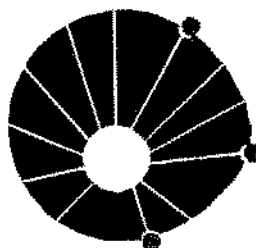


FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



UNICAMP

CAIO CEZAR RANDI FERRAZ

cirurgião-dentista

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO GEL DE CLOREXIDINA
USADO COMO IRRIGANTE ENDODÔNTICO**

Tese apresentada ao Curso de Clínica
Odontológica, Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Título de Dotor em Ciências.

PIRACICABA

- 1999 -

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CAIO CEZAR RANDI FERRAZ

cirurgião-dentista

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO GEL DE CLOREXIDINA
USADO COMO IRRIGANTE ENDODÔNTICO**

Orientadora: Profa. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

Tese apresentada ao Curso de Clínica
Odontológica, Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Título de Dotor em Ciências.

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG. 09/08/1999

Brenda Paula F. de Almeida
Assinatura do Orientador

PIRACICABA

- 1999 -



UNIDADE:	YBC
Nº DE:	
V:	
TOTAL:	20/38466
PROD:	229/99
8	☐
9	☒
PROD:	2911,00
DATA:	24/08/99
Nº CPD:	

CM-00125612-0

Ficha Catalográfica

F413a

Ferraz, Caio Cezar Randi.

Avaliação *in vitro* do gel de clorexidina usado como irrigante endodôntico. / Caio Cezar Randi Ferraz. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 1999.

141p. : il.

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

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Irrigação. 3. Bactérias. 4. Clorexidina. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 26 de Julho de 1999, considerou o candidato CAIO CEZAR RANDI FERRAZ aprovado.

1. Profa. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

2. Profa. Dra. MARCIA CARNEIRO VALERA

Marcia Carneiro Valera

3. Profa. Dra. SILVANA CAI

Silvana Cai

4. Prof. Dr. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

Alexandre Augusto Zaia

5. Prof. Dr. FRANCISCO JOSE DE SOUZA FILHO

Francisco Jose de Souza Filho

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

*aos meus pais, **ANTONIO MARCUS E VERA**,
pelo amor, e pelos exemplos de honestidade e de
luta.*

À GABRIELA, pelo amor, companheirismo, paciência e inspiração.

Aos meus irmãos, MARCUS e FLÁVIA, por todos os momentos já vividos.

Às minhas sobrinhas, MAÍRA e INAÊ, pelas quais tentamos criar um mundo melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço

à DEUS,

por iluminar o meu caminho.

*À minha orientadora, **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, pelos exemplos, competência e dedicação profissional.*

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, de quem recebi o apoio necessário para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury, coordenadora geral do curso de pós-graduação da FOP/UNICAMP.

À Profa. Dra. Mônica Campos Serra, coordenadora do curso de pós-graduação em Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho, responsável pela área de Endodontia da FOP/UNICAMP, pela amizade, confiança e exemplo.

Aos Professores Dr. Alexandre Zaia, Dr. Fabrício Batista Teixeira, Dr. Luiz Valdrighi e Dr. Joélis Pupo, da área de Endodontia, pelo companheirismo, estímulo e apoio constantes.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, da área de Farmacologia, pelo apoio dado ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos estimados amigos do curso de pós-graduação em Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP.

À Kéli Cristina de Carvalho, Morgana Ele Vianna e Vanessa Bellocchio Berber, pelo apoio e colaboração inestimável.

Aos funcionários da Disciplina de Endodontia Denize L. de Pinho, Maria Aparecida Buscariol, Rubens Marques Payão e Adailton dos Santos Lima, pela convivência e pelo auxílio em meus trabalhos diários.

*Á todos que de alguma forma contribuíram para a
realização deste trabalho.*

SUMÁRIO

SUMÁRIO

CAPÍTULO

Página

	LISTAS	1
I.	Tabelas	2
II.	Figuras	3
	RESUMO	5
1.	INTRODUÇÃO	7
2.	REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1	Microbiota dos canais radiculares infectados	10
2.1.1	Grupos bacterianos	13
2.1.2	Rotas de acesso dos microrganismos aos canais radiculares	18
2.1.3	Associação de bactérias com os aspectos clínicos de origem endodôntica	19
2.2	Controle da infecção endodôntica	21
2.2.1	Influência da <i>smear layer</i> nas diversas fases do tratamento endodôntico	31
2.2.1.1	No preparo químico-mecânico	31
2.2.1.2	Na obturação dos canais radiculares	35
2.3	O presente estudo	36
3.	PROPOSIÇÃO	37
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	39

CAPÍTULO**Página**

4.1	Atividade antimicrobiana de irrigantes endodônticos através de difusão em ágar	40
4.1.1	Materiais	40
4.1.1.1	Microrganismos	40
4.1.1.1.1	Aeróbios	40
4.1.1.1.2	Anaeróbios facultativos	41
4.1.1.1.3	Anaeróbios estritos	41
4.1.1.2	Meios de cultura	41
4.1.1.3	Irrigantes testados	42
4.1.2	Métodos	43
4.1.2.1	Preparação do inóculo	43
4.1.2.2	Preparo das camadas de ágar e do inóculo	44
4.1.2.2.1	Bactérias aeróbias, facultativas e levedura	45
4.1.2.2.2	Bactérias anaeróbias estritas	46
4.1.2.3	Colocação dos tubos de inox sobre a superfície do ágar	47
4.1.2.4	Incubação	47
4.1.2.5	Leitura dos halos de inibição	49
4.1.2.6	Análise Estatística	51

CAPÍTULO**Página**

4.2	Atividade antibacteriana do digluconato de clorexidina gel a 0,2% e 2%, e de várias concentrações de hipoclorito de sódio contra <i>Enterococcus faecalis</i> em diferentes tempos de exposição	51
4.2.1	Materiais	51
4.2.1.1	Microrganismo	51
4.2.1.2	Meios de cultura	51
4.2.1.3	Irrigantes testados	52
4.2.2	Métodos	53
4.2.2.1	Preparação do inóculo	53
4.2.2.2	Efeito antibacteriano dos irrigantes testados	53
4.3	Contaminação <i>in vitro</i> dos canais radiculares com <i>E. faecalis</i> , capacidade de eliminação de <i>E. faecalis</i> e de remoção de <i>smear layer</i> pelos irrigantes endodônticos	56
4.3.1	Preparo dos dentes	56
4.3.2	Contaminação <i>in vitro</i> com <i>E. faecalis</i>	58
4.3.3	Ação antibacteriana dos irrigantes endodônticos no interior dos canais radiculares infectados <i>in vitro</i>	59
4.3.3.1	Análise Estatística	61
4.3.4	Remoção da <i>smear layer</i> pelos irrigantes endodônticos	62

5.	RESULTADOS	63
5.1	Atividade antimicrobiana de irrigantes endodônticos através de difusão em ágar	64
5.1.1	Digluconato de clorexidina	64
5.1.2	Hipoclorito de sódio	66
5.1.3	Digluconato de clorexidina vs hipoclorito de sódio	67
5.2	Atividade antibacteriana do digluconato de clorexidina gel a 0,2% e 2%, e de várias concentrações de hipoclorito de sódio contra <i>Enterococcus faecalis</i> em diferentes tempos de exposição.....	71
5.3	Contaminação <i>in vitro</i> dos canais radiculares com <i>E. faecalis</i> , capacidade de eliminação de <i>E. faecalis</i> e de remoção de smear layer pelos irrigantes endodônticos	72
5.3.1	Eliminação do <i>E. faecalis</i> de dentes contaminados <i>in vitro</i> ..	72
5.3.2	Avaliação, em microscopia eletrônica de varredura, da remoção de <i>smear layer</i> pelos irrigantes testados	75
6.	DISCUSSÃO	80
6.1	Atividade antimicrobiana de irrigantes endodônticos através de difusão em ágar	82
6.2	Atividade antimicrobiana do digluconato de clorexidina gel a 0,2% e 2%, e do hipoclorito de sódio a 5,25% contra <i>Enterococcus faecalis</i> em diferentes tempos de exposição.	87

CAPÍTULO

Página

6.3	Contaminação <i>in vitro</i> dos canais radiculares com <i>E. faecalis</i> , capacidade de remoção de <i>smear layer</i> e da eliminação de <i>E. faecalis</i> pelos irrigantes endodônticos.....	88
6.3.1	Eliminação de <i>E. faecalis</i> de dentes contaminados <i>in vitro</i>	88
6.3.2	Capacidade de remoção de <i>smear layer</i>	90
7.	CONCLUSÕES	93
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	95
	SUMMARY	96
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
	ANEXOS	124
	Anexo I - Meios de cultura	125
	Anexo II – Kit de identificação microbiana	126

LISTAS

	LISTA DAS TABELAS	Página
1.1.	Bactérias comumente isoladas de polpas necróticas infectadas.	17
5.1.	Média dos halos de inibição dos microrganismos testados, em milímetros, quando expostos ao digluconato de clorexidina, líquido e gel, em diferentes concentrações.	65
5.2.	Média dos halos de inibição dos microrganismos testados, em milímetros, quando expostos à diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.	66
5.3.	Análise estatística da média das zonas inibição (em mm) criada por cada irrigante contra todos os microrganismos avaliados, pelo teste ANOVA.	70
5.4.	Tempo necessário para obtenção de culturas negativas após exposição ao agente irrigante.	72
5.5.	Turbidez do meio de BHI na coleta "pós-tratamento" (n=20). Grupo controle (água destilada) n=5.	74
Anexo 1.4	Tabela de interpretação do API 20 Strep	141

LISTA DAS FIGURAS	Página
4.1. A: suspensão microbiana; B-C: semeadura; D: colocação dos cilindros de aço-inox sobre a camada <i>seed</i> ; E- preenchimento dos cilindros com as substâncias testes; F: incubação.	48
4.2. Halos de inibição de crescimento de <i>S. sanguis</i> quando em contato com gel de clorexidina 2% (A-B) e com gel de clorexidina 1% (C-D-E).	50
4.3. Halo de inibição de crescimento de <i>P. endodontalis</i> quando em contato com gel de clorexidina 2%.	50
4.4. Identificação de bactéria após o período de incubação de 7 dias através do kit de identificação Api 20 Strep, confirmando a presença de <i>E. faecalis</i> .	55
5.1. Média das zonas de inibição (em mm) criada por cada irrigante contra todos os microrganismos testados.	68
5.2. <i>E. faecalis</i> nas paredes do canal radicular e no interior de túbulo dentinário após o período de 7 dias de contaminação <i>in vitro</i> .	73

		Página
5.3.	Superfície do terço médio do canal radicular após tratamento com NaOCl 5,25% + EDTA 17% em ultrassom. Superfície limpa, totalmente livre de <i>smear layer</i> .	75
5.4.	Superfície do terço médio do canal radicular de dente irrigado com água destilada. Superfície recoberta por espessa camada de <i>smear layer</i> .	76
5.5.	Superfície do terço médio do canal radicular de dente irrigado com gel de clorexidina 2%. Superfície quase que totalmente livre de <i>smear layer</i> , com a maioria dos túbulos dentinários abertos.	77
5.6.	Superfície do terço médio do canal radicular de dente irrigado com de clorexidina líquida a 2%. Superfície recoberta por fina camada de <i>smear layer</i> , com as aberturas dos túbulos dentinários sendo identificadas pela presença de trincas.	78
5.7.	Superfície do terço médio do canal radicular de dente irrigado NaOCl 5,25%. Superfície quase totalmente recoberta com <i>smear layer</i> , com apenas alguns túbulos evidentes.	79

RESUMO

RESUMO

O papel dos microrganismos no desenvolvimento de alterações inflamatórias periapicais tem sido claramente demonstrado. Mecanismos de defesa do hospedeiro dificilmente atingem as bactérias que se estabelecem no sistema de canais radiculares. Sendo assim, as infecções endodônticas devem ser tratadas por procedimentos mecânicos auxiliados por substâncias químicas. A clorexidina, em várias concentrações, tem sido usada na endodontia tanto como solução irrigadora como medicação intracanal. Muita atenção tem sido dada às propriedades químicas das soluções irrigadoras, porém pouco tem se estudado a fim de melhorar sua ação mecânica. Na endodontia, a clorexidina gel tem sido usada apenas como medicação intracanal, apresentando bons resultados, não havendo trabalhos utilizando-a como irrigante. Portanto, a proposta deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, o gel de clorexidina como irrigante endodôntico, verificando se este possui algumas das propriedades necessárias a um irrigante endodôntico considerado ideal. O gel de clorexidina foi avaliado juntamente com outros irrigantes comumente utilizados em Endodontia (hipoclorito de sódio e clorexidina líquida), através do teste de difusão em ágar. Dos irrigantes testados, o gel de clorexidina foi o que criou maiores halos inibição de crescimento contra microrganismos freqüentemente encontrados na microbiota endodôntica; além de apresentar maior capacidade na remoção de *smear layer* e na eliminação de *Enterococcus faecalis* dos canais radiculares durante a instrumentação *in vitro*. Concluiu-se que a clorexidina gel tem potencial para ser utilizada como irrigante endodôntico.

PALAVRAS-CHAVE: Tratamento Endodôntico; Irrigação; Bactérias; Gel de Clorexidina.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O completo debridamento do canal radicular é essencial para o sucesso do tratamento endodôntico (WEINE, 1989). No entanto, nenhuma técnica endodôntica utilizada atualmente é capaz de limpar completamente restos de tecido pulpar, raspas de dentina e bactérias, que se localizam, principalmente, em irregularidades do sistema de canais radiculares (BAKER et al., 1975; McCOMB & SMITH, 1975). Por esta razão, é necessário o uso de um agente irrigante como adjunto ao preparo químico-mecânico. O irrigante deve combinar ação antimicrobiana com habilidade em dissolver tecido orgânico e inorgânico. Além disso, deve possuir pouca citotoxicidade para não agredir os tecidos periapicais caso atinjam esta região. A clorexidina líquida tem sido usada na Endodontia, como solução irrigadora e medicação intracanal (DELANY et al., 1982; RINGEL et al., 1982; JEANSONNE & WHITE, 1994). Apesar de ter excelente ação antimicrobiana e baixa citotoxicidade, o digluconato de clorexidina é pouco eficiente na dissolução de tecido orgânico (ABOU-RASS & PICCININO, 1982). A fim de incrementar a capacidade de debridamento mecânico da irrigação com clorexidina, o objetivo deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, o gel de clorexidina como irrigante endodôntico, comparando-o com outros irrigantes comumente usados clínica endodôntica.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microbiota dos canais radiculares infectados

Até o final do século XIX a Endodontia era praticada de forma empírica visando somente a remoção da dor e obturação dos canais radiculares, pois não se tinha conhecimento do papel dos microrganismos orais no desenvolvimento e perpetuação de alterações inflamatórias pulpares e periapicais.

Foi MILLER, em 1894, quem relatou a associação entre bactérias e as patologias pulpares e perirradiculares. Através da análise bacteriológica de esfregaços obtidos de canais radiculares pôde se observar grande variedade de células bacterianas, compreendendo os três tipos morfológicos conhecidos: cocos, bacilos e espirilos. MILLER também observou que as bactérias orais são capazes de quebrar carboidratos da dieta pela produção de ácidos, os quais podem causar dissolução do esmalte. Portanto, estas bactérias têm capacidade de, não só, entrar na lesão inicial do esmalte, mas também de continuar o

processo de destruição das estruturas dentais atingindo a polpa dental (EVANS, 1994). Bactérias foram então associadas com a polpa necrótica, sendo consideradas os principais agentes das doenças pulpares, periapicais e periodontais.

Anos mais tarde, o papel da bactéria na etiopatogenia das lesões pulpares e perirradiculares foi confirmado. KAKEHASHI et al. (1965, 1969), utilizando ratos convencionais e *germ-free*, demonstraram que o tecido pulpar exposto ao meio bucal torna-se necrótico na presença de bactérias, com desenvolvimento de inflamação crônica e, eventualmente, granuloma periapical. Por outro lado, em ambiente *germ-free*, a resposta da polpa exposta foi caracterizada pela presença mínima de inflamação e formação de pontes dentinárias.

Antes de 1970, os microrganismos predominantemente encontrados nos canais radiculares dentais eram as bactérias anaeróbias facultativas pertencentes ao grupo dos estreptococos. No entanto, estes estudos foram realizados sem o conhecimento das técnicas anaeróbias, as quais foram desenvolvidas anos mais tarde. Outros organismos freqüentemente isolados incluíam os enterococos, micrococos, difteroides, estafilococos, lactobacilos, bactéria entérica, *Candida*, *Neisseria* e *Veillonella* (MORSE, 1987).

SUNDQVIST, em 1976, investigou achados microbiológicos de 32 dentes traumatizados com polpa necrótica e coroas intactas usando técnicas anaeróbias estritas, verificando incidência de 90% de anaeróbios do total das cepas isoladas. Em estudos prévios, a proporção das espécies anaeróbias isoladas variou bastante, desde 24% (BROWN & RUDOLPH, 1957) até 64% (KEUDELL et al., 1976). Entretanto, a baixa incidência de bactérias anaeróbias em tais estudos, quando comparados com o de SUNDQVIST, pode refletir a natureza das amostras, que incluíam dentes com cáries, com exposição pulpar mecânica ou por fratura. Por outro lado, o de SUNDQVIST, avaliou dentes sem cáries, restaurações, fraturas e nem defeitos no esmalte, que pudessem causar exposição da polpa a bactérias da placa ou ao oxigênio.

Achados recentes indicam que certas espécies bacterianas anaeróbias estritas estão envolvidas com o desenvolvimento de alguns aspectos clínicos de origem endodôntica (YOSHIDA et al., 1987; GOMES et al. 1994a, 1996a,b).

GROSSMAN (1981), entretanto, questionou o significado dos anaeróbios estritos no tratamento endodôntico, já que estas bactérias seriam rapidamente destruídas quando em contato com o ar, instrumentos e agentes químicos

utilizados durante a terapia endodôntica. Porém, o papel das bactérias anaeróbias, principalmente as Gram-negativas, no desenvolvimento das doenças pulpare e periapicais é evidente, apesar de serem mais suscetíveis, que os facultativos, à terapia endodôntica (GOMES et al. 1996c). Além disso, enquanto alguns anaeróbios estritos são rapidamente destruídos à exposição do oxigênio atmosférico, outros podem apenas cessar o crescimento até que as condições anaeróbias sejam restauradas, não sendo destruídos. As infecções anaeróbias ocorrem na presença de tecido necrótico, suprimento sangüíneo comprometido e após infecções por aeróbios e anaeróbios facultativos capazes de diminuir o potencial de óxido-redução nos tecidos (SUNDQVIST, 1992a; SUNDQVIST, 1994).

2.1.1 Grupos bacterianos

Mais de 300 espécies bacterianas são reconhecidas atualmente na microbiota normal da cavidade oral, sendo potenciais infectantes dos canais radiculares. Entretanto, apenas um grupo restrito de espécies, com cerca de 56 gêneros bacterianos, são capazes de colonizar o canal radicular (GOMES, 1995). Vários fatores promovem a seleção das bactérias dos canais radiculares,

dentre eles se incluem fatores nutricionais, baixo potencial de óxido-redução, pH, temperatura, interações positivas e antagonismos entre bactérias, resistência do hospedeiro e presença de agentes antimicrobianos e inibidores. Estes fatores tendem a favorecer o crescimento de espécies anaeróbias (BERGENHOLTZ & CRAWFORD, 1989; MARSH & MARTIN, 1992).

Por se localizar em um ambiente fechado, a polpa dental é normalmente deficiente em carboidratos. Com isso, bactérias assacarolíticas capazes de fermentar aminoácidos e peptídeos são capazes de se desenvolverem com mais facilidade do que bactérias sacarolíticas. Além dos substratos para fermentação, bactérias podem utilizar produtos finais de outros microrganismos como nutrientes (GRENIER & MAYRAND, 1986) em processo denominado sintropia, que ocorre, por exemplo, com bactérias do gênero *Veillonella* que consomem ácido láctico produzido como produto final do metabolismo de outras espécies orais (MARSH & MARTIN, 1992).

Durante o curso da evolução da infecção pulpar ocorrem interações entre espécies microbianas. Associações resistentes de interdependência mútua proporcionam mudanças consideráveis na microbiota endodôntica. Estas associações são provavelmente baseadas em demandas de relações

nutricionais. A patogenicidade da microbiota polimicrobiana do canal radicular é potencializada pelo sinergismo bacteriano (SUNDQVIST, 1994; GOMES et al., 1994b). As interações bacterianas podem ainda, ser o elemento chave para o crescimento e sobrevivência dos organismos no seu *habitat*. Outras interações podem ocorrer entre o hospedeiro e bactéria, ou então, entre uma ou várias bactérias específicas e aspectos clínicos (GOMES et al., 1994a; 1996a,b). Por outro lado, as interações bacterianas podem ter efeito negativo na própria população microbiana, inibindo um grupo particular de espécies e talvez aumentando as chances dos sistemas de defesa do hospedeiro reagir contra agente infeccioso e restaurar a saúde (GOMES, 1996c).

Os microrganismos mais freqüentemente isolados dos canais radiculares são os facultativos *Streptococcus* e as espécies relacionadas tais como *Enterococcus* e *Gemella*; e os anaeróbios estritos como *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* e *Eubacterium* spp., *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Veillonella* e *Capnocytophaga*. Também são isolados com freqüência *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eikenella*, *Staphylococcus*, *Mitsuokella* e *Wolinella* spp. Ocasionalmente é relatada a presença dos seguintes organismos facultativos: *Enterobacter*, *Bacillus*, *Tissierella*, *Campylobacter* e *Actinobacillus*. Mais

raramente isolados são os facultativos *Hafnia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Aerobacter* e *Alcaligenes*; e os aeróbios *Mycobacteria*, *Nocardia*, *Mima*, *Pseudomonas* e *Micrococcus*. *Hafnia* não é normalmente encontrada na boca, mas pode ter chegado como um contaminante da água usada nas tubulações do equipo odontológico (MORSE, 1987; SUNDQVIST, 1994).

Espiroquetas presentes em canais radiculares de dentes envolvidos periodontalmente já foram observadas através da microscopia de campo escuro (THILO et al., 1986) e microscopia de varredura (NAIR, 1987) na polpa necrótica. O fastidioso *Mycoplasma* (SERENE & ANDERSON, 1967) e o aeróbio *Candida* (KAUFMAN & HENIG, 1976) foram também isolados dos canais radiculares.

Bactérias não identificadas foram encontradas em vários estudos (KANTZ & HENRY, 1974; SUNDQVIST, 1976; ZAVISTOSKI et al., 1980; BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1983; 1985; SUNDQVIST et al., 1989; HAAPASALO, 1989; SATO et al., 1983).

Tabela 1.1 mostra as bactérias mais freqüentemente isoladas de canais radiculares dentários infectados.

Tabela 1.1. Bactérias comumente isoladas de polpas necróticas infectadas

	GÊNERO	Espécies/Grupos comuns
Bactérias Anaeróbias		
Estritas		
Bastonetes Gram-negativos	<i>Porphyromonas</i>	<i>P. gingivalis</i> , <i>P. endodontalis</i> ,
	<i>Prevotella</i>	<i>P. oralis</i> , <i>P. oris</i> , <i>P. buccae</i> ,
		<i>P. intermedia</i> , <i>P. melaninogenica</i>
	<i>Fusobacterium</i>	<i>F. nucleatum</i> , <i>F. necrophorum</i>
Bastonetes Gram-positivos	<i>Selenomonas</i>	<i>S. sputigena</i>
	<i>Campylobacter</i>	<i>C. sputorum</i> , <i>C. recta</i>
	<i>Eubacterium</i>	<i>E. alactolyticum</i> , <i>E. lentum</i>
	<i>Propionibacterium</i>	<i>P. acnes</i>
Cocos Gram-positivos	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. cateniforme</i> , <i>L. plantarum</i>
	<i>Actinomyces</i>	<i>A. israelii</i> , <i>A. viscosus</i>
	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>P. anaerobius</i> , <i>P. micros</i> , <i>P. prevotii</i> ,
Cocos Gram-negativos	<i>Veillonella</i>	<i>P. magnus</i>
		<i>V. parvula</i>
Bactérias Anaeróbias		
Facultativas		
Cocos Gram-positivos	<i>Streptococcus</i>	<i>S. mitis</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>S. constellatus</i> ,
		<i>S. intermedius</i> , <i>S. oralis</i>
Bastonetes Gram-negativos	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
	<i>Eikenella</i>	<i>E. corrodens</i>
Cocos Gram-negativos	<i>Capnocytophaga</i>	<i>C. gingivalis</i>
	<i>Neisseria</i>	<i>N. sicca</i> , <i>N. flava</i>
Bastonetes Gram-positivos	<i>Corynebacterium</i>	<i>C. xerosis</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>
	<i>Actinomyces</i>	<i>A. naeslundii</i>
	<i>Propionibacterium</i>	<i>P. propionicum</i>

2.1.2 Rotas de acesso dos microrganismos aos canais radiculares

A infecção do espaço pulpar é normalmente uma extensão da contaminação oral. Existem diferentes rotas de acesso para que microrganismos orais atinjam a polpa tais como exposições diretas da polpa ao meio bucal após traumas, exposição de túbulos dentinários, canais acessórios, forame apical e até mesmo via circulação sistêmica (anacorese) (OGUNTEBI, 1994). Porém, a via mais comum de contaminação é a cárie dental, induzindo sucessivas respostas inflamatórias no tecido pulpar, culminando com a necrose, caso não sejam adotadas medidas terapêuticas (SUNDQVIST, 1992a).

Bactérias Gram-positivas predominam nos processos cariosos. Entre os organismos mais encontrados destacam-se os anaeróbios facultativos tais como lactobacilos, *Streptococcus oralis* e *S. anginosus* (HAHN et al., 1991). Mesmo com o desenvolvimento da tecnologia anaeróbia, não houve aumento no isolamento de bactérias anaeróbias estritas nas lesões cariosas, como ocorreu nos canais radiculares contaminados (SUNDQVIST et al., 1989). Já é bem estabelecido que mesmo sem a exposição direta da polpa dental ao meio bucal, microrganismos e seus subprodutos são capazes de atingi-la através dos túbulos dentinários.

NAGAOKA (1995) observou que a polpa dental pode ser infectada mesmo quando ainda isolada por 0.2 mm de dentina. A infecção, no entanto, depende da condição pulpar. Polpas sadias podem eliminar infecções transitórias de algumas poucas bactérias pois, prolongamentos odontoblásticos, matriz extracelular e fluido dentinário dificultam a penetração bacteriana nos túbulos dentinários dos dentes vitalizados. Entretanto, se os mecanismos de defesa da polpa estiverem comprometidos, mesmo poucos organismos são capazes de causar infecção.

2.1.3 Associação de bactérias com os aspectos clínicos de origem endodôntica

Embora não tenha sido demonstrada correlação absoluta entre qualquer tipo específico de espécie bacteriana e a etiologia das alterações pulpare e periapicais, fortes evidências sugerem que as bactérias anaeróbias Gram-negativas de pigmento negro estão envolvidas no desenvolvimento da inflamação periapical aguda, e de sinais e sintomas como dor, edema e exudação (SUNDQVIST, 1976; GRIFFEE et al., 1980; HAAPASALO, 1993, GOMES et al. 1994, 1996a, b).

Microrganismos também estão relacionados com os fracassos dos tratamentos endodônticos (ENGSTRÖM & LUNDBERG, 1965). Embora a microbiota dos canais radiculares seja composta predominantemente por bactérias anaeróbias estritas, algumas bactérias anaeróbias facultativas, como *Enterococcus faecalis*, têm sido relacionadas a infecções persistentes, exercendo importante papel nas condições clínicas, como alguns casos de *flare-ups* (MATUSOW, 1995) e insucessos endodônticos (ENGSTRÖM, 1964). Desta forma, o controle da eliminação dos microrganismos e dos seus substratos é o principal objetivo da Endodontia atualmente.

2.2 Controle da infecção endodôntica

O objetivo da Odontologia como ciência é preservar e restabelecer a saúde e a função dos tecidos orais. Consequentemente a Endodontia, como área da Odontologia, deve ter o mesmo objetivo, principalmente porque o estado da polpa dental é importante para quase todas as disciplinas odontológicas (GOMES, 1995).

Existe íntima relação entre a Microbiologia e a Endodontia. Como os microrganismos estão envolvidos nas doenças pulpares e dos tecidos periapicais, e a terapia endodôntica é essencialmente um procedimento de desinfecção, é essencial que se tenha compreensão da Microbiologia para se entender as fases do preparo químico-mecânico e da obturação dos canais radiculares (WEINE, 1989).

O tratamento endodôntico é realizado para se evitar que a infecção se espalhe dos canais radiculares para os tecidos perirradiculares. Esta terapia deve ser executada em condições assépticas de maneira a evitar a introdução de contaminantes externos ao sistema de canais radiculares.

Os mecanismos de defesa do hospedeiro dificilmente atingem as bactérias que se estabelecem no sistema de canais radiculares. Sendo assim, as infecções endodônticas devem ser tratadas principalmente por procedimentos mecânicos auxiliados por substâncias químicas, capazes de remover as bactérias localizadas nos túbulos dentinários a uma pequena distância da superfície pulpar. A maioria das bactérias presentes em canais radiculares infectados, pode ser removida por estes procedimentos endodônticos de rotina. Porém, a eliminação das bactérias não ocorre totalmente na prática clínica devido às complexidades anatômicas de muitos canais radiculares, limitando a ação de agentes terapêuticos (BIFFI & RODRIGUES, 1989).

Desta forma, os microrganismos podem permanecer em ramificações e irregularidades do sistema de canais radiculares, como o interior dos túbulos dentinários. Se eles permanecerem em número suficiente e em ambiente que favoreça o seu crescimento, poderão multiplicar-se e restabelecer a contaminação clínica do espaço pulpar (BYSTRÖM et al., 1985; BERGENHOLTZ & CRAWFORD, 1989; ANDO & HOSHINO, 1990).

Estudos em microscopia eletrônica de varredura (SEN et al., 1995), usando dentes humanos recém-extraídos, observaram a presença acentuada de bactérias em forma de cocos e bastonetes, constituindo-se em colônias, principalmente nas paredes dos canais, e também, em grau variado, penetrando nos túbulos dentinários dos terços médio e apical das raízes. A profundidade atingida pelas bactérias nos túbulos dentinários foi em média de 50 μm . Somente em alguns espécimes atingiram 150 μm de profundidade. Outros estudos, como o de SIQUEIRA et al. (1996), observaram que bactérias anaeróbias também são capazes de penetrar nos túbulos dentinários em diferentes profundidades, onde não podem ser atingidas por instrumentos endodônticos.

A limpeza do canal radicular depende, portanto, não só da ação mecânica de limas e alargadores, mas também da ação de soluções irrigadoras que lubrificam o canal radicular durante a ação de corte dos instrumentos endodônticos, auxiliam na remoção de *smear layer*, além de terem potencial germicida e ação solvente sobre exudato, tecido pulpar necrosado e pré-dentina; auxiliando significativamente na redução dos depósitos microbianos nos canais radiculares (SPANGBERG, 1982). Várias soluções como o hipoclorito de sódio (NaOCl), solução fisiológica, EDTA, ácido cítrico, digluconato de clorexidina,

solução de acetato de bis-dequalenio (Salvizol), e vários outros tipos têm sido empregadas com estes propósitos, no entanto um irrigante que reúna todas as propriedades acima citadas ainda não foi encontrado.

A eficiência de uma solução irrigadora não depende apenas de sua natureza química, mas também de 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 (INGLE et al., 1985).

O hipoclorito de sódio (NaOCl), em diferentes concentrações, tem sido amplamente utilizado como irrigante desde sua introdução na Endodontia por WALKER em 1936. Além das propriedades clareadora e de dissolução de tecidos (GORDON et al., 1981), o NaOCl tem se mostrado efetivo como agente desinfetante (BLOOMFIELD & MILES, 1979).

O efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio a 0,5% como irrigante do canal radicular foi estudado em 1983 por BYSTRÖM & SUNDQVIST, em 15 dentes monorradiculares portadores de necrose pulpar com cavidades fechadas e rarefações ósseas periapicais. Como controle, os autores utilizaram irrigação com soro fisiológico em outros 15 dentes nas mesmas condições. Todos os

canais apresentaram inicialmente culturas positivas de microrganismos, totalizando 169 espécies bacterianas isoladas, sendo 80% de anaeróbios. A maioria das culturas permitiu crescimento de mais de uma espécie, com média de quatro por dente. As espécies comumente isoladas foram: *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* e "*Bacteroides*". As soluções irrigadoras foram utilizadas como auxiliares do preparo químico mecânico efetuados em cinco sessões com intervalos de 2 a 4 dias. 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 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.

No entanto, várias complicações têm sido relatadas com o uso do NaOCl durante o tratamento dos canais radiculares. A literatura contém vários casos de injeções acidentais deste irrigante em tecido periapical (BECKING, 1991; KAUFMAN & KEILA, 1989, SABALA & POWELL, 1989). Pelo fato do NaOCl 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 NaOCl nos

tecidos vitais da região periapical, e também pela reação inflamatória desencadeada (BECKING, 1991).

Além disso, a capacidade de remoção de *smear layer* do NaOCl tem se mostrado deficiente. O uso do NaOCl, durante ou 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 conseguida satisfatoriamente com o uso do NaOCl alternado com um agente quelante, como o EDTA (WHITE et al., 1984; BAUMGARTNER & MADER, 1987; CENGIZ et al., 1990). O EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetraacético) é o agente quelante mais comum, e reage com íons cálcio da dentina, formando quelatos solúveis de cálcio. O EDTA tem capacidade de descalcificar 20 a 30µm de dentina, em 5 minutos. Devido ao efeito quelante do EDTA ser deficiente no terço apical dos canais radiculares (FEHR & NYGAARD-OSTBY, 1963; FRASER, 1974), diferentes soluções tenso-ativas, como o brometo de amônio quartenário, têm sido adicionadas ao EDTA com a finalidade de reduzir sua tensão superficial e aumentar a penetrabilidade (FEHR & NYGAARD-OSTBY, 1963). Estas combinações são eficientes na remoção de *smear layer*, no entanto, a limpeza do terço apical dos canais ainda é comprometida (McCOMB & SMITH, 1975).

O digluconato de clorexidina, em concentrações variadas, tem sido muito utilizado em periodontia devido sua ação antibacteriana (UNSAL et al., 1994), tendo ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A ação antimicrobiana da clorexidina se dá pela ligação de 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. Estando em baixas concentrações, a clorexidina tem ação bacteriostática, inibindo as funções da membrana, sendo seu efeito mantido por várias horas depois da aplicação, devido sua excelente substantividade (efeito residual) (GREENSTEIN et al., 1986). Além da sua apresentação em solução, encontramos a clorexidina em dentifrícios, vernizes e em gel (LUOMA, 1992).

A clorexidina tem sido 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 é comparada ao hipoclorito de sódio devido às suas propriedades de inibir o crescimento de

bactérias comumente encontradas nas infecções endodônticas (CERVONE et al., 1990), grande substantividade (WHITE et al., 1997), e relativa ausência de citotoxicidade (OHARA et al., 1993; JEANSONNE & WHITE, 1994).

Muita atenção tem sido dada às propriedades químicas, porém pouco tem se estudado a fim 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. (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 da cárie dental devido sua ação na redução de *Streptococcus mutans* e espécies de *Lactobacillus* (EPSTEIN et al., 1991; CLARK 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 já foi estudado apenas como medicação intracanal, apresentando bons resultados (SIQUEIRA & UZEDA, 1997), não havendo trabalhos utilizando o gel de clorexidina como irrigante endodôntico. Devido sua maior viscosidade, acreditamos que a clorexidina gel possa manter o princípio ativo mais tempo na região de aplicação e auxiliar na remoção dos debris de dentina e tecido necrótico criados pela instrumentação, além de possuir propriedades químicas semelhantes a clorexidina em solução e promover maior lubrificação do canal durante o corte da dentina pelos instrumentos endodônticos. Além disso, a grande vantagem do gel de clorexidina é que a base gel utilizada, o Natrozol, tem pH entre 6,0-9,0 e é solúvel em água ou álcool (informação do fabricante – Proderma Farmácia de Manipulação Ltda. Piracicaba- SP).

É reconhecido que os efeitos antibacterianos dos procedimentos químicos-mecânicos podem ser aumentados com o uso de uma medicação intracanal, como por exemplo o hidróxido de cálcio (BYSTRÖM et al., 1985; BERGENHOLTZ & CRAWFORD, 1989; SAFAVI et al. 1990). Entretanto, a eficácia de tal tratamento dependerá da acessibilidade e da suscetibilidade dos organismos residuais (GOMES et al., 1996c).

A obturação do canal radicular é a última fase da terapia endodôntica e deve ser realizada em condições clínicas satisfatórias. A obturação deve selar hermeticamente o canal, sem trauma físico ou químico aos tecidos periapicais, de maneira a permitir o selamento biológico do canal. Se o material obturador não se dissolver nos fluidos dos tecidos periapicais ou orais (pela perda do selamento coronário), um sucesso a longo prazo é esperado (BERGENHOLTZ & CRAWFORD, 1989). Para que isso ocorra, a presença de um selamento coronário efetivo após a obturação dos canais é essencial para se evitar a recontaminação bacteriana do sistema de canais radiculares (TRONSTAD, 1991).

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).

2.2.1 Influência da *smear layer* nas diversas fases do tratamento endodôntico

2.2.1.1 No preparo químico-mecânico

A ação mecânica dos instrumentos endodônticos também é responsável pela formação de uma camada sobre a parede dentinária dos canais radiculares, denominada *smear layer*, composta por raspas de dentina, remanescentes de tecido pulpar e processos odontoblásticos e, algumas vezes, por bactérias (McCOMB & SMITH, 1975). A *smear layer*, quando observada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), possui aspecto amorfo, irregular e granular (BRANNSTRÖM et al., 1980; YAMADA et al. 1983; PASHLEY et al., 1988). McCOMB & SMITH (1975) foram os primeiros a observarem esta camada sobre a parede dentinária de canais radiculares instrumentados, relatando possuir aparência similar à *smear layer* observada após preparos cavitários, apesar desta última ser constituída apenas por raspas de dentina.

A Microscopia Eletrônica de Varredura tem sido bastante utilizada, há anos, para se avaliar a formação de *smear layer* nos canais radiculares após instrumentação endodôntica (McCOMB & SMITH, 1975; BRANNSTRÖM et al., 1980; CAMERON, 1983; MADER et al., 1984; YAMADA et al. 1983; PASHLEY et al., 1988; CZONTSKOWSKY et al., 1990, GARBEROGLIO & BECCE, 1994; BERUTTI & MARINI, 1996), além de avaliar a capacidade de debridamento de irrigantes endodônticos (BAUMGARTNER & MADER, 1987; GUTIÉRREZ et al., 1990; BERUTTI & MARINI, 1996; STEWART, 1998) e observar a distribuição de microrganismos no interior de canais radiculares infectados (NAIR, 1987; MOLVEN et al., 1991; SEN et al., 1995).

A espessura da *smear layer* é de aproximadamente 1 a 5µm (GOLDMAN et al., 1981; MADER et al., 1984). Esta espessura depende do tipo de instrumento utilizado no preparo do canal radicular e se a dentina foi cortada com ou sem irrigação (BARNES, 1974; GILBOE et al., 1980). O aumento das forças centrífugas durante a instrumentação, gerado pelo tipo de movimento e proximidade das lâminas de corte do instrumento com a dentina, produz camadas de *smear layer* mais espessas e resistentes (JODAIKIN & AUSTIN, 1981) e por isso, a quantidade de raspas produzida por instrumentos rotatórios,

como as brocas de Gates-Glidden, é maior do que a produzida pela instrumentação manual (CZONTSKOWSKY et al., 1990).

A *smear layer* pode ser dividida em 2 partes: a primeira seria a *smear layer* superficial e, a segunda, seria a porção que fica no interior dos túbulos dentinários (CAMERON, 1983; MADER et al., 1984). A penetração de *smear layer* no interior dos túbulos dentinários foi calculada como sendo em torno de 40 μm , sendo atribuída à ação de brocas e instrumentos endodônticos (BRANNSTRÖM & JOHNSON, 1974; MADER et al., 1984). No entanto, CENGIZ et al. (1990) propõem que a penetração de *smear layer* nos túbulos dentinários possa ser causada por capilaridade devido a forças adesivas entre os túbulos dentinários e os componentes da *smear layer*. A hipótese da capilaridade pode explicar o fenômeno observado por AKTENER et al. (1989) que demonstraram haver aumento na penetração de *smear layer*, para até 110 μm , no interior dos túbulos dentinários, quando se utilizava reagentes tensoativos, ou seja, que diminuam a tensão superficial, durante a instrumentação endodôntica.

As vantagens e desvantagens de se remover a camada de *smear layer* após a instrumentação endodôntica ainda é controverso. Alguns autores relatam não haver invasão bacteriana em dentina quando há presença da *smear layer*

(MICHELICH et al., 1980; DIAMOND & CARRELL, 1984) sugerindo que a formação de tampões de dentina barre a penetração de bactérias no interior dos túbulos dentinários (VOJINOVIC et al., 1973). Contrariamente, outros estudos demonstram que bactérias podem sobreviver em meio aos componentes da *smear layer* e no interior dos túbulos dentinários após a instrumentação endodôntica (BRANNSTRÖM & NYBORG, 1973; BAKER et al., 1975; YAMADA et al., 1983) e ainda, crescer no interior dos túbulos dentinários (WILLIAMS & GOLDMAN, 1985; MERYON et al., 1986; MERYON & BROOK, 1990).

A *smear layer* tem capacidade de retardar a penetração de certas espécies bacterianas, como o *Proteus vulgaris*, porém, sem barrar completamente a penetração (WILLIAMS & GOLDMAN, 1985). MERYON et al. (1986) observaram que as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* penetravam mesmo em espessos discos de dentina, verificando que estas bactérias têm a capacidade de remover a *smear layer* e abrir os túbulos dentinários, provavelmente, pela produção de enzimas proteolíticas, assim como *Actinomyces viscosus*, *Corynebacterium* ssp. e *Streptococcus sanguis* (MERYON & BROOK, 1990). Portanto a *smear layer* não é uma barreira completa à penetração bacteriana (SEN et al., 1995).

Em canais extremamente infectados, mesmo após o preparo químico-mecânico, algumas bactérias localizadas mais profundamente no interior dos túbulos dentinários, não são eliminadas (BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1981, 1983, 1985). A presença de *smear layer* dificulta a ação antimicrobiana dos agentes irrigantes no interior dos túbulos dentinários (GOLDBERG & ABRAMOVICH, 1977; WAYMAN et al., 1979, YAMADA et al., 1983; BAUMGARTNER & MADER, 1987). No entanto, a camada de *smear layer* não impede por completo a ação dos irrigantes, apesar de retardar (ORSTAVIK & HAAPASALO, 1990). Desta forma, a remoção da *smear layer* é benéfica por facilitar a destruição de bactérias no interior dos túbulos dentinários, bem como permitir o uso de soluções irrigantes em menor quantidade e concentração (BRANNSTRÖM, 1984; HAAPASALO & ORSTAVIK, 1987).

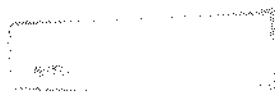
2.2.1.2 Na obturação dos canais radiculares

Outra importante consideração em Endodontia é a obturação final do canal radicular. A *smear layer* sobre as paredes do canal radicular atua como barreira física, interferindo na adesão e penetração dos cimentos obturadores nos túbulos dentinários (WHITE et al., 1987; OKSAN et al., 1993). Com a remoção da *smear*

layer ocorre penetração do cimento obturador no interior dos túbulos dentinários aumentando a interface entre a obturação e a parede dentinária, melhorando a capacidade seladora da obturação (WHITE et al., 1984). Além disso, a degradação da *smear layer* por enzimas proteolíticas produzidas por certas espécies bacterianas, produz falhas entre o material obturador e a parede do canal radicular, permitindo a infiltração de outros microrganismos, e seus subprodutos, pelo canal radicular até os túbulos dentinários e região periapical (UITTO et al., 1988). A degradação da *smear layer* pode estar relacionada , também, com falhas em obturações retrógradas (PITT FORD & ROBERTS, 1990).

2.3 O presente estudo

Tendo em vista os aspectos acima mencionados, verificamos que estudos para avaliação da utilização do digluconato de clorexidina gel como irrigante seriam de grande interesse a prática endodôntica.



PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem como principais objetivos:

1. Verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* de diversas concentrações do hipoclorito de sódio (NaOCl), digluconato de clorexidina líquida e do digluconato de clorexidina gel contra microrganismos aeróbios, anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos, comumente encontrados na microbiota endodôntica;
2. Verificar a ação antimicrobiana do digluconato de clorexidina gel a 0,2% e 2% e de várias concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl), na eliminação *in vitro* de *Enterococcus faecalis* em diferentes tempos de exposição.
3. Verificar a ação do hipoclorito de sódio 5,25%, digluconato de clorexidina líquida 2% e do digluconato de clorexidina gel 2% quanto a capacidade de remoção de *smear layer* através de microscopia eletrônica de varredura, e da eliminação de *Enterococcus faecalis* de canais contaminados *in vitro*;

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Atividade antimicrobiana de irrigantes endodônticos através de difusão em ágar

4.1.1 Materiais

4.1.1.1 Microrganismos

4.1.1.1.1 Aeróbios:

☞ *Candida albicans* (NTCC 3736)

☞ *Bacillus subtilis*

☞ *Bacillus cereus* (B213)

4.1.1.1.2 Anaeróbios facultativos:

- *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)
- *Streptococcus sobrinus* (6715)
- *Actinomyces naeslundii* (M104)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
- *Streptococcus sanguis* (ATCC 10556)

4.1.1.1.3 Anaeróbios estritos (isolados clinicamente dos canais radiculares):

- *Prevotella intermedia*
- *Porphyromonas gingivalis*
- *Porphyromonas endodontalis*
- *Prevotella denticola*

4.1.1.2 Meios de cultura

- Brain Heart Infusion Broth (BHI) - Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK
- Brain Heart Infusion Agar (BHIA) - Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK
- Mueller-Hinton Agar (MHA) - Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK
- Fastidious Anaerobe Agar (FAA) – Biobrás SA, Montes Claros, MG

4.1.1.3 Irrigantes testados

- clorexidina líquida 0,2%.....(CL1)
- clorexidina líquida 1%(CL2)
- clorexidina líquida 2%(CL3)
- clorexidina líquida controle(CLcon)
- clorexidina gel 0,2%(CG1)
- clorexidina gel 1%(CG2)
- clorexidina gel 2%(CG3)
- clorexidina líquida gel.....(CGcon)
- hipoclorito de sódio 0,5%.....(H1)
- hipoclorito de sódio 1%.....(H2)
- hipoclorito de sódio 2,5%.....(H3)
- hipoclorito de sódio 4%.....(H4)
- hipoclorito de sódio 5,25%.....(H5)
- hipoclorito de sódio controle (Hcon)
- água destilada.....(AD) – controle negativo
- salina estéril.....(S) – controle negativo

Todos os irrigantes utilizados foram preparados na mesma farmácia de manipulação (Proderma Farmácia de Manipulação Ltda. - Piracicaba, SP).

4.1.2 Métodos

4.1.2.1 Preparação do inóculo

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

Os organismos aeróbios e facultativos foram subcultivados em placas de BHIA e incubados por 18-24 h a 37°C (em atmosfera de 10% CO₂, para os facultativos). Os organismos anaeróbios estritos foram subcultivados em placas de FAA + 5% sangue de carneiro desfibrinado (EBEFARMA, Araras, SP) e incubados em câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, UK) em atmosfera anaeróbia de 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂ por 48 h.

Após crescimento em meio sólido, colônias isoladas de aeróbios e facultativos foram suspensas em tubos contendo 5 mL de solução estéril de NaCl a 0.85% (Fig. 4.1A). Após agitação mecânica, a suspensão era ajustada em espectrofotômetro com absorvância de 800 nm, até atingir a concentração equivalente a 0.5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ bactéria/mL).

Para as bactérias estritamente anaeróbias colônias suspensas em solução estéril de NaCl a 0.85% até atingir a concentração equivalente a 1 da escala de McFarland. Tais inóculos foram utilizados por promoverem crescimento semi-confluyente de todos os microrganismos testados.

4.1.2.2 Preparo das camadas de ágar e do inóculo

Para avaliar a atividade antimicrobiana das substâncias testadas frente às bactérias aeróbias, facultativas e levedura foram utilizadas placas de 140 mm de diâmetro. Para o teste com bactérias anaeróbias estritas, foram utilizadas placas de 80 mm de diâmetro. Os testes foram realizados em triplicata em tempos diferentes.

4.1.2.2.1 Bactérias aeróbias, facultativas e levedura

Utilizou-se o método de camada dupla.

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

Quarenta mL de BHIA eram preparados e autoclavados em frascos de vidro com tampas rosqueáveis. Durante o processo de resfriamento, quando o BHIA atingia 45°C, ainda em estado líquido, se adicionava 400µL do inóculo microbiano (Fig. 4.1B) e se promovia agitação uniforme do conjunto. O BHIA passava a ter, portanto, 1% de inóculo microbiano, e era então distribuído sobre a camada sólida de MHA (Fig. 4.1C).

Para as bactérias anaeróbias estritas foi utilizada somente uma camada de meio de cultura, a qual o inóculo bacteriano foi plaqueado diretamente (camada *seed*). Estudos pilotos foram feitos para determinar qual a melhor concentração da suspensão bacteriana e a técnica de inoculação que permitisse crescimento semi-confluyente dos organismos a serem testados. Nestes estudos foi observado que o método da camada dupla associada com 1% do inóculo nas concentrações de 0.5 e 1 na escala de McFarland, não produziam crescimento das bactérias anaeróbias estritas. Isto pode ocorrer devido à sensibilidade térmica de tais bactérias e à necessidade de ter uma concentração mais elevada de células bacterianas para haver crescimento (GOMES, 1995).

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

4.1.2.3 Colocação dos tubos de inox sobre a superfície do ágar

Após a solidificação dos meios de cultura, tubos de inox com 6 mm de largura interna, 8 mm de largura externa e 10 mm de altura, foram colocados sobre a superfície do ágar (Fig. 4.1D). Cada tubo foi preenchido com 40 µL de cada solução a ser testada (Fig. 4.1E). As placas foram então mantidas por 2 h à temperatura ambiente para permitir a difusão do gel e das soluções no ágar (as placas contendo os inóculos de anaeróbios estritos foram conservadas em jarros anaeróbios à temperatura ambiente). A manipulação das placas contendo culturas anaeróbias estritas foi feita sob o fluxo contínuo de nitrogênio para reduzir o tempo de exposição de tais bactérias à atmosfera ambiente.

4.1.2.4 Incubação

As placas foram então incubadas a 37 °C em condições gasosas apropriadas (Fig. 4.1F).

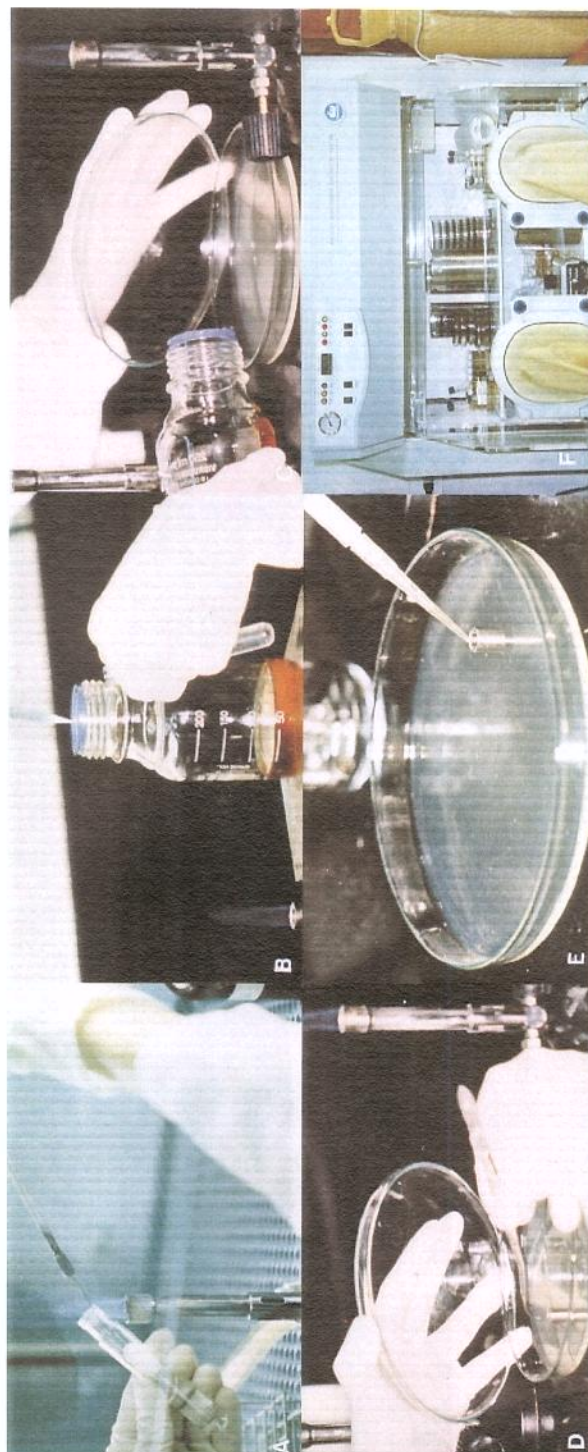


Figura 4.1. A: suspensão microbiana; B-C: semeadura; D: colocação dos cilindros de aço-inox sobre a camada *seed*; E- preenchimento dos cilindros com as substâncias testes; F: incubação.

4.1.2.5 Leitura dos halos de inibição

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

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

Os raios das zonas de inibição microbiana corresponderam à menor distância entre a superfície externa do cilindro e o início da região de crescimento microbiano (Figs. 4.2 e 4.3), os quais foram medidos com o auxílio de paquímetro milimetrado.

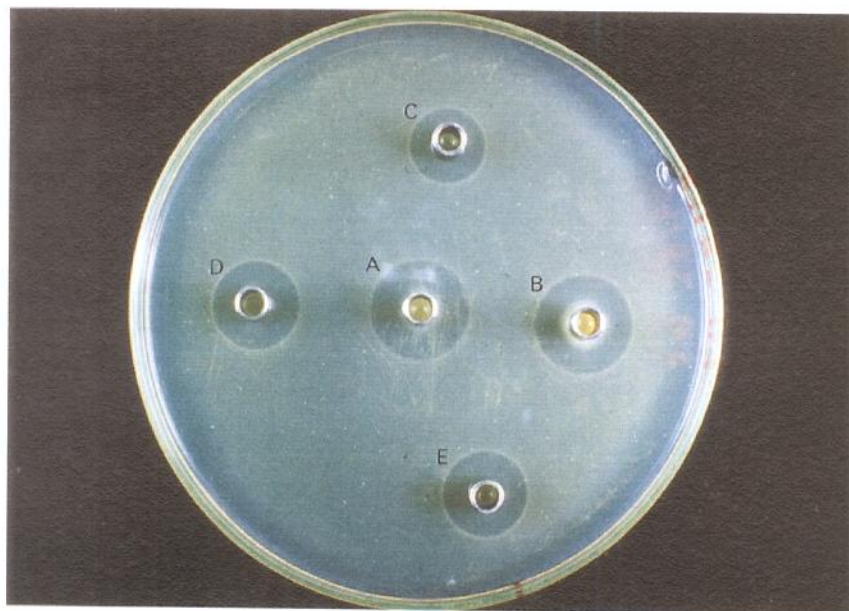


Figura 4.2. Halos de inibição de crescimento de *S. sanguis* quando em contato com gel de clorexidina 2% (A-B) e com gel de clorexidina 1% (C-E-D-F).

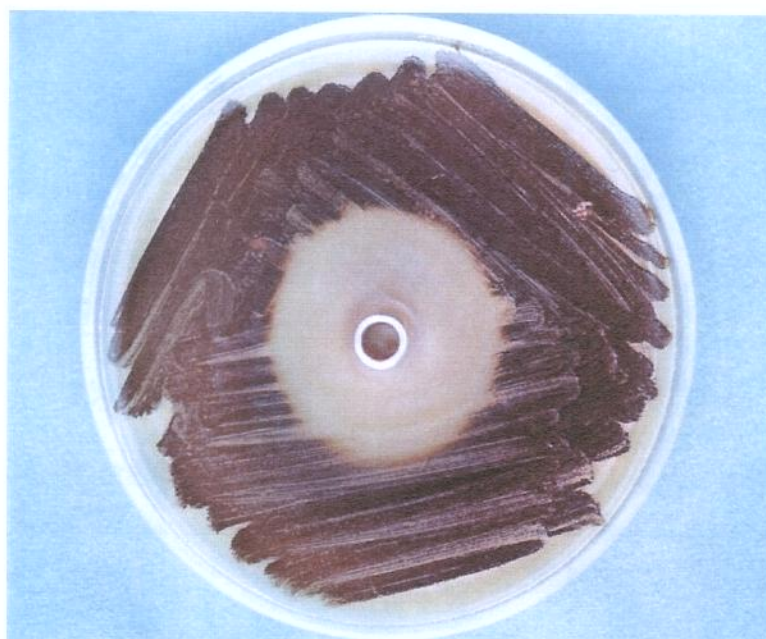


Figura 4.3. Halo de inibição de crescimento de *P. endodontalis* quando em contato com gel de clorexidina 2% .

4.1.2.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa SPSS-PC⁺ (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) utilizando o teste ANOVA. A significância foi estabelecida em nível de 5%.

4.2 **Atividade antibacteriana do digluconato de clorexidina gel a 0,2% e 2%, e de várias concentrações de hipoclorito de sódio contra *Enterococcus faecalis* em diferentes tempos de exposição**

4.2.1 Materiais

4.2.1.1 Microrganismo

➤ *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)

4.2.1.2 Meios de cultura

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

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

4.2.1.3 Irrigantes testados

- ⤵ clorexidina gel 0,2%(CG1)
- ⤵ clorexidina gel 2%(CG3)
- ⤵ hipoclorito de sódio 0,5%.....(H1)
- ⤵ hipoclorito de sódio 1%.....(H2)
- ⤵ hipoclorito de sódio 2,5%.....(H3)
- ⤵ hipoclorito de sódio 4%.....(H4)
- ⤵ hipoclorito de sódio 5,25%.....(H5)

Todos os irrigantes utilizados foram preparados na mesma farmácia de manipulação (Proderma Farmácia de Manipulação Ltda. - Piracicaba, SP).

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Preparação do inóculo

Culturas puras de *Enterococcus faecalis* em caldo de BHI foram subcultivados em placas de BHIA e incubadas por 18-24 h a 37°C em atmosfera de 10% CO₂.

Após crescimento em meio sólido, colônias isoladas desta bactéria foram suspensas em tubos contendo 5 mL de solução estéril de NaCl a 0.85%. Após agitação mecânica, a suspensão era ajustada no espectrofotômetro com absorbância de 800 nm, até atingir a concentração equivalente a 0.5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ bactéria/mL).

4.2.2.2 Efeito antibacteriano dos irrigantes testados

Um mL de cada agente irrigante foi colocado no fundo dos poços de placas de cultura de células contendo 24 poços (Corning Cell Culture Cluster, Corning, NY). Poços contendo 1 mL de solução salina estéril a 0.85% serviram

de controle. Cada irrigante foi colocado em 3 poços. A seguir, 1mL do inóculo bacteriano foi colocado em contato com os irrigantes e a salina.

Decorrido 45s, 1min, 3 min, 5 min, 10 min, 20 min e 30 min, foram retirados 100 µL de cada poço, os quais eram transferidos para tubos contendo 0,9 mL de BHI recém-preparado + neutralizadores. Os neutralizadores (0,6% de tiosulfato de sódio, para o hipoclorito de sódio e 0.5% de Tween 80 e 0,07% de lecitina para a clorexidina) foram adicionados ao BHI para evitar a ação residual dos irrigantes.

Todos os tubos foram incubados a 37°C por 7 dias. O crescimento bacteriano era observado durante o período de incubação pela presença de turbidez do meio. A pureza das culturas positivas era confirmada através da coloração do Gram, morfologia das colônias plaqueadas em BHI ágar sangue e por método bioquímico de identificação bacteriana (Api 20 Strep – bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) (Fig. 4.4).

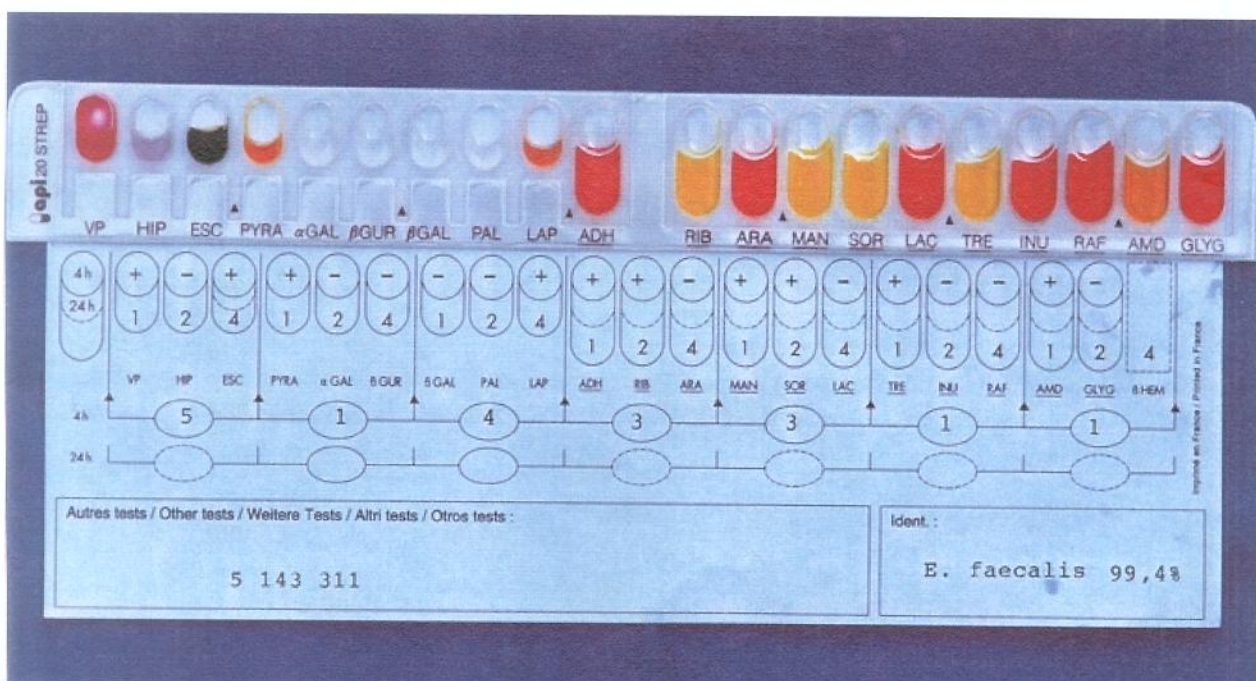


Figura 4.4. Identificação de bactéria após o período de incubação de 7 dias através do kit de identificação Api 20 Strep, confirmando a presença de *E. faecalis*.

4.3 Contaminação *in vitro* dos canais radiculares com *E. faecalis*, capacidade de eliminação de *E. faecalis* e de remoção de *smear layer* pelos irrigantes endodônticos

4.3.1 Preparo dos dentes

Foram utilizados, 65 incisivos centrais superiores humanos extraídos (armazenados em Dakin) com raízes retas. Dentes com ápices não-formados e com forames apicais com mais de 0.5 mm de diâmetro não foram incluídos nesta pesquisa.

Os acessos coronários foram feitos convencionalmente com pontas diamantadas esféricas # 1011 a 1013. Os desgastes compensatórios foram feitos pontas diamantadas cônicas com ponta inativa # 3082, em alta rotação.

Limas #10 foram introduzidas no canal até que sua ponta ultrapassasse 1mm além do forame apical do dente ficando visível. Retornando-a 2 mm obtínhamos o comprimento de trabalho. Todos os dentes foram instrumentados

inicialmente pela técnica do "step-back", utilizando limas tipo K. Durante a preparação inicial dos dentes, foi usado 1 mL de água destilada estéril como irrigante, a cada troca de lima. O lima de memória de todos os dentes foi a lima K # 35. Os dentes foram mantidos em gazes estéreis umedecidas durante a instrumentação para se evitar desidratação.

A *smear layer* formada durante a instrumentação inicial foi removida lavando-se os dentes por 10 minutos em EDTA 17%, seguido por mais 10 minutos em NaOCl 5,25%, sempre sob agitação (PEREZ et al., 1993). Os espécimes foram então lavados com solução de fosfato tamponado para remoção de traços de EDTA e NaOCl. Todos os dentes tiveram seus forames apicais selados com resina epóxi e foram autoclavados a 121°C por 30 minutos, em frascos individuais contendo 4 mL de Brain Heart Infusion (BHI). Finalmente, após a autoclavagem, os dentes foram mantidos por 48 horas em estufa a 37°C, para comprovação de esterilidade.

4.3.2 Contaminação *in vitro* com *E. faecalis*

Culturas puras de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foram utilizadas como contaminantes dos canais radiculares. Estas bactérias foram subcultivadas em BHI ágar e incubadas a 37°C em uma atmosfera de 10% CO₂, por 24 hs. Após este período, foram preparadas suspensões bacterianas em BHI com concentração equivalente a 0.5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ bactéria/mL), confirmada em espectrofotômetro (comprimento de onda de 800 nm).

Os frascos contendo os dentes já esterilizados foram abertos em câmara de fluxo laminar. Os dentes foram montados verticalmente em bases de madeira previamente esterilizadas, para facilitar o manuseio. A contaminação dos dentes foi realizada de acordo com a metodologia de SIQUEIRA et al. (1997). Sendo assim, cada canal radicular foi inoculado com 40µl da suspensão de *E. faecalis* através de seringas de tuberculina de 1 mL estéreis. Os dentes foram selados com material restaurador temporário (Cavit) e incubados a 37°C por 7 dias.

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

Após o período de “contaminação”, os dentes foram retirados da estufa, em condições assépticas, sendo irrigados com 3 mL de salina estéril. Os canais radiculares foram secos com pontas de papel absorvente estéreis, que foram depositadas em frascos com tampas rosqueáveis contendo 5 mL de *BHI* líquido. Estas amostras foram denominadas “pré- tratamento”.

Feita esta coleta esta coleta inicial, os dentes foram divididos em 4 grupos, sendo que cada grupo teve seus dentes irrigados com uma das soluções testes.

Grupo1: 20 dentes, irrigados com NaOCl 5,25%;

Grupo 2: 20 dentes, irrigados com digluconato de clorexidina líquida 2%;

Grupo 3: 20 dentes, irrigados com digluconato de clorexidina gel 2%;

Grupo 4: controle negativo com 5 dentes, irrigados com salina estéril;

Os canais foram irrigados com 3 mL da solução teste escolhida (de acordo com o grupo) com auxílio de seringa estéril e agulha 26G, colocando-se a agulha o mais próximo possível do comprimento de trabalho sem que houvesse

travamento dentro do canal. Colocado o irrigante, o canal foi instrumentado com limas do tipo Hedströen # 25 fazendo-se movimentos de limagem agindo, em todas as paredes do canal durante 30 segundos. Após a instrumentação, foi realizada nova irrigação com 3 mL da solução teste, seguida de nova instrumentação e irrigação. Foi realizado uma última irrigação com 3 mL do neutralizador específico da solução teste para se evitar ação residual dos irrigantes. Por fim, realizou-se irrigação final com 3 mL de salina estéril. Portanto realizou-se: irrigação→ instrumentação→ irrigação→ instrumentação→ irrigação→ neutralização→ salina.

Neutralizadores:	NaOCl: Tiossulfato de sódio a 0,6%
	Clorexidina: Tween 80 a 0,5% + Lecitina de soja a 0,07%

Após a irrigação final com salina, os canais foram secos com pontas de papel absorvente estéreis, que também foram colocadas em frascos contendo 5mL de BHI. Esta coleta final foi classificada como “pós-tratamento”.

Os tubos contendo BHI com os cones de papel, tanto da coleta “pré-tratamento” quanto da “pós-tratamento”, foram agitados por aproximadamente 10 a 20 segundos, e incubados a 37°C. Após 48 h foi observado a turbidez de

cada tubo, sendo classificados como “positivo” e “negativo”, podendo desta forma se avaliar a capacidade de cada irrigante na eliminação de *Enterococcus faecalis*. Os tubos que foram classificados como “positivos” tiveram 40µl de seu conteúdo plaqueado em BHIA sangue, e incubados a 37°C. Após o período de 48 h, as colônias de microrganismos presentes nestas placas foram identificadas através da coloração de Gram, morfologia das colônias e método bioquímico (Api 20 Strep – bioMérieux SA, Marcy-l’Etoile, França) para se confirmar se as colônias isoladas eram *E. faecalis*. Os tubos com culturas negativas foram deixados na estufa por 7 dias, sendo que após este período, caso não apresentassem crescimento bacteriano, foram descartados.

4.3.3.1 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa SPSS-PC⁺ (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) utilizando o teste do Qui-Quadrado para testar a hipótese nula de que não há correlação entre o tipo de irrigante e a frequência de culturas bacterianas positivas. A significância foi estabelecida em nível de 5%.

4.3.4 Remoção da *smear layer* pelos irrigantes endodônticos

Após a “coleta final”, os dentes foram clivados longitudinalmente em 2 partes, fixados em solução de glutaraldeído 2,5%, pós-fixados em cacodilato de metila, secos ao ponto crítico e metalizados com ouro para serem observados em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). A avaliação da eficiência de cada irrigante na eliminação de *smear layer* foi realizada através de fotos padronizadas, em magnificações X2000 (15KV), de áreas representativas no terço médio dos canais radiculares.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Atividade antimicrobiana de irrigantes endodônticos através de difusão em ágar

5.1.1 Digluconato de clorexidina

Todos os microrganismos testados sofreram algum grau de inibição, *in vitro*, quando expostos ao digluconato de clorexidina, tanto gel quanto líquido, nas concentrações de 0,2%, 1% e 2 %.

O digluconato de clorexidina a 2%, em gel ou em solução, foi o irrigante que mostrou maior média dos halos de inibição contra todas as espécies testadas, seguido da clorexidina a 1%.

Os microrganismos que apresentaram menores halos frente a ação da clorexidina gel em todas as concentrações foram *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis* (ambos com a média de halo= 4,33 mm), enquanto que os maiores halos foram observados nas culturas de *Prevotella intermedia* (média do halo = 21,33 mm).

Os menores halos criados pela clorexidina líquida, em todas as concentrações, foi quando em contato com *Enterococcus faecalis* (média do halo = 4,57 mm), enquanto os maiores, com *Porphyromonas gingivalis* (média do halo=14,89 mm). As médias dos halos de inibição criados pelo digluconato de clorexidina estão representadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Média dos halos de inibição dos microrganismos testados, em milímetros, quando expostos ao digluconato de clorexidina, líquido e gel, em diferentes concentrações.

Microrganismos	CL1	CL2	CL3	CG1	CG2	CG3
<i>C. albicans</i>	8.83	14.00	18.50	11.17	15.67	19.00
<i>B. cereus</i>	3.83	5.00	5.17	3.17	5.33	5.67
<i>B. subtilis</i>	3.00	5.00	6.00	2.00	4.00	5.00
<i>S. aureus</i>	4.00	8.67	8.67	6.67	9.33	9.67
<i>E. faecalis</i>	4.00	4.67	5.00	3.17	3.50	4.33
<i>S. sanguis</i>	6.00	8.67	9.33	6.33	8.00	8.33
<i>S. sobrinus</i>	9.00	9.00	10.33	6.33	10.00	10.33
<i>A. naeslundii</i>	5.83	8.67	8.67	5.17	6.00	6.67
<i>P. gingivalis</i>	11.17	16.50	17.00	14.00	17.83	20.33
<i>P. endodontalis</i>	10.00	12.67	15.67	11.00	13.67	17.83
<i>P. intermedia</i>	12.33	13.33	17.33	16.17	20.00	21.33
<i>P. denticola</i>	5.50	6.50	7.00	4.17	6.00	7.30

Onde: **CL1**- clorexidina líquida 0,2%; **CL2**- clorexidina líquida 1%; **CL3**- clorexidina líquida 2%; **CG1**- clorexidina gel 0,2%; **CG2**- clorexidina gel 1%; **CG3**- clorexidina gel 2%.

5.1.2 Hipoclorito de sódio

As médias dos halos de inibição criados pelas diferentes concentrações de hipoclorito de sódio testadas estão representadas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Média dos halos de inibição dos microrganismos testados, em milímetros, quando expostos à diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.

Microrganismos	H1	H2	H3	H4	H5
C. albicans	0.00	0.67	1.00	2.00	2.33
B. cereus	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B. subtilis	0.00	0.00	2.67	3.00	4.00
S. aureus	4.33	4.67	4.83	4.83	5.83
E. faecalis	0.00	0.00	1.50	2.17	3.17
S. sanguis	0.33	0.67	2.67	2.00	3.00
S. sobrinus	0.00	0.00	1.83	2.83	3.50
A. naeslundii	0.00	0.00	1.83	6.67	8.67
P. gingivalis	7.67	11.67	17.83	19.67	22.83
P. endodontalis	0.00	2.83	4.17	6.00	11.50
P. intermedia	0.00	10.33	11.33	12.83	20.50
P. denticola	0.00	1.33	2.00	2.33	2.83

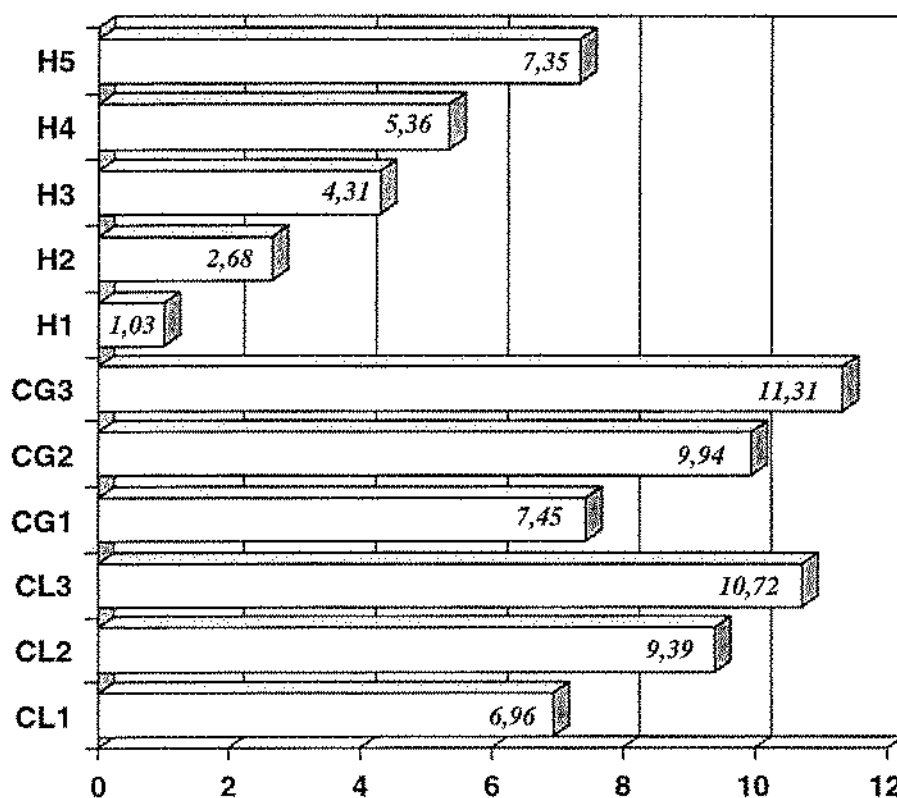
Onde: H1- hipoclorito de sódio 0,5%; H2- hipoclorito de sódio 1%; H3- hipoclorito de sódio 2,5%; H4- hipoclorito de sódio 4%; H5- hipoclorito de sódio 5,25%.

Quando expostos ao hipoclorito de sódio, principalmente em baixas concentrações, alguns dos microrganismos testados não sofreram inibição de crescimento. A bactéria *Bacillus cereus* sofreu apenas inibição por contato direto quando exposta ao NaOCl, sem a formação de halos de inibição, independente da concentração utilizada. Por outro lado, *Porphyromonas gingivalis* foi a bactéria que apresentou maiores halos de inibição (média dos halos de inibição= 15,93 mm).

5.1.3 Digluconato de clorexidina vs hipoclorito de sódio

As médias dos halos de inibição de crescimento microbiano criados por cada irrigante à todos os microrganismos testados estão representados na Figura 5.1. Os irrigantes usados como controle negativo não inibiram o crescimento dos microrganismos avaliados neste estudo.

Figura 5.1. Média das zonas de inibição (em mm) criada por cada irrigante contra todos os microrganismos testados.



Onde: **CL1**- clorexidina líquida 0,2%; **CL2**- clorexidina líquida 1%; **CL3**- clorexidina líquida 2%; **CG1**- clorexidina gel 0,2%; **CG2**- clorexidina gel 1%; **CG3**- clorexidina gel 2%; **H1**- hipoclorito de sódio 0,5%; **H2**- hipoclorito de sódio 1%; **H3**- hipoclorito de sódio 2,5%; **H4**- hipoclorito de sódio 4%; **H5**- hipoclorito de sódio 5,25%.

A média dos halos criados por cada grupo de irrigante foi analisada pelo teste ANOVA, através do programa SPSS/PC⁺ (Tab. 5.3). As maiores zonas de inibição de crescimento foram geradas quando as bactérias testadas estiveram em contato com o gel de clorexidina 2% (11,31mm), sendo este halo estatisticamente maior ($p < 0,05$) que os halos criados por todas as concentrações de hipoclorito de sódio testadas, inclusive à 5,25% (7,35mm).

O efeito antimicrobiano dos irrigantes está diretamente relacionado com suas concentrações. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as 3 concentrações testadas de clorexidina gel.

Quanto à forma de apresentação da clorexidina, apesar da clorexidina gel ter criado maiores halos de inibição em relação a clorexidina líquida com concentrações equivalentes, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre estas duas formas de apresentação. Dentre todos os irrigantes a base de clorexidina, apenas a clorexidina líquida a 0,2% apresentou média dos halos estatisticamente diferente (6,96mm) em relação a clorexidina a 2%, tanto líquida quanto gel.

Tabela 5.3. Análise estatística da média das zonas inibição (em mm) criada por cada irrigante contra todos os microrganismos avaliados, pelo teste ANOVA.

(*) corresponde a diferença estatística significativa em nível de 5% ($p < 0,05$).

Média dos halos (mm)	Irrigante	H1	H2	H3	H4	CL1	H5	CG1	CL2	CG2	CL3	CG3
1,03	H1											
2,68	H2											
4,31	H3											
5,36	H4	*										
6,96	CL1	*	*									
7,35	H5	*	*									
7,45	CG1	*	*	*								
9,39	CL2	*	*	*	*							
9,94	CG2	*	*	*	*							
10,72	CL3	*	*	*	*	*						
11,31	CG3	*	*	*	*	*	*					

Onde: **CL1**- clorexidina líquida 0,2%; **CL2**- clorexidina líquida 1%; **CL3**- clorexidina líquida 2%; **CG1**- clorexidina gel 0,2%; **CG2**- clorexidina gel 1%; **CG3**- clorexidina gel 2%; **H1**- hipoclorito de sódio 0,5%; **H2**- hipoclorito de sódio 1%; **H3**- hipoclorito de sódio 2,5%; **H4**- hipoclorito de sódio 4%; **H5**- hipoclorito de sódio 5,25%.

5.2 Atividade antibacteriana do digluconato de clorexidina gel a 0,2% e 2%, e de várias concentrações de hipoclorito de sódio contra *Enterococcus faecalis* em diferentes tempos de exposição

A Tabela 5.4 mostra o tempo que cada irrigante ficou em contato com a bactéria *Enterococcus faecalis* até promover culturas bacterianas negativas. O digluconato de clorexidina a 2% e o hipoclorito de sódio a 5,25% promoveram culturas negativas após 45 segundos de contato com *Enterococcus faecalis*. O NaOCl a 0,5% foi o irrigante que mais tempo consumiu para eliminação de *Enterococcus faecalis* (30 minutos). A clorexidina gel a 0,2% e o hipoclorito de sódio a 1% tiveram ação antimicrobiana equivalentes. Quando o inóculo bacteriano ficou em contato com salina estéril (controle positivo), houve crescimento bacteriano em todos os períodos examinados.

Tabela 5.4. Tempo necessário para obtenção de culturas negativas após exposição ao agente irrigante.

Irrigante	Tempo de Contato (minutos)
Clorexidina Gel 0,2%	20
Clorexidina Gel 2%	0,75
Hipoclorito de Sódio 0,5%	30
Hipoclorito de Sódio 1%	20
Hipoclorito de Sódio 2,5 %	10
Hipoclorito de Sódio 4%	5
Hipoclorito de Sódio 5,25%	0,75

5.3 Contaminação *in vitro* dos canais radiculares com *E. faecalis*, capacidade de eliminação de *E. faecalis* e de remoção de *smear layer* pelos irrigantes endodônticos

5.3.1 Eliminação do *E. faecalis* de dentes contaminados *in vitro*

Após o período de contaminação de 7 dias, 3 dentes pilotos foram observados em microscopia eletrônica de varredura. Pode se verificar que este

período foi suficiente para que houvesse não só contaminação das paredes dos canais radiculares mas também penetração bacteriana no interior dos túbulos dentinários (Fig. 5.2).

Figura 5.2. *E.faecalis* nas paredes do canal radicular e no interior de túbulo dentinário após o período de 7 dias de contaminação *in vitro*.

Os tubos contendo BHI e cones de papel das coletas realizadas “pré-tratamento” de todos os dentes, apresentaram turbidez positiva após o período de incubação de 72h (Tab. 5.5).

Apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa quando analisados pelo teste do Qui-Quadrado ($p>0,1$), os dentes irrigados com

clorexidina gel 2% apresentaram maior efetividade na eliminação de *E. faecalis*, com 80% das coletas “pós-tratamento” apresentando turbidez negativa. Tanto os dentes irrigados com clorexidina líquida 2% e hipoclorito de sódio 5,25%, apresentaram apenas 65% dos dentes com coleta “pós-tratamento” negativas (Tab. 5.5).

Tabela 5.5. Turbidez do meio de BHI na coleta “pós-tratamento” (n=20) . Grupo controle (água destilada) n=5.

Irrigante	Positiva	Negativa
Clorexidina Líquida 2%	9 (45%)	11 (65%)
Clorexidina Gel 2%	4 (20%)	16 (80%)
Hipoclorito de Sódio 5,25%	9 (45%)	11 (65%)
Água Destilada	5 (100%)	0 (0%)

5.3.2 Avaliação, em microscopia eletrônica de varredura, da remoção de *smear layer* pelos irrigantes testados

Os dentes submetidos a banho ultrassônico com NaOCl 5,25% e EDTA 17%, após a instrumentação inicial apresentaram as paredes dos canais radiculares livres do *smear layer* (Fig. 5.3).

Figura 5.3. Superfície do terço médio do canal radicular após tratamento com NaOCl 5,25% + EDTA 17% em ultrassom. Superfície limpa, totalmente livre de *smear layer*.

O grupo controle negativo, composto por dentes irrigados apenas com água destilada, apresentou uma camada espessa de *smear layer*, formada sobre a superfície interna do canal radicular onde houve instrumentação (Fig. 5.4)

Figura 5.4. Superfície do terço médio do canal radicular de dente irrigado com água destilada. Superfície recoberta por espessa camada de *smear layer*.

Dentre os irrigantes testados, a maior remoção da *smear layer* foi observada nos dentes do Grupo 1, tratados com gel de clorexidina a 2%, sendo possível observar a maioria das aberturas dos túbulos dentinários (Fig. 5.5)

Figura 5.5. Superfície do terço médio do canal radicular de dente irrigado com gel de clorexidina 2%. Superfície quase que totalmente livre de *smear layer*, com a maioria dos túbulos dentinários abertos.

No grupo irrigado com clorexidina líquida 2% (Grupo 2), os dentes apresentaram uma fina camada de *smear layer* cobrindo a superfície, com as aberturas dos túbulos dentinários sendo evidenciadas por pequenas trincas (Fig 5.6).

Figura 5.6. Superfície do terço médio do canal radicular de dente irrigado com de clorexidina líquida a 2%. Superfície recoberta por fina camada de *smear layer*, com as aberturas dos túbulos dentinários sendo identificadas pela presença de trincas.

Os espécimes irrigados com NaOCl 5,25% (Grupo 3) demonstraram uma camada espessa de *smear layer* cobrindo as aberturas dos túbulos dentinários, sendo que ocasionalmente alguns túbulos poderiam ser identificados (Fig 5.7).

Figura 5.7. Superfície do terço médio do canal radicular de dente irrigado NaOCl 5,25%. Superfície quase totalmente recoberta com *smear layer*, com apenas alguns túbulos evidentes.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Um dos principais objetivos da terapia endodôntica é a remoção de restos pulpare e debris de dentina do sistema de canais radiculares. A fim de alcançar este objetivo, é essencial o uso de um ou de uma combinação de irrigantes durante o preparo mecânico dos canais radiculares, chamado então de preparo químico-mecânico. Sem o uso de irrigantes, grande quantidade de debris e bactérias podem permanecer no sistema de canais, aumentando a chance de insucesso do tratamento endodôntico (HARRISON, 1984).

Até o início da década de 40, o irrigante mais utilizado nos tratamentos endodônticos era a água, devido seu baixo custo, disponibilidade e capacidade de lubrificação, porém esta não possui atividade antimicrobiana. Vários tipos de irrigantes têm sido recomendados para uso endodôntico. Dentre eles se incluem ácidos, agentes quelantes, enzimas proteolíticas, soluções alcalinas e outros agentes químicos como os agentes oxidantes (HARRISON, 1984).

6.1 Atividade antimicrobiana de irrigantes endodônticos através de difusão em ágar

A atividade antimicrobiana de irrigantes endodônticos pode ser avaliada *in vivo* ou *in vitro*. O método *in vitro*, por meio da difusão dos irrigantes em ágar, apresenta limitações tais como a padronização da densidade do inóculo, a adequada composição do meio de cultura, a viscosidade do ágar, condições de armazenamento das placas de ágar, tamanho e número de espécies por placa e tempo e temperatura de armazenamento (WEISS et al., 1996). Além disso, sabe-se que a propriedade antimicrobiana de qualquer agente, avaliado neste modelo experimental, depende de sua habilidade de difusão em ágar. Apesar destas limitações, este método é amplamente utilizado para avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos materiais endodônticos (PUPO et al., 1983; MICKEL & WRIGHT, 1999). Neste trabalho, a atividade antimicrobiana das substâncias testes foi avaliada pelo método modificado do poço (SIQUEIRA & UZEDA, 1997).

Durante o tratamento endodôntico, tanto debris quanto soluções irrigadoras são extruídos através do forame apical (VANDE VISSE & BRILLIANT, 1975), atingindo tecidos periapicais vitais. Desta forma, o uso de NaOCl como irrigante endodôntico deve ser realizado com cuidado. A

propriedade do NaOCl de dissolver de tecidos orgânicos é desejável durante a sua atuação no interior do canal radicular contaminado, auxiliando a remoção de restos pulpare. Porém, esta dissolução não é seletiva, podendo danificar os tecidos periapicais, caso os atinja. Por isso, relatos de acidentes devido a injeção acidental de NaOCl na região periapical são comuns na literatura (BECKING, 1991; EHRLICH et al., 1993). É demonstrado que danos aos tecidos periapicais é maior em casos de polpa necrótica e em dentes com forames apicais amplos, pois há maior chance de extrusão de irrigantes (SALZGEBER & BRILLIANT, 1977).

Em estudos *in vitro* e *in vivo*, HEGGERS et al., (1991) avaliaram atividade antimicrobiana e citotoxicidade do NaOCl. Os autores concluíram que NaOCl a 0,025% seria a concentração mais segura para o uso clínico por não produzir efeitos tóxicos e manter propriedades bactericidas. KOZOL et al. (1988), foram ainda mais longe, recomendando abandono do uso da solução de Dakin (NaOCl 0,5%) pois observaram que concentrações muito inferiores de NaOCl já eram capazes de interferir na quimiotaxia de neutrófilos e causar danos a fibroblastos e células endoteliais. No entanto, os resultados do presente estudo, assim como outros na literatura (ABOU-RASS & PICCINO, 1982; BAUMGARTNER & CUENIN, 1992) demonstram que o hipoclorito de sódio, principalmente em

baixas concentrações, é pouco ou nada eficiente frente alguns microrganismos como *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* e mesmo bactérias anaeróbias como *Prevotella denticola*. Portanto, apesar do hipoclorito de sódio, em diversas concentrações, desde sua introdução em 1936 (WALKER, 1936), ainda ser o irrigante mais utilizado na Endodontia, outros irrigantes, menos citotóxicos e com maior espectro de ação contra os microrganismos da microbiota endodôntica, devem ser pesquisados.

Os microrganismos usados no presente estudo são relevantes por já terem sido identificados na microbiota endodôntica e, as concentrações dos inóculos bacterianos utilizados, equivalentes ao padrão McFarland 0,5 para aeróbios e anaeróbios facultativos e ao padrão McFarland 1 para aeróbios e anaeróbios facultativos, correspondem, aproximadamente, ao número de células bacterianas encontradas nos canais radiculares (van WINKELHOFF et al., 1992; SUNDQVIST, 1992b), além terem sido capazes de promover crescimento semi-confluente das colônias microbianas em placas de ágar.

Os resultados dos testes microbiológicos demonstraram que dentre as concentrações de NaOCl utilizadas, a de 5,25% foi a que promoveu maiores halos de inibição contra todos os microrganismos avaliados, com exceção do *Bacillus cereus*. No entanto, quando concentrações menores foram empregadas, principalmente 0,5% e 1%, os halos de inibição foram significativamente menores, estando de acordo com trabalhos prévios (YESILSOY et al., 1995).

A clorexidina tem sido usada na Endodontia, como solução irrigadora (DELANY et al., 1982; RINGEL et al., 1982; JEANSONNE & WHITE, 1994) no entanto, sempre na forma de solução. A clorexidina gel apenas foi avaliada como medicação intracanal, apresentando bons resultados (SIQUEIRA & UZEDA, 1997). O gel de Natrozol (hidroxietilcelulose), utilizado como base para a clorexidina gel no presente estudo, é um agente espessante não iônico altamente eficiente, inerte, hidrossolúvel e muito utilizado para espessamento de xampus, géis e sabonetes à base de tensoativos aniônicos, como o digluconato de clorexidina, aos quais apresenta excelente compatibilidade. Os resultados da atividade antimicrobiana por difusão em ágar, do presente estudo, mostrou maior efetividade do gel de clorexidina em relação a sua apresentação na forma líquida de concentração equivalente, apesar de não ter havido diferenças estatisticamente significantes. Já, quando se compara os halos de inibição de

crescimento microbiano promovido pela clorexidina e pelas concentrações testadas de hipoclorito de sódio, verificou-se que a clorexidina a 2%, tanto gel quanto líquida, apresentaram halos estatisticamente maiores do que o NaOCl, até mesmo na concentração de 5,25%.

A menor concentração de clorexidina avaliada neste estudo, 0,2%, em ambas as formas de apresentação, mostrou atividade antimicrobiana *in vitro* equivalente ao NaOCl 5,25%, de acordo com resultados encontrados na literatura (DELANY et al., 1982; RINGEL et al., 1982; JEANSONNE & WHITE, 1994). DELANY et al., (1982) avaliaram o digluconato de clorexidina líquido 0,2% em estudo *in vitro* com dentes extraídos. Estes autores sugeriram que a clorexidina nesta concentração poderia ser utilizada como um efetivo agente irrigante durante o tratamento endodôntico, e também seu uso como medicação intracanal.

6.2 Atividade antimicrobiana do digluconato de clorexidina gel a 0,2% e 2%, e do hipoclorito de sódio a 5,25% contra *Enterococcus faecalis* em diferentes tempos de exposição

Os resultados do presente estudo confirmaram os de OHARA et al. (1994), apesar de terem utilizado a clorexidina apenas na forma líquida. Em ambos estudos a clorexidina foi superior ao NaOCl em diferentes modelos de avaliação *in vitro* contra diversos microrganismos. Um dos parâmetros avaliados por estes pesquisadores, assim como neste trabalho, foi o tempo de contato necessário para que 6 diferentes tipos de irrigantes, incluindo digluconato de clorexidina 2% e NaOCl 5,25%, eliminassem microrganismos comumente encontrados na microbiota oral. A clorexidina foi a substância mais efetiva, com resultado superior ao NaOCl 5,25%, ao contrário do presente estudo, no qual estes os dois irrigantes agiram da mesma forma, ambos necessitando de apenas 45 segundos para eliminar *Enterococcus faecalis*. No entanto, mesmo o NaOCl 0,5%, que necessitou de maior tempo de contato (30 minutos) para promover culturas negativas de *Enterococcus faecalis*, tem potencial para ser efetivo na prática clínica uma vez que os microrganismos presentes nos canais radiculares ficam,

em média, 30 a 60 minutos em contato com as soluções irrigantes durante o tratamento endodôntico (YESILSOY, 1995).

6.3 Contaminação *in vitro* dos canais radiculares com *E. faecalis*, capacidade de remoção de *smear layer* e da eliminação de *E. faecalis* pelos irrigantes endodônticos

6.3.1 Eliminação de *E. faecalis* de dentes contaminados *in vitro*

Vários modelos de infecção dentinária *in vitro* têm sido propostos na literatura, sendo que muitos deles utilizam *E. faecalis*, como bactéria de escolha (MERYON et al, 1986; HAAPASALO & ORSTAVICK, 1987; PEREZ et al., 1993, SIQUEIRA et al., 1997). O método de infecção usado no presente estudo se mostrou eficiente pois após o período de 7 dias incubação dos dentes contaminados, foi possível recuperar culturas puras de *E. faecalis*, além de ter sido tempo suficiente para que estas bactérias penetrassem nos túbulos dentinários.

Após a instrumentação dos dentes, também *in vitro*, 80% dos dentes que foram irrigados com clorexidina gel 2% apresentaram culturas bacterianas negativas, enquanto que no grupo de dentes irrigados tanto com clorexidina líquida 2% quanto com NaOCl 5,25%, apenas 65% das coletas finais não apresentaram crescimento. O uso dos neutralizadores específicos para cada irrigante após a instrumentação final, garantiu que nenhum traço do irrigante fosse adicionado ao meio de cultura, alterando o crescimento bacteriano. Desta forma, podemos considerar que os irrigantes agiram apenas durante os procedimentos de instrumentação.

A diferença apresentada neste teste entre clorexidina gel 2% e o NaOCl 5,25% já era esperada pois os testes de difusão em ágar haviam mostrado maior atividade antimicrobiana da clorexidina. No entanto, a diferença, embora sem significado estatístico, que ocorreu entre o número de culturas negativas entre a clorexidina gel e líquida, ambas a 2%, pode ser atribuído a maior capacidade de debridamento mecânico do gel, que foi confirmado, posteriormente, em microscopia eletrônica de varredura. A importância do efeito mecânico da irrigação dos canais radiculares já foi previamente demonstrada (BYSTRÖN & SUNDQVIST, 1983).

Na literatura, não foram encontrados testes semelhantes de descontaminação dos canais radiculares *in vitro* utilizando o digluconato de clorexidina porém, os resultados obtidos com a irrigação de NaOCl, estão de acordo com estudo realizado por SIQUEIRA et al. (1997).

6.3.2 Capacidade de remoção de *smear layer*

A *smear layer* criada após a instrumentação endodôntica é constituída por raspas de dentina, remanescentes de processos odontoblásticos, tecido pulpar e bactérias (McCOMB & SMITH, 1975). Portanto, *smear layer* contaminada deve ser eliminada para se eliminar bactérias, facilitar a ação de agentes antimicrobianos e permitir adequada obturação final do canal radicular (SEN et al., 1995).

A microscopia eletrônica de varredura permite exame detalhado de superfícies sendo, provavelmente, a melhor ferramenta para se identificar debris orgânicos e inorgânicos no interior dos canais radiculares após o preparo químico mecânico (STEWART, 1998).

No presente estudo, o digluconato de clorexidina gel 2% promoveu superfícies dentinárias mais limpas em relação ao NaOCl 5,25% e ao digluconato de clorexidina líquido 2%, além da água destilada (grupo controle). Os resultados encontrados nos dentes irrigados com NaOCl são semelhantes a outros encontrados previamente na literatura também utilizando microscopia eletrônica de varredura (BERG et al., 1986; BAUMGARTNER & MADER, 1987).

Devido sua viscosidade, o gel de clorexidina pode compensar, com sua ação mecânica, a inabilidade química do digluconato de clorexidina em dissolver tecidos orgânicos, removendo raspas de dentina e restos pulpares, além de possuir atividade antimicrobiana e promover ação lubrificante, facilitando a ação dos instrumentos endodônticos, conforme observado no presente estudo.

Irrigantes endodônticos com consistência viscosa já foram sugeridos anteriormente, inclusive tendo o digluconato de clorexidina como princípio ativo (TUCKER et al., 1976). No entanto, ao contrário do gel de Natrozol usado neste estudo, as bases viscosas, adicionadas aos princípios ativos dos irrigantes, não eram solúveis em água, deixando resíduos nas paredes dentinárias que prejudicam a obturação final do sistema de canais radiculares (CAMPS & MACQUIN, 1990).

Outro importante propriedade desejada a um irrigante endodôntico é sua baixa citotoxicidade aos tecidos periapicais. Trabalhos em desenvolvimento em nosso laboratório, usando modelos animais, têm demonstrado que o digluconato de clorexidina não é irritante aos tecidos, estando de acordo com trabalhos prévios (GREENSTEIN et al., 1986).

Tendo em vista as limitações inerentes a trabalhos *in vitro*, devemos avaliar com cautela os bons resultados obtidos neste estudo pelo gel de clorexidina. Mais estudos devem ser desenvolvidos, principalmente *in vivo*, afim de se estabelecer o uso desta substância como rotina na prática endodôntica.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e nas condições experimentais usadas neste estudo, podemos concluir que:

1. As clorexidinas 2%, em gel ou em solução, foram os irrigantes que mostraram maiores médias dos halos de inibição contra todos os microrganismos testados em teste de difusão em ágar.
2. A clorexidina na forma de gel produziu maiores halos de inibição de crescimento microbiano, *in vitro*, quando comparada à clorexidina líquida em concentrações equivalentes, embora sem diferença estatisticamente significativa.
3. O gel de clorexidina 2% e o NaOCl 5,25% promoveram culturas negativas após 45 segundos de contato com *Enterococcus faecalis*, agindo mais rapidamente do que os demais irrigantes testados.
4. Apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa em relação à clorexidina líquida 2% e ao NaOCl 5,25%, os dentes irrigados com gel de clorexidina 2% apresentaram maior número de culturas microbiológicas negativas (80%), após instrumentação *in vitro*.
5. O gel de clorexidina 2% promoveu maior remoção da *smear layer* do que a clorexidina líquida 2% e o NaOCl 5,25%, em dentes instrumentados *in vitro*.

TRABALHOS FUTUROS

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS:

1. Citotoxicidade do gel de clorexidina em tecido subcutâneo de ratos;
2. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) do gel de clorexidina;
3. Verificação *in vivo* da redução de microrganismos após instrumentação endodôntica usando o gel de clorexidina como irrigante;
4. Avaliação clínica prospectiva do índice de sucesso de tratamentos endodôntico usando o gel de clorexidina como irrigante.

SUMMARY

SUMMARY

AN *IN VITRO* ASSESSMENT OF CHLORHEXIDINE GEL AS AN ENDODONTIC IRRIGANT

The role of microorganisms in the development of periapical pathology has been clearly demonstrated. Host defense mechanisms commonly do not reach bacteria lodged within the root canal system. Thus, endodontic infections need be treated by mechanical procedures with the aid of chemical cleansing agents. Chlorhexidine gluconate, at varying concentrations, has been used in endodontics as both an irrigant and intracanal medicament. Much attention has been paid to the chemical properties of irrigative solutions, but little information is available with regard to their mechanical action. In endodontics, chlorhexidine gluconate in gel form has only been utilized as an intracanal medicament, displaying good results. Therefore, the aim of this study was to assess chlorhexidine gel as an endodontic irrigant, investigating, *in vitro*, if it possessed any of the ideal properties of an endodontic irrigant. Chlorhexidine gel was assessed along with other common endodontic irrigants (sodium hypochlorite and chlorhexidine solution) using the agar diffusion test. Of the irrigants tested, chlorhexidine achieved the greatest inhibition haloes with microorganisms commonly found within the endodontic microflora. It also had the greatest ability in removing the smear layer and eradicating *Enterococcus faecalis* from the root canal system during instrumentation. It was concluded that chlorhexidine gel has great potential as a routine endodontic irrigant.

KEY-WORDS: Endodontic treatment; Irrigation; Bacteria; Chlorhexidine gel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-RASS M, PICCININO MV. The effectiveness of four clinical irrigation methods on the removal of root canal debris. Oral Surg 1982;54: 323-8.

AKTENER BO, CENGİZ T, PISKIN B. The penetration of smear material into dentinal tubules during instrumentation with surface-active reagents: a scanning electron microscopic study. J Endodon 1989; 15:588-90.

ANDO N , HOSHINO N. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. Int Endod J 1990; 23: 20-7.

BAKER NA, ELEAZER PD, AVERBACH RE, SELTZER S. Scanning electron microscopic study of the efficacy of various irrigating solutions. J Endodon 1975; 1: 127-35.

BARNES IE. The production of inlay cavity bevels. Br Dent J 1974; 137:379-90.

BAUMGARTNER JC, CUENIN PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. J Endodon 1992; 18: 605-12.

BAUMGARTNER JC, MADER CL. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. J Endodon 1987; 13: 147-57.

BECKING AG. Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. Oral Surg 1991; 71: 346-8.

BERG MS, JACOBSEN EL, BEGOLE EA, RAMEIKIS NA. A comparison of five irrigating solutions: a scanning electron microscopic study. J Endodon 1986; 12: 192-96.

BERGENHOLTZ G, CRAWFORD JJ. Endodontic Microbiology. In: Walton RE & Torabinejad M, eds. Principles and practice of endodontics. 1st edn. Philadelphia, PA, USA: W.B.Saunders Co. 267-82, 1989.

BERUTTI E, MARINI R. A scanning electron microscopic evaluation of the debridement capability of sodium hypochlorite at different temperatures. J Endodon 1996; 22: 467-70.

BIFFI JC, RODRIGUES HH. Ultrasound in endodontics: a quantitative and histological assessment using human teeth. Endod Dent Traumatol 1989; 5: 55-62.

BLOOMFIELD SF, MILES GA. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. J Appl Bacteriol 1979; 46:65-73.

BONDESTAM O, GAHNBERG L, SUND ML, LINDER L. Effect of chlorhexidine gel treatment on the prevalence of mutans strptococci and lactobacilli in patients with impaired salivary secretion rate. Spec Care Dentist 1996; 16:123-7.

BRANNSTRÖM M. Smear layer: pathological and treatment considerations. Oper Dent Suppl 1984; 3: 35-42.

BRANNSTRÖM M, JOHNSON G. Effects of various conditioners and cleaning agents on prepared dentin surfaces: a scanning electron microscopic investigation. J Prost Dent 1974; 31:422-30.

BRANNSTRÖM M, NORDENVALL KJ, GLANTZ PO. The effect of EDTA-containing surface-active solutions on the morphology of prepared teeth: an *in vivo* study. J Dent Res 1980; 59:1127-31.

BRANNSTRÖM M, NYBORG H. Cavity treatment with a microbicidal fluoride solution: growth of bacteria and effect on the pulp. J Prost Dent 1973; 30:303-10.

BROWN LR, RUDOLPH CE. Isolation and identification of microorganisms from unexposed canals of pulp involved teeth. Oral Surg 1957; 10: 1094-9.

BYSTRÖM A, SUNDQVIST G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. Scand J Dental Res 1981; 89: 321-8.

BYSTRÖM A, SUNDQVIST G. Bacteriological evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. Oral Surg 1983; 55: 307-12.

BYSTRÖM A, SUNDQVIST G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. Int Endod J 1985; 18: 35-40.

BYSTRÖM A, CLAERSSON E, SUNDQVIST G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. Endod Dent Traumatol 1985; 1:170-75.

CAMERON JA. The use of ultrasonic in the removal of the smear layer: A scanning electron microscope study. J Endodon 1983; 9:289-92.

CAMPS J, MACQUIN G. RC Prep and immediate endodontic obturation. Inf Dent 1990; 72: 4095-9.

CENGİZ T, AKTENER BO, PISKIN B. The effect of dentinal tubule orientation on the removal of smear layer by root canal irrigants. A scanning electron microscopic study. Austr Dent J 1990; 23:163-71.

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

CLARK DC, MORGAN J, MacENTEE MI. Effects of 1% chlorhexidine gel on the cariogenic bacteria in high-risk elders: a pilot study. Spec Care Dentist 1991; 11:101-3.

CZONTSKOWSKY M, WILSON EG, HÖLSTEIN FA. The smear layer in endodontics. Dent Clin North Am 1990; 34:13-25.

DELANY GM, PATTERSON SS, MILLER CH, NEWTON CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the canal flora of freshly extracted necrotic teeth. Oral Surg 1982; 53: 518-22.

DIAMOND A, CARRELL R. The smear layer: a review of restorative progress. J Pedod 1984; 34:13-25.

EHRICH GD, BRIAN D, WALKER WA. Sodium hypochlorite accident: inadvertent injection into the maxillary sinus. J Endodon 1993; 19: 180-2.

ENGSTRÖM B. The significance of enterococci in root canal treatment. Odontol Revy 1964; 15: 87-105.

ENGSTRÖM B, LUNDBERG M. The correlation between positive culture and the prognosis of the root canal therapy after pulpectomy. Odontol Revy 1965; 16:193-203.

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

EVANS RT. Oral infection and immunity. IN: NISENGARD RJ & EVANS MG, eds. Oral Microbiol. 2nd edn. Philadelphia PA, USA: WB Saunders Co.pp. 1-7; 1994.

FEHR FR, NYGAARD-OSTBY B. Effect of EDTAC and sulphuric acid on root canal dentine, Oral Surg 1963; 16: 199-205.

FRASER JG. Chelanting agents: Their softening effect on root canal dentine. Oral Surg 1974, 37: 803-11.

GARBEROGLIO R, BECCE C. Smear layer removal by canal irrigants: a comparative scanning electron microscopic study. Oral Surg 1994; 78: 359-67.

GILBOE DB, SVARE CW, THAYER KE, DRENNON DG. Dentinal smearing: an investigation of the phenomenon. J Prosth Dent 1980; 44: 310-6.

GOLDBERG DB, ABRAMOVICH A. Analysis of the effect of EDTAC on the dentinal walls of the root canal. J Endodon 1977; 3: 101-5.

GOLDMAN LB, GOLDMAN M, KRONMAN JH, LIN PS. The efficacy of several irrigating solutions for endodontics: a scanning electron microscopic study. Oral Surg 1981; 52:197-204.

GOMES BPFA. An investigation into the root canal microflora. PhD thesis. University of Manchester, UK.

GOMES BPFA, DRUCKER DB, LILLEY JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J* 1994a; 27:291-98.

GOMES BPFA, DRUCKER DB, LILLEY JD. Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals. *Microbios* 1994b; 80: 231-43.

GOMES BPFA, DRUCKER DB, LILLEY JD. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J* 1996a; 29: 69-75.

GOMES BPFA, LILLEY JD, DRUCKER DB. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent* 1996b; 29:47-55.

GOMES BPFA, LILLEY JD, DRUCKER DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J* 1996c; 29:235-41.

GORDON TM, DAMATO D, CHRISTNER P. Solvent effect of various dilutions of sodium hypochlorite on vital and necrotic tissue. J Endodon 1981; 7:466-9.

GREENSTEIN G, BERMAN C, JAFFIN R. Chlorhexidine: an adjunct to periodontal therapy. J Periodontol 1986; 57:370-6.

GRENIER D, MAYRAND D. Nutricional relationships between oral bacteria. Infect Immun 1986; 53: 616-20.

GRIFFEE MB, PATTERSON SS, MILLER CH, KAFRAWY AH, NEWTON CW. The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. Oral Surg 1980; 50: 457-61.

GROSSMAN LI. Bacteriologic examination. In: Endodontic practice. 11th edn. Philadelphia, PA, USA: Lea and Febiger, pp 263-76, 1981.

GUTIÉRREZ JH, JOFRE A, VILLENA F. Scanning electron microscope study on the action of endodontic irrigants on bacteria invading the dentinal tubules. Oral Surg 1990; 69: 491-501.

HAAPASALO M. Bacteroides spp. in dental root infections. Endod Dent Traumatol 1989; 5: 1-10.

HAAPASALO M. Black-pigmented Gram-negative anaerobes in endodontic infections. FEMS Immunol Med Microbiol 1993; 6:213-7.

HAAPASALO M, ORSTAVIK D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res 1987; 66: 1375-9.

HAHN CL, FALKLER WA, MIRAH GE. Microbiological studies of carious dentin from human teeth with irreversible pulpitis. Arch Oral Biol 1991; 36: 147-53.

HARRISON JW. Irrigation of the root canal system. Dent Clin North Am 1984; 28:797-808.

HEGGERS JP, SAZY AJ, STENBERG BD, STROK LL, McCAULEY RL, HERNOS DN, ROBSON MC. Bacterial and wound-healing properties of sodium hypochlorite solutions. The 1991 Linderberg Award. J Burn Care Rehabil 1991; 12: 420-4.

INGLE JI, MULLANEY TA, GRANDICH RA, TAITOR JF, FAHID A. Endodontic cavity preparation, In: INGLE JI, TAITOR JF, eds. Endodontics, 3rd edn. Philadelphia, PA, USA: Lea and Febiger, pp. 102-255, 1985.

JEANSONNE MJ, WHITE RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. J Endodon 1994; 20:276-8.

JODAIKIN A, AUSTIN JC. Smear layer removal with chelating agents after cavity preparation. J Prost Dent 1981; 46: 171-4.

KAKEHASHI S, STANLEY HR, FITZGERALD RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg 1965; 20: 340-9.

KAKEHASHI S, STANLEY HR, FITZGERALD RJ. The exposed germ-free pulp: effects of topical corticosteroid medication and restoration. Oral Surg 1969; 27: 60-7.

KANTZ WE, HENRY CA. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. Arch Oral Biol 1974; 19: 91-6.

KAUFMAN AY, HENIG EF. The microbiologic approach in endodontics. Oral Surg 1976; 42: 810-6.

KAUFMAN AY, KEILA S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. J Endodon 1989; 15: 224-6.

KELTJENS HM, SCHAEKEN MJ, van der HOEVEN JS, HENDRIKS JC. Effects of chlorhexidine gel on periodontal health of abutment teeth in patients with overdentures. Clin Oral Implants Res 1991; 2:71-4.

KEUDELL K, CONTE M, FUJIMOTO L, ERNEST M, BERRY HG. Microorganisms isolated from pulp chambers. J Endodon 1976; 2: 146-8.

KOZOL RA, GILLIES C, ELGEBALY AS. Effects of sodium hypochlorite (Dakin's solution) on cells of the wound module. Arch Surg 1988; 123: 420-3.

LUOMA H. Chlorhexidine solutions, gels and varnishes in caries prevention. Proc Finn Dent Soc 1992; 88:147-53.

MADER CL, BAUMGARTNER JC, PETERS DD. Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on the root canal walls. J Endodon 1984; 10: 477-83.

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

MATUSOW RJ. Endodontic cellulitis "flare up". Case report. Aust Dent J 1995; 40:36-8.

McCOMB D, SMITH DC. A preliminary scanning microscopic study of root canal after endodontic procedures. J Endodon 1975; 1:238-42.

MERYON SD, BROOK AM. Penetration of dentin by three oral bacteria *in vitro* and their associated cytotoxicity . Int Endod J 1990; 23: 196-202.

MERYON SD,JAKEMAN KJ, BROWNE RM. Penetration *in vitro* of human and ferret dentine by three bacterial species in relation to their potential role in pulpal inflammation. Int Endod J 1986; 19: 213-20.

MICHELICH VJ, SCHUSTER GS, PASHLEY DH. Bacterial penetration of human dentin *in vitro*. J Dent Res 1980; 34:102-8.

MICKEL AK, WRIGHT R. Growth inhibition of *Streptococcus anginosus* (milleri) by three calcium hydroxide sealers and one zinc oxide-eugenol sealer. J Endodon 1999; 25: 34-7.

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

MOLVEN O, OLSEN I, KEREKES K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. Endod Dent Traumatol 1991; 7: 226-9.

MORSE DR. Microbiology and Pharmacology. In: COHEN S & BURNS RC, eds. Pathways of the pulp. 4th edn. St Louis, MO, USA: CV Mosby Co.; 1987.

NAGAOKA S. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. J Endodon 1995; 21: 70-3.

NAIR PRN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. J Endodon 1987; 13: 29-39.

OGUNTEBI BR. Dentine tubule infection and endodontic therapy implications. Int Endod J 1994; 27:218-22.

OHARA PK, TORABINEJAD M, KETTERING JD. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. Endod Dent Traumatol 1993; 9:95-100.

OKSAN T, AKTENER BO, SEN BH, TEZEL H. The penetration of root canal sealers into dentinal tubules. A SEM study. Int Endod J 1993; 26: 301-5.

OOSTERWAAL PJ, MIKX FH, van den BRINK, RENGGLI HH. Bactericidal concentrations of chlorhexidine-digluconate, amine fluoride gel and stannous fluoride gel for subgingival bacteria tested in serum at shortcontact times. J Periodontol Res 1989; 24:155-60.

ORSTAVIK D, HAAPASALO M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. Endod Dent Traumatol 1990; 6: 142-9.

PASHLEY DH, TAO L, BOYD L, KING GE, HORNER JA. Scanning electron microscopy of the substructure of smear layers in human dentine. Arch Oral Pathol 1988; 33:265-70.

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

PITT FORD TR,K ROBERTS GJ. Tissue response to glass ionomer retrograde root fillings. Int Endod J 1990; 23: 233-8.

PUPO J, BIRAL RR, BENATTI O, ABE A, VALDRIGHI L. Antimicrobial effects of endodontic filling cements on microorganisms from root canal. Oral Surg 1983; 55: 622-7.

RINGEL AM, PATTERSON SS, NEWTON CW, MILLER CH, MULHERN JM. *In vivo* evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. J Endodon 1982; 8:200-4.

SABALA CL, POWELL SE. Sodium hypochlorite injection into periapical tissues. J Endodon 1989; 15: 490-2.

SAFAVI KE, SPANGBERG LSW, LANGELAND K. Root canal dentine tubule disinfection. J Endodon 1990; 16: 207-10.

SALZGEBER RM, BRILLIANT JD. An *in vivo* evaluation of the penetration of an irrigating solution in root canals. J Endodon 1977; 3: 394-8.

SATO T, HOSHINO E, UEMATSU H, NODA T. Predominant obligate anaerobes in necrotic pulps of human intact teeth. *Microbial Ecol Health Disease* 1983; 6: 269-75.

SEN BH, WESSELINK PR, TÜRKÜN M. The smear layer: a phenomenon in root canal therapy. *Int Endod J* 1995; 28: 141-8.

SERENE TP, ANDERSON DL. Isolation of *Mycoplasma* from human root canals. *J Dent Res* 1967; 49: 395-9.

SIQUEIRA Jr JF, MACHADO AG, SILVEIRA RM, LOPES HP, UZEDA M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from root canal, *in vitro*. *Int Endod J* 1997; 30: 279-82.

SIQUEIRA Jr JF, UZEDA M, FONSECA MEF. A scanning electron microscopic evaluation of *in vitro* dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endodon* 1996; 22: 308-10.

SIQUEIRA Jr JF, UZEDA M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. J Endodon 1997; 23: 167-9.

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

STEWART GG. A scanning electron microscopic study of the cleansing effectiveness of three irrigating modalities on the tubular structure of dentin. J Endodon 1998; 24: 485-86.

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 1961; 63: 33-7.

SUNDQVIST G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. Odontological Dissertation no. 7, University of Umea, Sweden, 1976.

SUNDQVIST G. Association between microbial species in dental root canal infections. Oral Microbiol Immunol 1992a; 7:257-62.

SUNDQVIST G. Ecology of the root canal flora. J Endodon 1992b; 18:427-30.

SUNDQVIST G, JOHANSSON E, SJ, SJÖGREN U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. J Endodon 1989; 15: 13-9.

SUNDQVIST G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. Oral Surg 1994; 78:522-30.

THILO BE, BAEHNI P, HOLZ J. Dark-field observation of the bacterial distribution in root canals following pulp necrosis. J Endodon 1986; 12: 202-5.

TUCKER JW, MIZRAHI S, SELTZER S. Scanning electron microscopic study of the efficacy of various irrigation solutions: urea, Tubulicid Red, and Tubulicid Blue. J Endodon 1976; 2: 71-8.

TRONSTAD L. Clinical endodontics; a text book. 1st edn. New York, USA: Thieme Medical Publishers Inc., 1991.

UITTO VJ, HAAPASALO M, LAAKSO T, SALO T. Degradation of basement membrane (Type IV) collagen by proteases from some anaerobic microorganisms. Oral Micro Immun 1988; 3: 97-102.

UNSAL E, AKKAYA M, WALSH TF. Influence of a single application of subgingival chlorhexidine gel or tetracycline paste on the clinical parameters of adult periodontitis patients. J Clin Periodontol 1994; 21:351-5.

VANDE VISSE JE, BRILLIANT JD. Effect of irrigation on the production of extruded material at the root apex during instrumentation. J Endodon 1975; 1: 243-6.

van WINKELHOFF AJ, van STEENBERGER TM, de GRAFF J. *Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis*: its role in endodontal infections. J Endodon 1992; 18: 431-4.

VOJIVOVIC O, NYBORG H, BRANNSTRÖM M. Acid treatment of cavities under resin fillings: bacterial growth in dentinal tubules and pulpal reactions. J Dent Res 1973; 3:97-102.

WALKER A. Definitive and dependable therapy for pulpless teeth. J Am Dent Assoc 1936; 23:1418-24.

WAYMAN BE, KOPP WM, PINERO GJ, LAZZRI EP. Citric and lactic acids as root canal irrigants *in vitro*. J Endodon 1979; 5: 258-65.

WEINE FS. Endodontic Therapy. 4th edn. St Louis, MO, USA: The CV Mosby Co., 1989.

WEISS EI, SHALHAV M, FUSS Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. Endod Dent Traumatol 1996; 12:179-84.

WHITE RR, GOLDMAN M, LIN P. The influence of the smeared layer upon dentinal tubule penetration by plastic materials. J Endodon 1984; 10: 558-62.

WHITE RR, GOLDMAN M, LIN P. The influence of the smeared layer upon dentinal tubule penetration by endodontic filling materials. Part II. J Endodon 1987; 13, 369-74.

WHITE RR, HAYS GL, JANER LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. J Endodon 1997; 229-31.

WILLIAMS S, GOLDMAN M. Penetrability of smeared layer by a strain of *Proteus vulgaris*. J Endodon 1985; 11: 135-8.

YAMADA RS, ARMAS A, GOLDMAN M, LIN PS. A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: Part III. J Endodon 1983; 9:137-42.

YESILSOY C, WHITAKER E, CLEVELAND D, PHILLIPS E, TROPE M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. J Endodon 1995; 10 513-5.

YOSHIDA M, FUKUSHIMA H, YAMAMOTO K, OGAWA K, TODA T, SAGAWA H. Correlation between clinical symptoms & microorganisms isolated from root canals with periapical pathosis. J Endodon 1987; 13: 24-8.

ZAVISTOSKI J, DZINK J, ONDERDONK A, BARLETT JJ. Quantitative bacteriology of endodontic infections. Oral Surg 1980; 49: 171-4.

ANEXOS

ANEXO I - MEIOS DE CULTURA

1. Brain Heart Infusion Broth (BHI) - Caldo Infusão Cérebro- Coração (Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK - CM 225)

1.1 Descrição

Meio de infusão isotônico rico com triptose (uma mistura de carne e peptonas do leite) promovendo uma ampla gama de substratos. Uma concentração baixa de glicose é utilizada para estimular crescimento precoce. O meio é ligeiramente tamponado para impedir a morte rápida de algumas espécies devido a produção de ácido. O meio é adequado para uso como meio de cultura para sangue ou como um caldo enriquecido para organismos fastidiosos.

1.2 Método para reconstituição

Dispensar 18,5 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min e depois dissolvida sob aquecimento

brando antes de ser distribuída em tubos ou frascos. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min. O superaquecimento irá causar caramelização e escurecimento do meio.

1.3 Aparência

Amarela clara

1.4 Armazenagem do meio preparado

Frascos com tampa: até 3 meses a 15-20°C no escuro.

1.5 Inoculação (como meio de cultura para sangue)

Usar um volume mínimo de 50 mL de meio e adicionar o sangue numa diluição de 1:10 a 1:20. Usar em conjunto com um meio de cultura anaeróbico (ex. Fastidious Anaerobe Medium- C170-1).

1.6 Incubação

37°C aerobicamente de 7 a 15 dias

1.7 Interpretação de crescimento microbiano

Observar diariamente, subculturas após 1,2,3,7 e 15 dias ou imediatamente após haver sinal de crescimento microbiano.

1.8	Fórmula	g/L
	Infusão de sólidos de cérebro-coração	17,5
	Proteose peptona	10,0
	Glicose	2,0
	Cloreto de sódio	5,0
	Fosfato di-sódio	2,5

pH: $7,4 \pm 0,2$

2. Brain Heart Infusion Agar (BHIA) - Agar Infusão Cérebro-Coração **(Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK -CM 375)**

2.1 Descrição

Ágar base para todos os usos.

Este meio foi desenvolvido inicialmente para o isolamento de patógenos orais. Com o acréscimo de 5% de sangue desfibrinado, o meio permitirá o crescimento de uma variedade ampla de organismos fastidiosos. O fosfato tamponado permite neutralizar os ácidos produzidos pela utilização da glicose e então manter a viabilidade. Este meio não é recomendado para a determinação de reações hemolíticas por conter glicose.

2.2 Método para reconstituição

Dispensar 23,5 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47°C antes de ser distribuída nas placas de petri.

2.3 Aparência

Amarela clara (sem adição de sangue).

2.4 Armazenagem do meio preparado

Placas: até 7 dias a 4°C no escuro

Frascos com tampa: até 3 meses a 15-20°C no escuro.

2.5 Inoculação

Em superfície, plaqueando para obter colônias puras.

2.6 Incubação

Tempo e temperatura favorável aos microrganismos.

2.7 Características de crescimento

Colônias brancas/ transparentes em meio sem sangue.

2.7.1 Características de crescimento (com sangue desfibrinado)

Organismos	Tamanho da Colônia (mm)	Forma & Superfície	Cor
<i>S. aureus</i>	1,0-1,5	CV. I. B.	branca / dourada
" <i>S. milleri</i> "	PG-0,1	CV. I. B.	transparente / branca
<i>E. faecalis</i>	1,0-1,25	CV. I. B.	cinza / esverdeada
<i>S. pneumoniae</i>	0,5-1,0	A. I. B.	cinza / esverdeada

A = achatada
 B = brilhante
 CV = convexa
 I = inteira
 PG = pontiaguda

2.8 Fórmula g/L

Infusão de sólidos de cérebro-coração	17,5
Proteose peptona	10,0
Glicose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato disódico	2,5
Ágar no. 2	10,0

pH: 7,4 ± 0,2

3. **Mueller-Hinton Agar (MHA)** **(Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK - CM 337)**

3.1 Descrição

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

3.2 Método para reconstituição

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

3.3 Aparência

Amarela clara

3.4 Armazenagem do meio preparado

Placas: até 7 dias a 4°C no escuro

3.5 Inoculação

Em superfície, de acordo com o NCCLS.

3.6 Incubação

37°C aerobicamente por 16-18 h (metecilina a 30°C) .

3.7	Fórmula	g/L
	Carne de vaca, de infusão desidratada	300,0
	Hidrolisado de caseína	17,5
	Amido	1,5
	Agar no. 1	17,0
	Íons cálcio	50-100 mg/L
	Íons magnésio	20-35 mg/L

pH: 7,4 ± 0,2

4. **Fastidious Anaerobe Agar (FAA) - Agar para anaeróbios exigentes - (Biobrás SA, Montes Claros, MG – C270-1)**

4.1 Descrição

Meio primário de isolamento capaz de favorecer o crescimento dos anaeróbios de maiores implicações clínicas. Este meio foi desenvolvido pelo Lab M (Bury, UK).

As peptonas são incorporadas para máxima estimulação de crescimento. Amido e bicarbonato de sódio atuam como agentes desintoxicantes, enquanto que a hemina favorece a produção de pigmento nos "*Bacteroides*" de pigmento negro. Agentes específicos de estimulação de crescimento são os seguintes: cisteína para *Fusobacterium necrophorum*, *Propionibacterium acnes* e *Bacteroides fragilis*; arginina para *Eubacterium* spp.; pirofosfato solúvel para *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas asaccharolytica*. Piruvato contribui para a neutralização do peróxido de hidrogênio e pode ser também utilizado pela *Veillonella* spp. como fonte de energia. Vitamina K e succinato de sódio fornecem fatores essenciais de crescimento para alguns anaeróbios como também 0,1% de glicose. O nível baixo de glicose impede a produção de níveis elevados de ácidos e de álcoois que poderiam inibir o crescimento microbiano.

4.2 Método para reconstituição

Dispensar 23,0 g do pó em 500 mL de água deonizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47°C. Então adicionar assepticamente 5% de sangue de carneiro desfibrinado, misturar bem e distribuir nas placas de petri.

Este meio pode ser seletivo para várias espécies de anaeróbios através da adição de antibióticos seletivos, exemplo:

1. Anaeróbios Gram-positivos não formadores de esporos e *Actinomyces*: ácido nalidíxico (Lab X091) + Tween 80
2. *Clostridium* spp. (anaeróbios esporulados) e outros anaeróbios: neomicina (Lab X015)
3. Anaeróbios Gram-negativos: ácido nalidíxico + vancomicina (Lab X090)

4.3 Aparência

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

4.4 Armazenagem do meio preparado

Placas: até 7 dias a 4°C no escuro

4.5 Inoculação

Em superfície, plaqueando para obter colônias puras.

4.6 Incubação

37°C anaerobicamente em atmosfera de 80% H₂, 10% N₂, 10% CO₂, por períodos entre 48 h e 7 dias.

4.7 Características de crescimento (48 h)

Organismos	Tamanho da colônia (mm)	Forma & Superfície	Cor
<i>P. gingivalis</i>	0,5-1,0	CV. I.B.	cinza / preta
<i>F. necrophorum</i>	1,0-2,0	CV. I.B.	transparente
<i>P. anaerobius</i>	0,5-2,0	CV. I.B.	branca / cinza
<i>P. micros</i>	0,5-2,0	CV. I.B.	branca / cinza

B = brilhante

CV = convexa

I = inteira

4.8 Fórmula g/L

Mistura de peptona	23,0
Cloreto de sódio	5,0
Amido solúvel	1,0
Agar no.2	12,0
Glicose	0,4
Piruvato de sódio	1,0
Monoidrato HCL cisteína	1,0
Hemina	0,5
Vitamina K	0,001
L-arginina	1,0
Pirófosfato solúvel	0,25
Succinato de sódio	0,5

pH: 7,4 ± 0,2

ANEXO II - KIT DE IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

1. API 20 Strep

1.1 Descrição

API 20 Strep (#) é um teste bioquímico para identificação da maioria dos *Streptococcus* encontrados na bacteriologia médica baseado em 20 testes.

Cada kit contém 25 tiras de testes, recipientes de incubação, ampolas de meio GP, folhas para resultados e manual de instrução API 20 Strep. A identificação das cepas pode ser interpretada com o “Analytical Profile Index” ou com o software APILAB. As tiras de testes API 20 Strep e as ampolas devem ser armazenadas entre 2-8°C.

1.2.	Materiais	
1.2.1	Meio de Suspensão	
	Água destilada	2 ml
1.2.2	GP medium (meio GP)	2 ml
	Cistina	0,5 g
	Triptona	20,0 g
	Cloreto de sódio	5,0 g
	Sulfito de sódio	0,5 g
	Vermelho fenol	0,17 g
	Água desmineralizada qsp	1000 ml
	pH: 7,8	
1.2.3	Reagente NIN	5 ml
	Ninhidrina	7 g
	2-metoxietanol	100 ml
1.2.4	Reagente VP1	5 ml
	Hidróxido de potássio	40 g
	Água	100 ml
1.2.5	Reagente VP 2	5 ml
	α -naftol	6 g
	Etanol	100 ml

1.2.6	Reagente ZYM A	8 ml
	Tris-hidroximetil-aminometano	25 g
	Ácido hidrolórico	11 ml
	Sulfato de lauril sódio	10 g
	Água	100 ml
1.2.7	Reagente ZYM B	8 ml
	Azul rápido BB	0,35 g
	2-metoxietanol	100 ml
1.2.8	Padrão de McFarland: 4	
1.2.9	Pipetas plásticas descartáveis	
1.2.10	Óleo mineral	
1.2.11	<i>Swabs</i> estéreis	
1.2.12	Ágar sangue (Brain Heart Infusion ou Columbia)	

1.3 Procedimentos para identificação

Os organismos são subcultivados em placas de 5% sangue de carneiro desfibrinado + Brain Heart Infusion agar durante 18-24 h a 37°C. A pureza das colônias deve ser primariamente determinada pela coloração de Gram, morfologia das colônias, produção de catalase e requerimentos gasosos. Estes

procedimentos permitem a identificação primária das cepas como cocos Gram-positivos, catalase negativa e anaeróbios facultativos.

Swab estéril é usado para inoculação do meio de suspensão. Utiliza-se um inóculo moderado e a suspensão microbiana homogênea da cultura é ajustada com turbidez igual ao padrão McFarland 4.

Cinco ml de água é adicionado no recipiente de incubação para se manter uma atmosfera úmida e a seguir coloca-se nele uma tira de testes API 20 Strep.

Uma pipeta estéril é então introduzida no meio de suspensão e somente a porção inferior dos tubos (testes VP a ADH) é preenchida com a suspensão, evitando a formação de bolhas. Na segunda metade do teste (RIB a GLYG), abrir a ampola do Meio GP e transferir o resto da suspensão para ela. Misturar bem. Distribuir a nova suspensão nas cúpulas.

Preencher as cúpulas dos testes ADH a GLYG com duas gotas de óleo mineral.

Tampar a tira e incubar o conjunto sob condições aeróbicas a 37°C por 4 h. Após este período, adicionar os reagentes.

TESTS	SUBSTRATES	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS			
			NEGATIVE		POSITIVE	
VP	Pyruvate	Acetoin production	VP1+VP2/wattOmin (3) Colorless Pink-Red			
HIP	Hippurate	Hydrolysis	NIN / wait 10 min Colorless/Pale blue Dark blue/Violet			
ESC	Esculin	β -glucosidase	4 hrs.	24 hrs.	4 hrs.	24 hrs.
			Colorless Pale yellow	Colorless Pale yellow Light grey	Black gray	Black
PYRA	Pyrolidonyl 2 naphthylamide	Pyrolidonyl arylamidase	ZYM A + ZYM B/ 10 min (PYRA to LAP) (1) If necessary, decolorize with intense light Colorless or very pale orange Orange			
α GAL	6-Bromo-2-naphthyl α -D-galactopyranoside	α -galactosidase	Colorless		Violet	
β GUR	Naphthyl AS-BI β -D-glucuronate	β -glucuronidase	Colorless		Blue	
β GAL	2-naphthyl- β -D- galactopyranoside	β -galactosidase	Colorless or very pale violet		Violet	
PAL	2-naphthyl phosphate	Alkaline phosphatase	Colorless or very pale violet		Violet	
LAP	L-leucine-2-naphthylamide	Leucine arylamidase	Colorless		Orange	
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Yellow		Red	
<u>RIB</u> <u>ARA</u> <u>MAN</u> <u>SOR</u> <u>LAC</u> <u>TRE</u> <u>INU</u> <u>RAF</u> <u>AMD</u>	Ribose	Acidification	4 hrs.	24 hrs.	4 hrs.	24 hrs.
	L-Arabinose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
	Mannitol	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
	Sorbitol	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
	Lactose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
	Trehalose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
	Inulin	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
	Raffinose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
	Starch (2)	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
GLYG	Glycogen	Acidification	Red or Orange		Bright yellow	