly extracted necrotic teeth. **Oral Surg.**, v. 53, p. 518-22, 1982.

20. ENGSTRÖM B. The significance of enterococci in root canal treatment. **Odontol. Revy.**, v. 15, p. 87-105, 1964.

21. EPSTEIN J. B., McBRIDE B. C., STEVENSON-MOORE P., MERILEES H., SPINELLI J. The efficacy of chlorhexidine gel in reduction of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* species in patients treated with radiation therapy. **Oral Surg.**, v. 71, p. 172-8, 1991.

22. FARDAL O., TURNBULL R. S. A review of the literature on use of clhorhexidine in dentistry. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 112, p. 863-9, 1986.

23. FEHR F. R., NYGAARD-OSTBY B. Effect of EDTAC and sulphuric acid on root canal dentine. **Oral Surg.**, v. 16, p. 199-205, 1963.

24. FERRAZ C. C. R. Avaliação *in vitro* do gel de clorexidina usado como irrigante endodôntico. **Tese Doutorado** – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, F413a, 1999.

25. FERRAZ C. C. R., GOMES B. P. F. A., ZAIA A. A., TEIXEIRA F. B., SOUZA-FILHO F. J. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **J. Endodon.**, v. 27, n. 7, p. 452-55, 2001.

26. FISHER R., HUERTA J. effects of Ph on microbial flora of necrotic root canals. **J. Endodon.**, v. 10, p. 153-55, 1984.

27. FOREMAN P. C., BARNES I. E. A review of calcium hydroxide. **Int. Endodon. J.**, v. 23, p. 283-97, 1990.

28. FRASER J. G. Chelanting agents: Their softening effect on root canal dentine. **Oral Surg.**, v. 37, p. 803-11, 1974.

29. GOMES B. P. F. A., DRUCKER D. B., LILLEY J. D. Association of specific bacteria with some Endodontic signs and symptoms. **Int. Endod. J.**, v. 27, p. 291-98, 1994a.

30. GOMES B. P. F. A., DRUCKER D. B., LILLEY J. D. Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals. **Microbios.**, v. 80, p. 231-43, 1994b.

31. GOMES B. P. F. A. An investigation into the root canal microflora. Manchester (**Thesis of Doctor of Philosophy**-UDHM, UK) 1995.

32. GOMES B. P. F. A., DRUCKER D. B., LILLEY J. D. Association of Endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. **Int. Endod. J.**, v. 29, p. 69-75, 1996a.

33. GOMES B. P. F. A., LILLEY J. D., DRUCKER D. B. Clinical significance of dental root canal microflora. **J. Dent.**, v. 29, p. 47-55, 1996b.

34. GOMES B. P. F. A., LILLEY J. D., DRUCKER D. B. Variations in the susceptibilities of components of the Endodontic microflora to biomechanical procedures. **Int. Endod. J.**, v. 29, p. 235-41,1996c.

35. GOMES B. P. F. A., FERRAZ C. C. R., VIANNA M. E., BERBER V. B., TEIXEIRA F. B., SOUZA-FILHO F. J. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in elimination of Enterococcus faecalis. **Int. Endodon. J.**, v. 34, p. 424-28, 2001.

36. GORDON T. M., DAMATO D., CHRISTNER P. Solvent effect of various dilutions of sodium hypochlorite on vital and necrotic tissue. **J. Endodon.**, v.7, p. 466-9, 1981.

37. GREENSTEIN G., BERMAN C., JAFFIN, R. Chlorhexidine. An adjunt to periodontal therapy. **J. Periodontol.**, v. 57, p. 370-6, 1986.

38. GROSSMAN L. I., MEIMAN B. W. Solution of pulp tissue by chemical agents. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 28, p. 223-5, 1941.

39. GROSSMAN L. I. Bacteriologic examination. In: **Endodontic Pratice** 11th ed. Philadelphia, P. A., USA: Lea and Feiger, p. 263-76, 1981.

40. HAAPASALO M., RANTA H., RANTA K. T. Facultative gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. **Acta Odont. Scand.**, v.41, p. 19-22, 1983.

41. HAAPASALO M., ØRSTAVICK D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. **J. Dent. Res.**, v. 66, p. 1375-9, 1987.

42. HAND R. E., SMITH M. L., HARRISON J. W. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. **J. Endodon.**, v. 4, p. 60-4, 1978.

43. HARRISON J. W. Irrigation of the root canal system. **Dent. Clin. North Am.**, v. 28, p. 797-808, 1984.

44. HELING M., SOMMER D., STEINBERG M., FRIEDMAN M., SELA M. N. Microbiological evaluation of the efficacy of chlorhexidine in a substained-release devaice for dentine sterilization. **Int. Endodon. J.**, v. 25, p.15-9, 1992.

45. HUGO W. B., LONGWORTH A. R. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. **J. Pharm. Pharmocol.**, v. 16, p. 655-62, 1964.

46. HUGO W. B., LONGWORTH A. R. Cytological aspects of the mode of action of chlorhexidine. **J. Pharm. Pharmocol.**, v. 17, p. 28-32, 1965.

47. INGLE J. I., MULLANEY T. A., GRANDICH R. A., TAITOR J. F., FAHID A. Endodontic cavity preparation, In: **INGLE J. I., TAINTER J. F., eds. Enodontics**, 3rd edn. Philadelphia, PA, USA: Lea and Febiger, p. 102-255, 1985.

48. JEANSONNE M. J., WHITE R. R. A comparasion of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. **J. Endodon.**, v. 20, p. 276-8, 1994.

49. JUNG S., SAFAVI K., SPANGBERG L. The effectiveness of chlorhexidine in the prevention of root canal reinfection. **J. Endodon.**, v. 28, p. 288, 1999.

50. KAKEHASHI S., STANLEY H. R., FITZGERALD R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg.**, v. 20, p. 340-9, 1965.

51. KAULFMAN A. Y., KEILA S. Hypersensivity to sodium hypochlorite. **J. Endodon.**, v.15, p. 224-6, 1989.

52. KELTJENS H. M., SCHAEKEN M. J., van der HOEVEN J. S., HENDRIKS J. C. Effects of chlorhexidine gel on periodontal health of abutment teeth in patients with overdentures. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 2, p. 71-4, 1991.

53. KOMOROWSKI R., GRAD H., WU X. Y., FRIEDMAN S. Antimicrobial substantivity of chlorexidine treated bovine root dentin. **J. Endodon.**, v. 6, p. 315-17, 2000.

54. KUTTLER Y. **Endodoncia práctica**. México, Alpha, p.3, 1961.

55. LEONARDO M. R., TANOMARU FILHO M., SILVA L. A. B., NELSON FILHO P., BONIFÁCIO K. C., ITO I. Y. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. **J. Endodon.**, v. 3, p. 167-71, 1999.

56. MAcCOMB D., SMITH D. C. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. **J. Endodon.**, v. 1, p. 238-42, 1975.

57. MARSH P., MARTIN M. **Oral Microbiology**. 3rd edn. London, UK: Chapman & Hall, 1992.

58. MATUSOW R. J. Endodontic cellulits "flare up". Case report. **Aust. Dent. J.**, v. 40, p. 36-8, 1995.

59. MILLER, W. D. The microorganisms of the human mouth. 1st edn. Philadelphia, PA, USA: SS White Dental Mfg.Co., 1894.

60. MIYAMOTO T., TAKAHASHI S., ITO H., INAGAKI H., NOISHIKI Y. Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 23, p. 125-33, 1989.

61. MOLANDER A., REIT C., DAHLÉN G., KVIST T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, v. 31, p. 1-7, 1998.

62. MÖLLER A. J. R. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth; methodological studies. **Odontol. Tidskr.**, v. 74, p. 1-380, 1966.

63. MÖLLER A. J. R., FABRICIUS L., DAHLÉN G., ÖHMAN A. E., HEYDEN, G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 89, p. 475-84, 1981.

64. MORSE DR. Microbiology and Pharmacology. **In: COHEN S. & BURNES R. C.** Ed. Pathaways of the pulp. 4th ed. St. Louis, MO, USA: CV Mosby Co.; 1987.

65. MULLANEY T. P. & PETRICK J. D. The ledge root canals: cause, prevention and corretion. **J. Ky. Dent. Ass.**, v. 20, p. 15-8, 1968.

66. OHARA P. K., TORABINEJAD M., KETTERING J. D. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. **Endod. Dent. Traumatol.**, v. 9, p. 95-100, 1993.

67. OOSTERWAAL P. J., MIKX F. H., van den BRINK, RENGGLI H. H. Bactericidal concentrations of chlorhexidine-digluconate, amine fluoride gel and stannous fluoride gel for subgingival bacteria tested in serum at short contact times. **J. Periodontol. Res.**, v. 24, p. 155-60, 1989.

68. PASHLEY E. L. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. **J. Endodon.**, v. 11, p. 525-8, 1985.

69. PEREZ F., CALAS P., FALGUEROLLES A., MAURETTE A. Migration of a *Streptococcus sanguis* strain through root dental tubules. **J. Endodon.**, v. 19, p. 297-301, 1993.

70. RANTA K. T., HAAPASALO M., RANTA H. Monoinfection of root canal with Pseudomonas aeruginosa. **Endod. Dent. Traumatol.**, v. 4, p. 269-72, 1988.

71. RAPHAEL D., WONG T. A., MOODNIK R., BORDEN B. G. The effect of temperature on the bactericidal efficiency of sodium hypochlorite. **J. Endodon.**, v. 7, p. 330-4, 1981.

72. RINGEL A. M., PATTERSON S. S., NEWTON C. W., MILLER C. H., MULHERN J. M. *In vivo* evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. **J. Endodon.**, v. 8, p. 200-4, 1982.

73. ROGERS G. O. Bacteria in teeth. **Dent. Cosmos.**, v. 20, p. 181, 1878.

74. RÖLLA G., LÖE H., SCHIOTT C. R. The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins. **J. Periodont.**, v. 5, p. 90-5, 1970.

75. RÖLLA G., MELSEN B. On the mechanism of the plaque inhibition by clhorhexidine. **J. Dent. Res. Special Issue.**, v. b, p. B57-62, 1975.

76. SABALA C. L., POWELL S. E. Sodium hypochlorite injection into periapical tissues. **J. Endodon.**, v. 15, p. 490-2, 1989.

77. SCHNEIDER S. W. A comparasion of canal preparations in straight and curved root canals. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 32, p. 271-5, 1971.

78. SELTZER S., BENDER B., ZIONTS M. The interrelationship of pulp and periodontal disease. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 16, p. 1474-90, 1963.

79. SHIH M., MARSHALL J., ROSEN S. The bactericidal efficiency of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 29, p. 613-9, 1970.

80. SHILDER H. Cleaning and shaping the root canal. **Dent. Clin. N. Amer.**, v. 18, n.2, p. 269-96, 1974.

81. SIMÕES W., SAMPAIO J. M. P., DEBELIAN G. J. Verificação da tolerância tecidual e poder bactericida do hipoclorito de sódio a 0,5% e 1% usados na clínica odontológica. **Rev. Paul. Odontol.**, v. 11, p. 35-8, 1989.

82. SIQUEIRA JR J. F., UZEDA M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. **J. Endodon.**, v. 23, p. 167-9, 1997.

83. SIREN E. K., HAAPASALO M. P. P., RANTA K., SALMI P., KEROUSO E. N. J. Microbiological findings and clinical treatment procedures in Endodontic cases selected for microbiological investigation. **Int. Endod. J.**, v. 30, p. 91-5, 1997.

84. SJÖGREN U., SUNDQVIST G. Bacteriological evaluation of ultrasonic root canal instrumentation. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 63, p. 366-70, 1987.

85. SJÖGREN U., HÄGGLUND B., SUNDQVIST G., WING K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. **J. Endodon.**, v.16, p. 498-504, 1990.

86. SJÖGREN U., FIGDOR D., PERSSON S., SUNDQVIST G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. **Int. Endodon.**, v. 30, p. 297-306, 1997.

87. SOUZA S. F. C. Atividade antibacteriana *in* vitro da clorexidina gel, hidróxido de cálcio e associação de ambos, utilizados como medicação intracanal em dentina bovina contaminada com *Enterococcus faecalis.* **Dissertação (Mestrado)** Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2000.

88. SPANGBERG L. S. M., ENGSTROM B., LANGELAND K. biologic effects of dental materials. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 36, p. 856-71, 1973.

89. SPANGBERG L. S. M. Endodontic Medicaments. In: Smith DC & Williams DF, eds. **Biocompatibility of Dental Materials.** 1st edn. Boca Raton, USA: CRC Press, 223-257, 1982.

90. SPERANÇA P. A., BIRAL P. R., RANALI J., VALDRIGHI G. H. I. Atividade germicida do hidróxido de cálcio. **RGO.**, v. 37, p. 346-8, 1989.

91. STEWART GG, COBE HM, RAPPORT H. A study of a new medicament in the chemo-mechanical preparation of infected root canals. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 63, p. 33-7, 1961.

92. SUNDQVIST G. Bacterial studies of necrotic pulps. Sweden, 1976. Dissertation n.7, Umea University Odontological apud MORSE, D.R. Endodontic microbiology in the 1970s. **Int. Endodon. J.**, v. 14, p. 69-79, 1981.

93. SUNDQVIST G. Association between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 7, p. 257-62, 1992a.

94. SUNDQVIST G. Ecology of the root canal flora. **J. Endodon.**, v. 9, p. 427-30, 1992b.

95. SUNDQVIST G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. **Oral Surg.**, v. 78, p. 522-30, 1994.

96. SUNDQVIST G., FIDGOR D., PERSSON S., SJÖGREN U. Microbiologic analysis of teeth with failed Endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 85, p. 86-93, 1998.

97. TAKAHASHI K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. **Int. Endodon. J.**, v. 31, p. 311-25, 1989.

98. TANI-ISHII N., WANG C. Y., TANNER A., STASHENKO P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. L9, p. 129-35, 1994.

99. TANOMARU FILHO M.,LEONARDO M. R., SILVA L. A. B., ANÍBAL F. F., FACCIOLI L. H. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. **Int. Endodon. J.**, v. 35, p. 735-39, 2002.

100. THÉ S. D. The solvent action of sodium hypochlorite on fixed and unfixed necrotic tissue. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 47, p. 558-61, 1979.

101. UNSAL E., AKKAYA M., WALSH T. F. Influence of single application of subgingival chlorhexidine gel or tetracycline paste on the clinical parameters of adult periodontitis patients. **J. Clin. Periodontol.**, v. 21, p. 351-5, 1994.

102. VAHDATY A., PITT FORD T. R., WILSON R. F. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. **Endodon. Dent. Traumatol.**, v. 9, p. 243-8, 1993.

103. VIVACQUA GOMES N., FERRAZ C. C. R., GOMES B. P. F. A., ZAIA A. A., TEIXEIRA F. B, SOUZA FILHO F. J. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. . **Int. Endodon. J.**, v. 35, p. 791-95, 2002.

104. WALKER, A. Definitive and dependable therapy for pulpless teeth. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.23, p.1418-24, 1936.

105. WALTON, R. E., ARDJAMAND, K. Histological evaluation of the presence of bacteria in induce periapical lesions in monkeys. **J. Endodon.**, v.18, p.216-21, 1992.

106. WEINE F. S. Endodontic Therapy. 4th edn. St Louis, MO, USA: **The CV Mosby Co.**, 1989.

107. WHITE R. R., GOLDMAN M., LIN P. The influence of the smeared layer upon dentinal tubule penetration by plastic materials. **J. Endodon.**, v.10, p.558-62, 1984.

108. WHITE R. R., HAYS G. L., JANER L. R. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with clhorhexidine. **J. Endodon.**, p.229, 1997.

109. WITTGOW JR W.C., SABISTON JR C.B. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. **J. Endodon.**, v.1, p.168-71, 1975.

110. YOSHIDA M., FUKUSHIMA H., YAMAMOTO K., OGAMA K., TODA T., SAGAWA H. Correlation between clinical symptoms & microorganisms isolated from root canals with periapical pathosis. **J. Endodon.**, v. 13, p. 24-8, 1987.

ANEXOS

ANEXO I – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

UNICAMP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do *Gel de Clorexidina 2%* usado como irrigante endodôntico contra *Enterococcus faecalis e Porphyromonas endodontalis* ", sob o protocolo nº **050/2001**, do Pesquisador ***Fábio Roberto Dametto***, sob a responsabilidade do Prof. Dr. **Caio Cezar Randi Ferraz**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.

Piracicaba, 09 de agosto de 2001

We certify that the research project with title "*In vitro* evaluation of antimicrobial action of the 2% gel chlorhexidine used as intracanal irrigation against *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas endodontalis*", protocol nº **050/2001**, by Researcher ***Fábio Roberto Dametto***, responsibility by Prof. Dr. **Caio Cezar Randi Ferraz**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Resarch at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, August 09 2001

Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

ANEXO II – Contagem das unidades formadoras de colônias nos tempos estudados e as porcentagens relativas.

		Clorexidina gel			
	UFC Inicial	**UFC Pós-tratam.**	**% Pós/Inicial***	**UFC Final**	**% Final/Inicial****
	1670000	0	0	0	0
	1918000	0	0	0	0
	66000	0	0	0	0
	832000	0	0	0	0
	127000	0	0	0	0
	390000	0	0	0	0
	220000	0	0	0	0
	198000	0	0	0	0
	374000	0	0	0	0
	14000	0	0	0	0
	362000	0	0	0	0
	362000	0	0	0	0
	68000	0	0	0	0
	14000	0	0	0	0
	14000	0	0	0	0
	42000	0	0	0	0
	54000	0	0	0	0
	42000	0	0	0	0
	62000	0	0	0	0
	106000	0	0	0	0
Médias	**346750**	**0**	0	**0**	0

* *Porcentagem de* UFC *pós-tratamento em relação à contagem inicial.*
** *Porcentagem de* UFC *final em relação à contagem inicial.*

		Clorexidina líquida			
	UFC Inicial	UFC Pós-tratam.	% Pós/Inicial*	Final	% Final/Inicial**
	146000	0	0	0	0
	658000	0	0	0	0
	98000	0	0	0	0
	68000	0	0	0	0
	106000	0	0	0	0
	56000	0	0	0	0
	172000	0	0	0	0
	338000	2	1.18	0	0
	66000	0	0	0	0
	142000	0	0	0	0
	168000	0	0	0	0
	906000	0	0	0	0
	492000	0	0	0	0
	432000	0	0	0	0
	208000	0	0	0	0
	1910000	0	0	0	0
	1122000	0	0	0	0
	400000	0	0	0	0
	614000	0	0	0	0
	364000	0	0	0	0
Médias	**423300**	**0**	0	**0**	0

	UFC Inicial	Hipoclorito de sódio UFC Pós-tratam.	% Pós/Inicial*	Final	% Final/Inicial**
	78000	2000	2.56	390000	500
	312000	0	0	254000	81.41
	702000	0	0	30000	4.27
	664000	0	0	12000	1.81
	264000	0	0	8000	3.03
	22000	0	0	252000	1145.45
	6000	0	0	146000	2433.33
	8000	0	0	14000	175
	92000	2000	2.17	274000	297.83
	156000	0	0	414000	265.38
	62000	0	0	138000	222.58
	114000	0	0	58000	50.88
	26000	0	0	0	0
	44000	0	0	14000	31.82
	82000	0	0	14000	17.07
	2000	0	0	12000	600
	44000	0	0	6000	13.64
	72000	0	0	24000	33.33
	136000	0	0	28000	20.59
	186000	0	0	70000	37.63
Médias	**153600**	**200**	0.13	**107900**	70.25

		Água destilada			
	UFC Inicial	UFC Pós-tratam.	% Pós/Inicial*	Final	% Final/Inicial**
	8000	0	0	2000	25
	34000	2000	5.88	4000	11.76
	34000	0	0	4000	11.76
	28000	0	0	8000	28.57
	6000	0	0	2000	33.33
	6000	0	0	2000	33.33
	36000	0	0	2000	5.56
	70000	4000	5.71	232000	331.43
	66000	10000	15.15	232000	351.52
	34000	0	0	36000	105.88
Médias	**32200**	**1600**	4.97	**52400**	162.73

		Natrosol			
	UFC Inicial	UFC Pós-tratam.	% Pós/Inicial*	Final	% Final/Inicial**
	44000	8000	18.18	94000	213.64
	8000	0	0	4000	50
	18000	0	0	2000	11.11
	28000	0	0	12000	42.86
	544000	18000	3.31	24000	4.41
	48000	2000	4.17	0	0
	2000	0	0	14000	700
	202000	22000	10.89	170000	84.16
	262000	104000	39.69	72000	27.48
	10000	4000	40	2000	20
Médias	**116600**	**15800**	13.55	**39400**	33.79