



ANA CAROLINA MASCARENHAS OLIVEIRA

**“EFETIVIDADE *IN VITRO* DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS
AUXILIARES E MEDICAÇÕES INTRACANAIS SOBRE
MICRORGANISMOS E ENDOTOXINA EM CANAIS
RADICULARES”**

PIRACICABA
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ANA CAROLINA MASCARENHAS OLIVEIRA

**“EFETIVIDADE *IN VITRO* DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS
AUXILIARES E MEDICAÇÕES INTRACANAIS SOBRE
MICRORGANISMOS E ENDOTOXINA EM CANAIS
RADICULARES”**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Título de Doutora em Clínica
Odontológica – Área de Endodontia

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

Este exemplar corresponde à versão final da Tese defendida pela aluna Ana Carolina Mascarenhas Oliveira e orientada pela Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Assinatura da Orientadora

PIRACICABA
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

OL4e Oliveira, Ana Carolina Mascarenhas, 1982-
Efetividade in vitro de substâncias químicas auxiliares e
medicações intracanaís sobre microrganismos e endotoxina em
canais radiculares / Ana Carolina Mascarenhas Oliveira. --
Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Viabilidade microbiana. 3. Reação em cadeia
da polimerase. 4. Microscopia confocal. I. Gomes, Brenda Paula
Figueiredo de Almeida, 1961- II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: In vitro effectiveness of auxiliary chemical substances and
intracanal medications on microorganisms and endotoxin in root canals

Palavras-chave em Inglês:

Endodontics

Microbial viability

Polymerase chain reaction

Confocal microscopy

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Doutora em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes [Orientador]

Lourdes Aparecida Martins dos Santos Pinto

Maria Cristina Borsatto

Flaviana Bombarda de Andrade

Izabel Cristina Froner

Data da defesa: 06-03-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



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 06 de Março de 2013, considerou a candidata ANA CAROLINA MASCARENHAS OLIVEIRA aprovada.

Profa. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

Profa. Dra. LOURDES APARECIDA MARTINS DOS SANTOS PINTO

Profa. Dra. MARIA CRISTINA BORSATTO

Profa. Dra. FLAVIANA BOMBARDA DE ANDRADE

Profa. Dra. IZABEL CRISTINA FRONER

Dedico este trabalho...

À minha mãe Ivone Marina Mascarenhas Oliveira...

A quem amo e por quem me sinto amada. Símbolo de coragem, fé, trabalho, sabedoria, força e amor. A aquela que me ensinou o respeito à vida, a dedicação aos estudos, o desapego às coisas deste mundo, a persistência diante das adversidades e, sobretudo, o amor às pessoas, ao trabalho, aos animais e ao nosso planeta.

“Mãinha, tu és o mais lindo presente com o qual o Pai Eterno poderia me agraciar nesta encarnação. O vento que sopra sobre a ferida aberta e alivia todas as dores, a palavra de esclarecimento nos momentos de escolha ou confusão, a mão sempre pronta a consolar e corrigir com a doçura que somente uma mulher guerreira e iluminada poderia ter. E o que seria de mim sem a tua existência? Certamente não seria a pessoa de agora, mas sim uma obra ainda mais necessitada de melhorias, rearranjos e lapidação. Mas Deus que é só misericórdia diminuiu anos do meu sofrimento te colocando no meu caminho. Com a sabedoria de quem supostamente nunca estudou Platão ou nunca discutiu Matrix, antes e ainda hoje quando o meu apego me faz sofrer, tu me ensinas sobre o mundo das idéias e dos sentidos, dizendo: Filha, é tudo ilusão! Só cabe na tua mala de viagem as tuas experiências, a ciência que aprendestes na escola e a ciência que aprendestes com a vida... Eu abaixo a cabeça e simplesmente penso no quanto ainda precisarei viver para ser igual a ti... Meu anjo, minha mãe, me lembrarei de ti por todos os séculos vindouros e por onde quer que a espiritualidade leve a minha alma eu chamarei pelo teu refúgio, por que tu és amor e incondicionalmente EU TE AMO!”

À minha querida Beatriz Zuin...

Por todo amor e companheirismo. Por me mostrar uma realidade de paz e serenidade e me dar, com sua presença, felicidade e conforto. Orgulho-me de ti pela tua garra e fé, mas, sobretudo, pela tua sensibilidade, a qual só quem te leu nas entrelinhas, conseguiria enxergar. Rogo a Deus que te conceda a felicidade que tu, tão incansavelmente, procuras. Obrigada por me ouvir, me entender e ser o meu abrigo nos dias de tempestade. És uma pessoa especial e divina. E eu te amo!!!

Agradecimentos especiais..

À espiritualidade maior,

Que tem guiado os desígnios desse planeta e dos povos que nele habitam. Agradeço pela proteção, pela misericórdia, pelo conforto espiritual, pela oportunidade de participar dessa era doando um pouco do que outrora me foi doado e principalmente pela oportunidade ímpar de aprendizado junto a pessoas tão maravilhosas que formam o conjunto dos meus familiares, amigos e colegas de trabalho. Obrigada por todo auxílio mental e espiritual, sem o qual, essa obra, mais um degrau na longa escada do meu desenvolvimento, não seria realizada.

À minha família...

Pelo incentivo constante para que eu chegasse até aqui, festejando comigo cada etapa finalizada e me mostrando carinhosamente os erros a serem reparados. Por me fazer sentir amada e confortada em todos os momentos e por me mostrar que eu podia mais. Pela presença, pelo amor, pela cumplicidade... Essa vitória é de vocês. Mami, Papi, Manu e Teté, os amarei para sempre!!!

Ao meu querido Peri...

Pela confiança, amor e lealdade. Por estar presente em minha vida, ouvindo meus desabaços e festejando minhas conquistas, por ser meu motivo de alegria constante e me fazer sentir feliz pelo simples fato de te encontrar em casa, após um longo dia de trabalho. Abraçar-te, brincar, cuidar de ti e observar teu desenvolvimento me fazem sentir viva e parte efetiva do Multiverso. Amo-te e te levarei para sempre em meu coração.

Agradecimentos..

À minha orientadora, **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, pela confiança depositada em mim na realização deste trabalho. Mas principalmente por estar sempre presente com um sorriso de esperança no rosto e palavras de encorajamento. Foi um lindo presente ter-lhe ao meu lado nesta trajetória. Obrigada pela oportunidade, carinho e atenção.

À **FAPESP, CAPES e CNPq** pela concessão de bolsa de estudo e auxílio técnico para realização deste trabalho.

À **Universidade Estadual de Campinas**, na presença do seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa e Vice-reitor Prof. Dr. Edgar Salvadori De Decca.

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP, da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP**, na presença do seu Diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Junior e seu Vice-diretor Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia. "Agradeço a esta Casa do Saber pelo incentivo na realização deste trabalho."

Ao **Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP**, representado pela Chefe de Departamento Profa. Dra. Giselle Maria Marchi Baron e pelo vice-chefe Prof. Dr. José Flávio Afonso de Almeida.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP**, representado pelo Prof. Dr. Márcio de Moraes.

Aos **docentes da Disciplina de Endodontia** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho, Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz e Prof. Dr. José Flávio Afonso de Almeida, por todo incentivo e contribuição à minha formação profissional.

Aos professores componentes da banca examinadora do Exame de Qualificação, Profa. Dra. **Danna Mota Moreira**, Prof. Dr. **Rafael Nóbrega Stipp** e Prof. Dr. **Wander José da Silva**, pela contribuição a este trabalho.

A todos os **funcionários da Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

A todos os **funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pelo tratamento sempre tão carinhoso e prestativo.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pelo auxílio constante durante todo o curso de doutorado.

Aos **colegas de turma do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica**, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP, Daniel Herrera, Maíra Prado, Giselle Abi Rached e Carlos Augusto Pantoja por todos os momentos de aprendizado e lazer que passamos juntos.

Aos **colegas do curso de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP**, Ana Pimentel, Aniele Lacerda, Ariane Marinho, Carlos Augusto Pantoja, Carlos Vieira, Carolina Carvalho, Cláudia Suzuki, Cimara Brum, Daniel Herrera, Daniela Miyagaki, Danna Mota, Douglas Cecchin, Emmanuel Silva, Erika Clavijo, Ezilmara Rolim, Fernanda Signoretti, Francisco Montagner, Frederico Martinho, Giselle Abi

Rached, Joelson Brum, Juliana Melo, Juliana Nagata, Karine Schell, Letícia Nóbrega, Maíra Prado, Marcos Endo, Rachel Monteiro, Rogério Castilho, Shaiana Kawagoe, Tereza Pedrosa, Thaís Accorsi, Thaís Mageste, Thiago Farias, Thiago Rosa, Vanessa Rossi e Wanderson Chiesa, pela amizade e convívio enriquecedores.

*Às queridas **Ana Cristina Godoy, Ana Polay, Geovania Almeida, Letícia Machado, Paula Fonte** e **Simone Sartório** pela amizade e auxílio na execução desse trabalho. Muito obrigada!*

*À professora **Lourdes dos Santos Pinto**, minha querida Tuka, por todos esses anos de trabalho e amizade, por todos os ensinamentos científicos e de vida, por todas as críticas sempre construtivas, fundamentais em minha formação profissional. Por ser um dos meus maiores exemplos de mulher, mãe, esposa, profissional e mestre. “As sementes que tens plantado são de amor e trabalho e quão lindas são as flores que tens colhido ao longo da tua vida e colherás nas vindouras. Que Deus te conserve no caminho do bem, onde tua vitória é garantida. Minha gratidão eterna a ti.”*

*À **Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr**, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, minha alma mater, à qual mui respeitosamente agradeço pela formação profissional e pessoal.*

*Às minhas **eternas mestres** Elaine Massucatto, Edivani Dotta, Cláudia Navarro, Denise Spolidório, Lourdes dos Santos Pinto e Rita de Cássia Cordeiro, por toda atenção, paciência e carinho.*

*Aos meus **queridos amigos**, Amélia Tomazzelli (in memorian) & Família, Francisco Mascarenhas & Família, Lara Bing & Família, Rosana Flório & Família, Luiz Pivetta & Família, pessoas que Deus colocou em meu caminho em momentos*

tão oportunos e que me apoiaram quando mais necessitei. A todos vocês, minha gratidão e amor.

*A toda **Família Zuin**, pelos momentos felizes vividos juntos, pelo carinho e acolhimento... Lourdes, Valentim, Nê, Sueli, Sônia, Nando, Miro, Fio e as crianças.*

*A toda **minha família**, especialmente à minha querida avó Elvira Araújo Mascarenhas e minha querida tia Marlene Xavier de Oliveira, símbolos de determinação e fé. Muito obrigada pelo lindo exemplo de vida e amor. Amo vocês!!!*

*Aos **queridos amigos**, Paulo Lima, Roberto Braga, Milene Fratini, Daniel Pizzaia, Fabiana Galdino, Aline Galdino, Priscila Frassetto, pelos momentos tão felizes vividos “onde o peixe pára”.*

*A **todos** que direta ou indiretamente fizeram parte deste trabalho.*

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a efetividade de substâncias químicas auxiliares (SQA) e medicações intracanaís (MIC) sobre microrganismos e endotoxina em canais radiculares. Dentes humanos extraídos unirradiculares ($n=520$) foram raspados e seccionados, tendo suas coroas descartadas e as raízes padronizadas no comprimento de 15 mm. As raízes foram armazenadas em solução fisiológica (NaCl 0,9%) (SF) estéril e congeladas em freezer a -20°C até sua utilização. As 520 raízes foram impermeabilizadas, instrumentadas, incluídas em placas de poliestireno, esterilizadas por gás de óxido de etileno e inoculadas com *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans* durante 28 dias. Dentre as 520 raízes, 400 foram utilizadas para análise microbiológica (identificação fenotípica/molecular) e quantificação de endotoxinas pelo teste LAL (Lisado do amebócito de *Limulus*). Para tanto, coletas foram realizadas em diferentes momentos da fase de PQM e do uso de MIC: 7, 14 e 30 dias. As quatrocentas raízes foram divididas aleatoriamente em grupos e instrumentadas de acordo com a SQA utilizada durante o preparo químico-mecânico (PQM) com ($n=360$) ou sem ($n=40$) o uso de EDTA 17%, respectivamente: hipoclorito de sódio (NaOCl) 5,25% ($n=90/10$), clorexidina 2% gel (CLG 2%) ($n=90/10$), NaOCl 5,25% e irrigação com CLL 2% (clorexidina líquida) ($n=90/10$) e SF (controle) ($n=90/10$). Em seguida, as raízes irrigadas com EDTA 17% foram divididas em grupos de acordo com a MIC utilizada: CLG 2% ($n=90$), hidróxido de cálcio (HC) + CLG 2% ($n=90$), HC + SF (9:1) ($n=90$) e SF (controle) ($n=90$). Demais raízes ($n=120$) foram submetidas a diferentes SQA e MIC, sendo analisadas por meio de microscopia confocal quanto à viabilidade microbiana. Os dados foram submetidos à análise estatística em nível de significância de 5%. Observou-se que PQM com CLG 2%, NaOCl 5,25% e NaOCl 5,25% seguido de irrigação final com CLL 2% promoveu redução de *E. coli*, *E. faecalis*, *C. albicans* e endotoxina de *E. coli*. Após sete dias do PQM, observou-se reinfecção do canal radicular. CLG 2%, NaOCl 5,25%, NaOCl 5,25% seguido de irrigação com CLL 2%, HC + SF, e HC + CLG 2% não demonstraram capacidade de eliminar endotoxina de *E. coli*. Concluiu-se que CLG 2%, NaOCl 5,25%, NaOCl 5,25% seguido de irrigação com CLL 2%, HC + SF, e HC + CLG 2% foram efetivos na redução de *E. coli*, *E. faecalis* e *C.*

albicans. Menor redução microbiana ocorreu nos túbulos dentinários comparada à luz do canal radicular. Nenhuma substância foi capaz de eliminar endotoxina de *E. coli*.

Palavras-chave: Endodontia, Viabilidade microbiana, Reação em cadeia da polimerase, Endotoxinas, Microscopia confocal

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate *in vitro* the effectiveness of the auxiliary chemical substances and intracanal medications on microorganisms and endotoxins in root canals. Single-rooted extracted human teeth ($n=520$) were scraped and sectioned, and their crowns discarded. The roots were standardized at 15 mm and stored in sterile saline at -20°C until use. They ($n=520$) were externally waterproof, endodontically instrumented, included in microtiter plates, sterilized by ethylene oxide gas and inoculated with *E. faecalis*, *E. coli*, and *C. albicans* for 28 days. Among the 520 roots, 400 were used for microbiological assay (phenotypic/molecular identification) and endotoxin assay by LAL test (*Limulus* ameocyte Lysate). Samples were collected at different times on CMP and intracanal medication: 7, 14 and 30 days. Four hundred roots were randomly divided into groups and instrumented according to the auxiliary chemical substances used during chemomechanical preparation (CMP) with ($n=360$) or without ($n=40$) 17% EDTA, respectively: 5.25% sodium hypochlorite (NaOCl) ($n=90/10$); 2% chlorhexidine gel (CLG) ($n=90/10$); 5.25% NaOCl and final irrigation with 2% CLL ($n=90/10$); and saline (control) ($n=90/10$). The roots irrigated with 17% EDTA were divided into subgroups according to intracanal medication: 2% CLG ($n=90$); calcium hydroxide (CH) plus 2% CLG ($n=90$); CH plus saline (9:1) ($n=90$); and saline (control) ($n=90$). Another roots ($n=120$) were submitted to different auxiliary chemical substances and intracanal medications and analyzed by confocal microscopy regarding microbial viability. The results were statistically analyzed at 5% significance level. CMP with 2% CLG, 5.25% NaOCl, and 5.25% NaOCl plus 2% CLL promoted reduction of *E. coli*, *E. faecalis*, *C. albicans* and endotoxin levels. Seven days after CMP, the root canals were re-infected. 2% CLG, 5.25% NaOCl, 5.25% NaOCl plus 2% CLL, CH, and CH plus 2% CLG showed no ability on endotoxin elimination. It was concluded that 2% CLG, 5.25% NaOCl, 5.25% NaOCl plus 2% CLL, CH, and CH plus 2% CLG was effective on reducing *E. coli*, *E. faecalis*, and *C. albicans*. Lower microbial reduction occurred in the dentinal tubules compared to the root canal. No substance was able to eliminate endotoxin.

Key words: Endodontics, Microbial viability, Polymerase chain reaction, Endotoxins, Confocal microscopy

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection -Banco da Coleção de Culturas Americanas
CL	Clorexidina
CLG	Clorexidina gel
CLL	Clorexidina líquida
DNA	Deoxyribonucleic acid - ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EU/mL	Unidade de endotoxinas por mililitro
IL	Interleucina
LAL	Lisado de amebócitos de <i>Limulus</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MCVL	Microscopia confocal de varredura a laser
MIC	Medicação intracanal
mL	Mililitro
mmHg	Milímetro de mercúrio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NiTi	Níquel-titânio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SF	Solução fisiológica
SQA	Substância química auxiliar
Taq DNA polimerase	DNA polimerase termoestável proveniente da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
μL	Micro litro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3. PROPOSIÇÃO.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
5. RESULTADOS.....	71
6. DISCUSSÃO.....	99
7. CONCLUSÃO.....	115
REFERÊNCIAS.....	117
APÊNDICE I.....	143
APÊNDICE II.....	154
APÊNDICE III.....	161
ANEXO I.....	169

1. INTRODUÇÃO

Microorganismos e seus subprodutos são os principais responsáveis pelas infecções pulpares e periapicais, sendo de fundamental importância sua eliminação durante o tratamento endodôntico (Sundqvist, 1992; Gomes *et al.*, 1996a,b,c, 2004b, 2008; Siqueira & Roças, 2009; Li *et al.*, 2010; Martinho *et al.*, 2010).

Cerca de setecentas espécies de microrganismos, pertencentes a 11 filos, foram identificadas na cavidade oral, dentre bactérias, fungos, protozoários, vírus e archaea (Gomes *et al.*, 1994, 1996a,b,c, 2004; Siqueira & Roças 2005; Vianna *et al.*, 2006a,b, 2009a; Montagner *et al.*, 2010a,b; Ozok *et al.*, 2012). Entretanto, o ambiente seletivo do canal radicular faz com que apenas alguns microrganismos sejam capazes de colonizar este sistema, com predominância de bactérias. Destas setecentas espécies, cerca de duzentas foram identificadas em infecções endodônticas (Siqueira *et al.*, 1998, 2004; Gomes *et al.*, 2004; Siqueira & Roças, 2005; Jacinto *et al.*, 2007; Montagner, 2009, 2010; Montagner *et al.*, 2010a,b; Nóbrega, 2012; Nóbrega *et al.*, 2013).

As infecções pulpares primárias caracterizam-se por serem polimicrobianas, com predominância de bactérias anaeróbias estritas Gram-negativas. Bactérias Gram-positivas também exercem papel importante nesta infecção (Sundqvist, 1992; Gomes *et al.*, 1996a,b,c; Pinheiro *et al.*, 2003a,b; Gomes *et al.*, 2004; Jacinto *et al.*, 2007; Vianna *et al.*, 2005b, 2006b, 2007, 2008; Gomes *et al.*, 2008; Martinho *et al.*, 2011; Nóbrega, 2012). Dentre os gêneros predominantes, têm-se diversos microrganismos Gram-negativos, como *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Tannerella* e *Treponema* (Siqueira *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2004, 2006a; Jacinto *et al.*, 2006, 2007; Montagner *et al.*, 2010a,b, 2012; Nóbrega *et al.*, 2013).

Por outro lado, cepas de anaeróbios facultativos Gram-positivos são isoladas com maior frequência nos casos de insucesso do tratamento endodôntico (Gomes *et al.*, 1996b; Siqueira *et al.*, 2001b; Pinheiro *et al.*, 2003a,b; Siqueira & Roças, 2004; Gomes *et al.*, 2004, 2006b, 2008). Nesses casos, a microbiota é geralmente composta por um número menor de espécies que as infecções primárias (Sundqvist *et al.*, 1998; Pinheiro *et al.*, 2003a,b; Siqueira & Roças, 2004; Gomes *et al.*, 2004, 2008). Os principais patógenos

associados à infecção pulpar secundária pertencem aos gêneros *Enterococcus*, *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Candida*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* (Waltimo *et al.*, 1997; Sundqvist *et al.*, 1998; Peciuliene *et al.*, 2000; Pinheiro *et al.*, 2003a,b; Siqueira & Roças, 2004; Gomes *et al.*, 2004; Foschi *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2008; Endo *et al.*, 2012, 2013), sendo as espécies *E. faecalis* e *C. albicans* predominantes (Molander *et al.*, 1998; Dahlén *et al.*, 2000; Siqueira *et al.*, 2002; Pinheiro *et al.*, 2003a,b; Gomes *et al.*, 2004; Siqueira & Roças, 2004; Siqueira & Sen, 2004; Rôças *et al.*, 2004; Siqueira & Rôças, 2008; Chandra, 2009).

E. faecalis é um coco anaeróbio facultativo Gram-positivo associado a diferentes formas de infecções endodônticas, sendo encontrado com maior frequência em infecções endodônticas secundárias assintomáticas (Pinheiro *et al.*, 2003a,b; Siqueira & Roças, 2004; Gomes *et al.*, 2004; Foschi *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2008).

C. albicans é uma levedura presente na microbiota indígena da cavidade bucal e tem se mostrado resistente ao tratamento endodôntico (Valera *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003a,b; Siqueira & Sen, 2004; Molina, 2008; Siqueira & Rôças, 2008, 2009; Valera *et al.*, 2009; Nastri *et al.*, 2011).

A persistência de microrganismos nos canais radiculares exerce papel fundamental no insucesso do tratamento endodôntico (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Dahlén, 2000; Pinheiro *et al.*, 2003a,b; Gomes *et al.*, 2004, 2006b; Endo, 2011; Endo *et al.*, 2012, 2013). Os microrganismos podem sobreviver não somente pela incapacidade do preparo químico-mecânico (PQM) em removê-los das complexidades anatômicas, mas também porque alguns nutrientes que ali permaneceram são capazes de favorecer o crescimento destes microrganismos residuais, os quais irão se multiplicar e restabelecer a contaminação do espaço pulpar (Byström *et al.*, 1985; Gomes *et al.*, 1996a,b,c; Siqueira & Lopes, 1999; Gomes *et al.*, 2004, 2006c, 2008).

A ação mecânica dos instrumentos endodônticos é incapaz de promover completa desinfecção de determinadas áreas, devido às complexidades anatômicas do canal radicular (Byström *et al.*, 1985; Gomes *et al.*, 1996a,b,c). Desta forma, a redução ou eliminação de microrganismos e seus subprodutos do sistema de canais radiculares é auxiliada pelo emprego de substância química auxiliar (SQA) e soluções irrigadoras,

durante a execução do PQM, e complementada pela ação da medicação intracanal (MIC) (Sundqvist, 1992; Gomes *et al.*, 1996b; Siqueira *et al.*, 1998; Lima *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2004; Molina, 2008; Valera *et al.*, 2009).

Sabendo-se que as infecções dos canais radiculares são polimicrobianas, as SQA, utilizadas durante o PQM, devem possuir amplo espectro de ação antimicrobiana, além da capacidade de dissolver tecidos e inativar endotoxinas, ausência de citotoxicidade, auxiliar na lubrificação do canal radicular durante a ação de corte dos instrumentos e na remoção de *smear layer* (Spangberg, 1982; Byström & Sundqvist, 1983; Silva *et al.*, 2002; Zehnder, 2006; Martinho & Gomes, 2008).

Hipoclorito de sódio (NaOCl) tem sido amplamente utilizado devido às suas propriedades antimicrobianas e capacidade de dissolver tecidos (Siqueira *et al.*, 1998; Mc Donnel & Russel, 1999; Vianna *et al.*, 2004; Okino *et al.*, 2004). A clorexidina (CL) tem se destacado devido ao seu amplo espectro de ação antimicrobiana, substantividade e baixa citotoxicidade (Hennessey, 1973, 1977; Delany *et al.*, 1982; Greenstein *et al.*, 1986; Fardal & Turnbull, 1986; Cervone *et al.*, 1990; Vahdaty *et al.*, 1993; Siqueira & Uzeda, 1997; Leonardo *et al.*, 1999; Waltimo *et al.*, 1999; Ferraz *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2001; Basrani *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 2002; Tanomaru *et al.*, 2002; Vivacqua-Gomes *et al.*, 2002; Onçag *et al.*, 2003; Zamany *et al.*, 2003; Vianna *et al.*, 2004; Dametto *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2005; Sena *et al.*, 2006; Ferraz *et al.*, 2007; Manzur *et al.*, 2007; Vianna *et al.*, 2009b). Entretanto, ambos demonstram pouca ou nenhuma ação sobre endotoxinas (Gomes *et al.*, 2008; Martinho *et al.*, 2010; Endo, 2011; Endo *et al.*, 2012, 2013).

MIC tem como objetivo potencializar a sanificação do sistema de canais e túbulos dentinários (Byström & Sundqvist, 1981, 1983; Byström *et al.*, 1985; Sundqvist, 1998; Gomes *et al.*, 2009b), sendo sua utilização recomendada nos casos de exsudato persistente, sintomatologia periapical (dor à palpação/percussão), tempo insuficiente para finalização do tratamento endodôntico, fadiga do paciente ou cirurgião-dentista e dentes com ápice aberto (Gomes *et al.*, 2009).

Hidróxido de cálcio (HC) tem sido amplamente utilizado como MIC devido às suas propriedades físicas, biológicas e antimicrobianas (Byström *et al.*, 1985; Gomes *et al.*, 2002, 2003a,b, 2006b, 2009; Valera *et al.*, 2010) que derivam da sua dissociação em íons

cálcio e íons hidroxila (Spangberg, 1994; Haapasalo *et al.*, 2000). Estudos *in vivo* indicam que MIC à base de HC leva à redução ou eliminação dos microrganismos presentes nos canais, entretanto, a redução microbiana é maior após o PQM (Byström *et al.*, 1985; Ørstavik *et al.*, 1991; Sjögren *et al.*, 1991; Vianna *et al.*, 2007, 2008; Endo *et al.*, 2013). Porém, *in vitro*, HC demonstra menor eficácia, em testes utilizando dentes humanos infectados (Estrela *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2003a), dentes bovinos infectados (Safavi *et al.*, 1990; Gomes *et al.*, 2003b), testes de difusão em ágar (DiFiore, 1983; Gomes *et al.*, 2002; 2006b) ou diluição em caldo (Haapasalo *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2006c).

A baixa difusão de íons hidroxila através da dentina infectada, ou mesmo a capacidade tampão da dentina podem impedir a ação da pasta de HC (Haapasalo *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2009b). Assim, o uso de medicações alternativas como a CL, seria uma opção de tratamento, pois esta possui atividade antimicrobiana frente a microrganismos resistentes como *Enterococcus* (Siqueira & Uzeda, 1996; Síren *et al.*, 1997; Molander *et al.*, 1998; Waltimo *et al.*, 1997, 1999; Haapasalo *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2004; Dametto *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2006c; Vianna *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009b). Apesar de sua ampla atividade antimicrobiana, a CL não apresenta as propriedades biológicas ou físicas do hidróxido de cálcio. Por meio da associação da CL com o hidróxido de cálcio, busca-se uma medicação com capacidade de induzir mineralização dos tecidos e neutralização de endotoxinas, que possua amplo espectro antimicrobiano, ação residual, baixa toxicidade aos tecidos e atue como barreira física (Gomes *et al.*, 2006c, 2009b).

HC também tem sido preconizado para neutralização de endotoxinas bacterianas, que são um complexo lipopolissacarídico (LPS) presente na membrana externa das bactérias Gram-negativas, que mesmo após a morte celular continuam desencadeando reação inflamatória, febre, citotoxicidade e reabsorção óssea (MacKane & Kadel, 1986). O LPS é inativado pela ação do HC (Estrela *et al.*, 1995; Tanomaru *et al.*, 2002; Valera *et al.*, 2010), enquanto a CL não atua totalmente sobre ele (Tanomaru *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004; Vianna *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2009a; Endo, 2011; Endo *et al.*, 2012, 2013).

Microrganismos e seus subprodutos, como as endotoxinas, são os principais agentes etiológicos de patologias pulpares e periapicais, assim, torna-se fundamental avaliar a ação de diferentes SQA e MIC sobre os mesmos, a fim de obter um tratamento

endodôntico mais efetivo. Diversos trabalhos foram desenvolvidos *in vitro* (Gomes *et al.*, 2001, 2002, 2003a,b; Vianna *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2005, 2006b; Sena *et al.*, 2006; Ferraz *et al.*, 2007), *ex vivo* (Ferraz *et al.*, 2001; Dametto *et al.*, 2005; Berber *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2009a) e *in vivo* (Vianna *et al.*, 2006a, 2007; Berber, 2009; Martinho & Gomes, 2008; Gomes *et al.*, 2009a; Martinho *et al.*, 2008, 2010a,b, 2011, 2012; Endo *et al.*, 2012, 2013), buscando a redução ou eliminação de microrganismos e endotoxinas, entretanto, mesmo utilizando diferentes técnicas de instrumentação, protocolos de irrigação e de MIC por 7 e 14 dias, a total eliminação do conteúdo microbiológico/endotóxico não foi observada nestes estudos. O presente trabalho visou investigar a efetividade de diferentes protocolos de irrigação e de MIC por 7, 14 e 30 dias no intuito de avaliar tal redução. Assim, foram empregados diferentes métodos para analisar a presença de células microbianas no interior dos canais radiculares (cultura e PCR) e dos túbulos dentinários (microscopia confocal), avaliando se estes microrganismos permaneceriam viáveis após a utilização de diferentes SQA e MIC.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*

O estudo da microbiota endodôntica mostra-se fundamental para o entendimento das interações entre os microrganismos nas infecções primárias e secundárias. Considerando as centenas de espécies identificadas, é enorme a quantidade de combinações de bactérias em um único canal, as quais não ocorrem de forma aleatória, mas pela interação dos microrganismos neste ecossistema. Assim, uma determinada espécie pode impedir ou estimular o crescimento de outras, pode agir em combinações com outras espécies, potencializando sua patogenicidade, ou atuar sinergicamente, deflagrando respostas sintomáticas e sinais clínicos específicos (Gomes *et al.*, 1994).

Enquanto nas infecções pulpares primárias ocorre predominância de bactérias anaeróbias estritas Gram-negativas (Gomes *et al.*, 2004; Jacinto *et al.*, 2007; Vianna *et al.*, 2008; Martinho *et al.*, 2011), anaeróbios facultativos Gram-positivos são isolados com maior frequência nas infecções pulpares secundárias (Siqueira *et al.*, 2001b; Pinheiro *et al.*, 2003b; Siqueira & Roças, 2004; Gomes *et al.*, 2004, 2006a, 2008), sendo as espécies *E. faecalis* e *C. albicans* predominantes (Pinheiro *et al.*, 2003; Roças *et al.*, 2004; Siqueira & Sen, 2004; Siqueira & Rôças, 2004, 2008; Gomes *et al.*, 2006b, 2008; Chandra, 2009).

E. faecalis está associado a diferentes formas de infecções endodônticas, sendo encontrado com maior frequência em infecções endodônticas secundárias assintomáticas, por ser capaz de invadir túbulos dentinários e sobreviver durante e após o tratamento endodôntico por até 13 meses (Vivacqua-Gomes *et al.*, 2005; Gurgel *et al.*, 2007). Além disso, possui capacidade de competição com outros microrganismos, apresenta vários fatores de virulência e é resistente à privação nutricional (Molander *et al.*, 1998; Dahlén *et al.*, 2000; Siqueira *et al.*, 2000; Love, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003a,b; Rôças *et al.*, 2004; Siqueira & Sen, 2004; Siqueira & Rôças, 2004; Sedgley *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2006b; Stuart *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2008; Siqueira & Rôças, 2008; Chandra, 2009).

E. faecalis possui a habilidade de penetrar rapidamente e profundamente nos túbulos dentinários, sendo de difícil remoção. É provável que suas células, no interior dos túbulos dentinários, consigam sobreviver ao PQM e à MIC, colonizar os túbulos e

reinfectar os canais radiculares obturados (Berber *et al.*, 2006). Este microrganismo permanece viável dentro dos túbulos e adere-se ao colágeno na presença de soro humano, o que contribui para que seja um dos principais responsáveis pela persistência de alterações crônicas de dentes tratados endodonticamente.

Molander *et al.* (1998), por meio do método de cultura, demonstraram que bactérias do gênero *Enterococcus* foram as mais frequentemente isoladas em dentes com canais radiculares obturados e lesões periapicais, sendo isoladas em 78% dos casos.

Sundqvist *et al.* (1998), por meio do método de cultura, pesquisaram a microbiota de 54 canais radiculares com lesão periapical persistente e necessidade de retratamento. Após remoção do material obturador, foram realizados testes microbiológicos. A microbiota apresentou-se composta principalmente por espécies únicas de microrganismos Gram-positivos, sendo *E. faecalis* a bactéria isolada e recuperada com maior frequência.

Peciulienė *et al.* (2001), por meio de cultura microbiológica, analisaram a ocorrência de *E. faecalis*, leveduras e bacilos entéricos Gram-negativos em dentes com insucesso do tratamento endodôntico. Encontraram cultura positiva em 33 dos 40 canais radiculares avaliados. Leveduras foram isoladas em seis dentes, três em associação com *E. faecalis*. Bacilos entéricos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*) foram isolados em três dentes e *E. faecalis* em 21 dos 33 canais radiculares que apresentaram cultura positiva.

Distel *et al.* (2002) analisaram a capacidade de *Enterococcus faecalis* em formar biofilme, utilizando 46 raízes medicadas com HC. Por meio de microscopia eletrônica de varredura, observaram microrganismos na parede do canal. Utilizando microscopia laser confocal, após 160 dias, observaram biofilme organizado em forma de cogumelo, com espessura de 21 a 30 µm. A viabilidade bacteriana foi de 90%. Os autores salientam que a estrutura física do biofilme pode proporcionar trocas genéticas, aumentando, assim, a virulência.

Pinheiro *et al.* (2003b), utilizando cultura microbiológica, avaliaram a microbiota de 30 dentes tratados endodonticamente com lesão periapical persistente e sua susceptibilidade frente a antibióticos. *E. faecalis* foi o microrganismo isolado com maior

freqüência (36,7% dos casos), sendo susceptível à benzilpenicilina, amoxicilina e amoxicilina combinada ao clavulanato, entretanto, apresentou resistência à eritromicina e azitromicina.

Gomes *et al.* (2004b), utilizando método de cultura, identificaram bactérias isoladas dos canais radiculares de 41 dentes com infecção primária e 19 com infecção secundária. Os autores observaram que nos casos de infecção secundária, *E. faecalis* foi o microrganismo predominantemente identificado.

Siqueira & Rôças (2004) investigaram 19 espécies microbianas, por meio do método de PCR, em 22 canais de dentes com lesão periapical persistente indicados para retratamento endodôntico. Todas as amostras apresentaram pelo menos uma espécie microbiana. *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais prevalente (17/22, 77% dos casos). Outras espécies detectadas foram *Pseudoramibacter alactolyticus* (12/22, 52%), *Propionibacterium propionicum* (11/22, 52%), *Dialister pneumosintes* (10/22, 48%) e *Filifactor alocis* (10/22, 48%). *Candida albicans* foi encontrada em 9% (2/22) das amostras. A maioria das amostras apresentou infecção mista, com uma média de 4 espécies por canal. Para os casos em que a guta-percha da obturação estava a 2 mm do ápice radiográfico, a média do número de espécies foi 3; enquanto nos casos em que essa distância foi maior que 2 mm, a média foi de 5 espécies. A quantidade de DNA variou de 30 a 730 ng/ μ L.

Gomes *et al.* (2006b) investigaram a presença de *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas por cultura e nested PCR. Amostras microbiológicas foram obtidas de 50 dentes com polpas necróticas (infecção primária) e de 50 dentes com insucesso do tratamento endodôntico (infecção secundária). Técnicas de cultura foram utilizadas, incluindo diluição em série, incubação e identificação bioquímica. Para detecção por PCR, foi utilizado primer espécie-específico do 16 S rRNA e primers da região intergênica downstream. Cultura e PCR detectaram *E. faecalis* em 23/100 e 79/100, respectivamente. *E. faecalis* foi isolado em 2 (4%) dos 50 casos de polpa necrótica e em 21 (42%) dos 50 casos com insucesso do tratamento endodôntico. PCR identificou *E. faecalis* em 41 (82%) e 38 (76%) dos 50 casos de infecção primária e secundária, respectivamente. Concluiu-se que

E. faecalis foi detectado tanto em dentes com necrose pulpar, quanto em dentes com insucesso do tratamento endodôntico quando a análise por PCR foi utilizada.

Stuart *et al.* (2006), analisando a importância de *E. faecalis* no insucesso do tratamento endodôntico, observaram que este microrganismo está presente entre 4 a 40% dos casos de infecções primárias e entre 24 a 77% dos casos de infecções secundárias, quase sempre em infecções crônicas assintomáticas. Isso ocorre devido à sua virulência, pois este microrganismo é capaz de invadir os túbulos dentinários, possui capacidade de competição com outros microrganismos e é resistente à privação nutricional.

Gomes *et al.* (2008), utilizando nested PCR, avaliaram a presença de nove espécies bacterianas em canais radiculares obturados com lesão periapical. Observaram relação sinérgica entre algumas espécies e concluíram que *E. faecalis* foi a espécie mais frequentemente identificada em dentes com insucesso do tratamento endodôntico.

Rôças *et al.* (2008) estudaram a presença e níveis relativos de 28 espécies bacterianas de canais radiculares com tratamento endodôntico prévio, por meio de checkerboard hybridization de captura reversa. PCR foi utilizado para detectar *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Foi detectado DNA bacteriano em todas as amostras. Vinte de 28 espécies da sonda genética foram detectadas em pelo menos uma amostra. Os microrganismos frequentemente detectados incluíram *Streptococcus* spp. (47%), *Lactobacillus* spp. (35%), *Dialister invisus* (29%), *Eubacterium infirmum* (29%), *Prevotella intermedia* (29%), *Selenomonas sputigena* (29%), *Synergistes* clone BA121 (29%) e *Treponema denticola* (29%). Somente seis cepas foram detectadas em níveis acima de 10⁵. Desses, *Streptococcus* spp. e *T. denticola* foram mais prevalentes. O número de espécies detectadas por amostra variou entre 1 a 18 (média de 5,2). Por meio de PCR foi detectado *E. faecalis* (47%) e *C. albicans* (6%). A maioria dos casos apresentou infecção mista, *E. faecalis* quando presente não foi a espécie predominante. Outras espécies bacterianas foram detectadas e podiam estar envolvidas na etiologia da periodontite apical pós-tratamento endodôntico.

Rôças & Siqueira (2012), avaliando a microbiota de dentes com infecção secundária, detectaram *Enterococcus faecalis* em 38% dos casos, compreendendo 9,76%

das contagens totais de bactérias. Com base nesse resultado, os autores questionaram a posição do *E. faecalis* como principal patógeno associado a infecções secundárias.

Segundo Pinheiro *et al.* (2012), embora *E. faecalis* seja um membro da microbiota normal, também está associado a infecções nosocomiais. Ao avaliar dentes obturados com lesão periapical, encontraram linhagens de *E. faecalis* associadas à expressão de cápsula e produção de vários fatores de virulência, o que pode explicar seu maior potencial patogênico e evasão das defesas do hospedeiro.

C. albicans, por sua vez, tem sido observada tanto em infecções endodônticas primárias como nos insucessos do tratamento endodôntico (Siqueira & Sen, 2004), sendo classificada como microrganismo oportunista, altamente resistente ao PQM e à MIC de HC (Valera *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003a,b; Siqueira & Sen, 2004; Molina, 2008; Siqueira & Rôças, 2008, 2009; Valera *et al.*, 2009; Nastri *et al.*, 2011).

Em relação à penetração nos túbulos dentinários, *C. albicans* atinge pouca ou nenhuma profundidade de penetração (Ørstavik & Haapasalo, 1990; Waltimo *et al.*, 2000). Entretanto, Siqueira & Sen (2004) relatam que este microrganismo possui uma variedade de fatores de virulência que podem facilitar sua penetração no interior dos túbulos dentinários, como capacidade de adaptação a uma variedade de condições ambientais, adesão a diferentes superfícies, produção de enzimas hidrolíticas, transição morfológica e formação de biofilme.

Waltimo *et al.* (1997) avaliaram a microbiota de 947 canais radiculares com infecção persistente, observando a presença de fungos em 7% dos isolados, sendo *C. albicans* a espécie mais comum. Leveduras foram encontradas em cultura pura em seis amostras e em conjunto com outras bactérias em 41 amostras. Bactérias anaeróbias foram isoladas junto a leveduras em 12 canais radiculares, incluindo espécies Gram-positivas como *P. micros* e Gram-negativas como *F. nucleatum*. Os resultados indicaram que as leveduras podem ter um importante papel nos casos de periodontite apical, os quais persistem mesmo após tratamento endodôntico convencional.

Segundo Peciulienė *et al.* (2001), a identificação de *C. albicans* em dentes com necrose pulpar e lesão periapical indica que as leveduras possuem um papel importante nos casos de periodontite apical persistente após tratamento convencional.

Egan *et al.* (2002) demonstraram presença de leveduras em 10% dos canais radiculares com periodontite apical, sendo significativamente associada à presença de leveduras (*C. albicans* e *Rodotorula mucilaginosa*) na saliva dos pacientes avaliados.

Sunde *et al.* (2002), analisando a microbiota de dentes com lesão periapical refratária associada ao tratamento com HC, identificaram *E. faecalis* e *C. albicans* em 5,6% dos casos. *E. faecalis* e *C. albicans* foram isolados em cinco dos oito pacientes em que foi administrado o antibiótico fenoximetilpenicilina antes da coleta microbiológica, o que demonstra a resistência destes microrganismos mesmo na presença de medicação sistêmica.

Segundo Siqueira & Sen (2004), os mecanismos de ação associados à patogênese da *C. albicans* estão relacionados à sua capacidade em se adaptar a uma variedade de condições ambientais; sobreviver como comensal; adaptar-se tanto em pH ácido quanto básico; coagregar a bactérias orais como *Actinomyces* e *Fusobacterium nucleatum*; produzir enzimas hidrolíticas que podem causar danos aos tecidos periapicais e efeitos na degradação da matriz extracelular, tais como aspartil proteinase, colagenase, hialuronidase, fosfatases ácidas e alcalinas; transição morfológica, com a mudança da forma de levedura para a forma de hifa, possuindo a habilidade de invadir o tecido do hospedeiro e escapar da fagocitose pelos macrófagos; formar biofilme em diferentes superfícies, tornando-se mais resistente aos antifúngicos comumente utilizados, como fluconazol e anfotericina B.

E. coli são bactérias Gram-negativas, aeróbias ou anaeróbias facultativas. O seu habitat natural é o lúmen intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. Possui múltiplos flagelos dispostos ao redor da célula e fímbrias ou adesinas que permitem a sua fixação. Muitas produzem exotoxinas. Por serem bactérias Gram-negativas, possuem lipopolissacarídeo (LPS). Esta molécula externa ativa o sistema imunológico de forma desproporcionada. A vasodilatação excessiva, provocada pelas citocinas produzidas nesse processo, pode levar ao choque séptico e morte em casos de septicemia (Murray, 2004).

E. coli é um dos poucos seres vivos capazes de produzir todos os componentes de que necessita a partir de compostos básicos e fontes de energia suficientes. O seu genoma é bastante estudado, tendo quase 5 milhões de pares de bases e vários milhares de

genes codificando mais de 4000 proteínas, enquanto o genoma humano tem 3 bilhões de pares de bases e cerca de 27 mil proteínas (Murray, 2004).

E. coli não é uma bactéria frequentemente encontrada no interior de canais radiculares com polpa necrosada, entretanto, sua endotoxina apresenta a estrutura lipídica básica necessária e responsável pela ação endotóxica do LPS (Yelsilsoy *et al.*, 1995). Devido a isso, endotoxina de *E. coli* é considerada padrão por diversos trabalhos científicos (Horiba *et al.*, 1990; Silva *et al.*, 2002; Tanomaru *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005; Marinho *et al.*, 2012), tendo sido utilizada em pesquisas que buscam avaliar a ação de SQA e MIC sobre o LPS.

Molander *et al.* (1998) isolaram *E. coli* em 8 de 100 canais radiculares com presença de periodontite apical após tratamento endodôntico. Siqueira *et al.* (2001), avaliando a microbiota de dentes com abscessos agudos periapicais de origem endodôntica, isolaram *Escherichia coli* em apenas 3,7% dos casos.

Peciulienė *et al.* (2001), ao analisarem dentes com periodontite apical crônica, observaram que *E. coli* foi isolada em 7,5% dos casos. Montagner (2009) isolou *E. coli* em 2 de 30 canais radiculares de dentes que apresentavam necrose pulpar e abscesso periapical.

2.2 Métodos de identificação e quantificação de microrganismos

Dentre as diversas técnicas para identificação de microrganismos, há os métodos de cultura, moleculares e bioquímicos, entretanto, nenhum deles, individualmente, demonstra ser capaz de isolar e identificar todos os microrganismos presentes no interior de canais radiculares.

O método de cultura necessita de células viáveis para que a identificação seja positiva e, conseqüentemente, a ocorrência de cultura negativa não significa a ausência total de microrganismos (Gomes & Montagner, 2010).

Os métodos moleculares de identificação microbiana baseiam-se na detecção de DNA das espécies. Eles têm sido amplamente utilizados em endodontia para identificação e quantificação de microrganismos no interior de canais radiculares devido à sua sensibilidade, quando comparados aos métodos de cultura. Sua utilização é fundamental

nos casos de microrganismos de difícil cultivo ou mesmo na detecção de vírus. Também são capazes de identificar tanto células viáveis, quanto células não viáveis.

No método de cultura, o isolamento só é possível quando a concentração do microrganismo é suficiente para que este cresça no meio de cultura. No método molecular de PCR simples, alta concentração de microrganismos não é fator fundamental, entretanto, o microrganismo pode não ser identificado caso seu DNA possua grau elevado de fragmentação.

O método molecular, quando comparado ao método de cultura, é mais específico, sensível e rápido. Entretanto, o método de cultura, por ser capaz de diferenciar células viáveis de células não viáveis, torna-se fundamental para avaliação da susceptibilidade microbiana (Gomes & Montagner, 2010).

Sendo assim, as técnicas de identificação molecular permitem uma observação mais completa da microbiota associada às infecções orais (Dahlén & Leonhardt, 2006); seu uso permite uma melhor descrição do ecossistema microbiano associado às infecções endodônticas, uma vez que conseguem detectar, inclusive, espécies fastidiosas e/ou não cultiváveis (Seol *et al.*, 2006; Gomes & Montagner, 2010).

Há diversos métodos moleculares para identificação de microrganismos, sua escolha irá depender do objetivo da investigação, pois eles podem identificar microrganismos de forma quantitativa ou qualitativa. Dentre os métodos existentes, pode-se citar reação em cadeia da enzima polimerase (PCR), nested PCR (nPCR), multiplex PCR, real time PCR, checkerboard para hibridização de DNA-DNA e broad range PCR (Siqueira e Rôças, 2003; Gomes & Montagner, 2010).

O processo da reação em cadeia da polimerase, concebido por Kary Mullis em 1983, vem revolucionando o campo da biologia molecular, por ter a capacidade de amplificar uma cópia de genes em milhões ou bilhões de cópias, possibilitando isolar qualquer gene de um microrganismo (Siqueira & Roças, 2005).

Uma desvantagem do método de PCR consiste no fato de que os microrganismos necessitam ser lesados para que seu material cromossômico seja obtido. Além disso, na ausência de células cultiváveis, não é possível conduzir investigações

adicionais para identificar os fatores de virulência que podem estar associados a uma cepa patogênica em particular (Lee *et al.*, 2004).

Zoletti *et al.* (2006), comparando dois métodos de identificação de *Enterococcus faecalis*, cultura e PCR, asseguram que seus resultados corroboram com os resultados de outros estudos que demonstram a superioridade do método molecular. Os autores afirmaram que a alta prevalência de *E. faecalis* detectada pelo PCR ocorreu devido à habilidade deste método molecular em detectar DNA de células não viáveis. Entretanto, existe a possibilidade de que as células não viáveis sejam atacadas por outras bactérias e fungos, e que oxidação e hidrólise venham a danificar o DNA causando perdas irreversíveis na sequência de informação. Mesmo em pequena amostra de células, o método molecular é mais sensível, exato e fiel que o método convencional. Algumas cepas bacterianas, provenientes de dada espécie cultivável, podem tornar-se não cultiváveis (VBNC - viáveis mas não cultiváveis), desenvolvendo uma estratégia de sobrevivência quando submetidas a condições ambientais adversas, como falta de nutrientes. Nestas condições, o microrganismo escapa da identificação pelo método de cultura, mas continua viável, sendo o método molecular mais indicado para sua identificação.

2.3 Análise microbiológica por microscopia confocal

Diferentes métodos têm sido utilizados para avaliação do conteúdo microbiano presente em infecções pulpares e periapicais, entretanto, cada um destes métodos tem suas vantagens e desvantagens. Por meio de técnicas de amostragem microbiológica, pode-se estimar o número de unidades formadoras de colônias de bactérias cultiváveis e realizar a análise quantitativa da infecção da dentina. No entanto, este método não fornece informações claras quanto à distribuição espacial de bactérias no interior da dentina. Cortes histológicos mostram a distribuição das bactérias em dentina infectada, mas não fornecem informações sobre a viabilidade das bactérias. Ambas as técnicas são muitas vezes utilizadas para determinar a atividade antimicrobiana de materiais dentários e para a investigação clínica (Zapata *et al.*, 2008).

Por meio de microscopia eletrônica de transmissão pode-se obter imagens de bactérias no interior de túbulos dentinários, entretanto, essa técnica demanda tempo e requer múltiplos passos para o preparo dos espécimes (Zapata *et al.*, 2008).

Outra técnica que vem sendo utilizada para avaliação do efeito de SQA e MIC sobre o biofilme endodôntico é a microscopia confocal de varredura a laser (MCVL), a qual foi descoberta por Minsky em 1955 (Minsky, 1988), sendo utilizada pela primeira vez na Odontologia em 1983 (Watson, 1994).

Em relação à microscopia eletrônica de varredura, MCVL tem a vantagem de permitir a observação de biofilme sem necessidade de desidratação, entretanto, as células necessitam ser marcadas com fluorocromos para que sejam observadas. A combinação de corantes utilizada no presente trabalho, SYTO-9 e iodeto de propídio, possibilitou a observação da proporção entre microrganismos viáveis e não viáveis, além de sua conformação espacial na dentina radicular.

Zapata *et al.* (2008), em estudo avaliando a possibilidade de detecção microbiana *in situ* de bactérias viáveis e não viáveis, concluíram que a MCVL é uma técnica efetiva na determinação da viabilidade bacteriana na dentina infectada. Segundo Shen *et al.* (2009), as mensurações quantitativas tridimensionais da viabilidade do biofilme por meio de MCVL constituem-se em um instrumento valioso para análise das dinâmicas de inativação por agentes antimicrobianos.

Sunde *et al.* (2003) afirmam que a MCVL permite reconstrução tridimensional e, por meio da possibilidade de seccionamento óptico, permite a observação e localização exata da distribuição espacial de bactérias. Segundo Costerton *et al.* (1995), a microscopia confocal levou à revisão do conceito inicial de biofilme, o qual era estudado por meio de microscopia óptica e eletrônica. O conceito de biofilme variou de uma distribuição homogênea de células em uma matriz polimérica extracelular uniforme para um modelo baseado em uma significativa heterogeneidade, apresentando uma estrutura com distribuição variável de células, agregados celulares na matriz polimérica extracelular além de espaços vazios ou canais de água, que apresentam ou não continuidade com a fase líquida.

2.4 Endotoxina

Endotoxina bacteriana é um complexo lipopolissacarídico (LPS) presente na membrana externa das bactérias Gram-negativas, sendo liberada durante a duplicação ou morte celular, quando então desencadeia reação inflamatória, febre, citotoxicidade e reabsorção óssea (MacKane & Kadel, 1986). É considerada um dos principais fatores etiológicos envolvidos na patogênese e manutenção da inflamação periapical, adere-se aos tecidos mineralizados da região apical e periapical (osso e cimento) causando reabsorção óssea (Pitts *et al.*, 1982; Yamasaki *et al.*, 1992; Jacinto *et al.*, 2006), estando também relacionada à presença de sinais e sintomas agudos nas patologias endodônticas (Jacinto *et al.*, 2006; Martinho & Gomes, 2008; Gomes *et al.*, 2009a; Martinho *et al.*, 2008, 2010a,b, 2011, 2012; Endo *et al.*, 2012, 2013).

Endotoxinas não causam lesões celulares ou teciduais diretamente, entretanto, estimulam células como macrófagos, neutrófilos e fibroblastos, desencadeando a liberação de um grande número de mediadores químicos inflamatórios bioativos (citocinas), causando uma série de efeitos biológicos que levam à reação inflamatória e reabsorção óssea periapical (Mattison *et al.*, 1987; Yamasaki *et al.*, 1992, Martinho *et al.*, 2012).

Schein & Schilder (1975), buscando quantificar os níveis de endotoxina em dentes que necessitavam de tratamento endodôntico, encontraram diferença estatística significativa em dentes com e sem vitalidade, presença e ausência de sintomas e presença ou não de lesões periapicais radiograficamente visíveis. Maiores níveis de endotoxina estavam presentes em dentes sem vitalidade, com sintomatologia dolorosa e lesões periapicais radiograficamente visíveis. Dentes com polpa necrosada apresentaram concentração mais alta de endotoxina que dentes com polpa vital e dentes com sintomatologia também apresentaram mais endotoxinas que os assintomáticos. Foi observada correlação positiva entre o aumento de endotoxinas e sintomatologia clínica. Dessa forma, os autores demonstraram a importância de endotoxinas liberadas por bactérias Gram-negativas como fator relevante nas doenças pulpares e periapicais.

Dahlén & Bergenholtz (1980), avaliando a microbiota e o nível de endotoxina em 13 dentes com necrose pulpar por meio do teste Lisado do amebócito de *Limulus*

(LAL), observaram sinais clínicos como dor, edema, fístula e sensibilidade à percussão. Observou-se presença de microrganismos em nove dentes e ausência em quatro. Em oito dentes a microbiota era constituída de bactérias Gram-negativas, nos quais o teste LAL foi positivo. O teste LAL foi negativo nas amostras que apresentavam apenas bactérias Gram-positivas e aquelas em que não houve crescimento bacteriano. Concluiu-se que a atividade da endotoxina está relacionada à presença e número de bactérias Gram-negativas viáveis nos canais radiculares e possui relevância biológica para o desenvolvimento da inflamação periapical.

Dwyer & Torabinejad (1981) avaliaram o efeito da inoculação de endotoxina de *E. coli* em dentes de gatos e concluíram que endotoxinas têm função no desenvolvimento e perpetuação de lesões periapicais inflamatórias.

Pitts *et al.* (1982) avaliaram o efeito da endotoxina nos tecidos periapicais de dentes de cão. Os canais radiculares do grupo experimental foram preenchidos com endotoxina de *Salmonella minnesota* e no grupo controle foram preenchidos com solução fisiológica (NaCl 0,9%) (SF) estéril, sendo subdivididos em dentes com ápice perfurado e com ápice não perfurado, realizado acompanhamento radiográfico semanal e análise radiográfica após a quarta (ápice perfurado) e quinta (ápice não perfurado) semanas. Nas análises radiográfica e histológica dos dentes com ápice perfurado e endotoxina, foi observada lesão periapical, maior resposta inflamatória e maior destruição óssea em relação àqueles preenchidas com solução salina. Na análise dos dentes sem ápices perfurados, os grupos experimental e controle foram semelhantes, apresentando pouca ou nenhuma mudança radiográfica e histológica. Concluiu-se que endotoxinas podem ter um papel relevante na inflamação periapical e reabsorção óssea.

Mattison *et al.* (1987) compararam o efeito da endotoxina de *Eikenella corrodens* com a de *Escherichia coli*, as quais possuem estrutura química diferente, na região periapical de 28 terceiros e quartos pré-molares de cão. Após instrumentação, semanalmente, durante 4 semanas, 42 raízes receberam endotoxina de *E. corrodens*, 8 raízes receberam endotoxina de *E. coli* (controle positivo), 6 raízes receberam água apirogênica (controle negativo) e foram seladas com cimento de óxido de zinco e eugenol. A análise radiográfica mostrou que 90,4% dos canais com endotoxina de *E. corrodens* e

75% dos canais com endotoxina de *E. coli* exibiram lesões periapicais. Os resultados da análise histológica das lesões de *E. corrodens* e *E. coli* foram semelhantes, apresentando reabsorção óssea extensa, reabsorção radicular externa e intenso infiltrado inflamatório. No grupo controle negativo foi observado espessamento suave do ligamento periodontal e presença de infiltrado inflamatório leve. Os autores concluíram que a endotoxina de bactérias Gram-negativas é o principal fator para início e perpetuação de inflamação e reabsorção óssea.

Horiba *et al.* (1990) analisaram a distribuição de endotoxina na parede dentinária de canais radiculares infectados. Amostras das paredes radiculares, desde a superfície pulpar do canal até o lado cementário, de 30 dentes humanos recém-extraídos (5 dentes sadios e 25 com canais radiculares infectados) foram preparadas por método abrasivo, a fim de obter pó de dentina de cada espécime, progressivamente, da dentina da superfície pulpar até o cimento. Após medida da quantidade de pó de todos os espécimes, foi acrescentado 1 mL de água destilada apirogênica ao pó. A endotoxina foi extraída com ácido cítrico e quantificada por método turbidimétrico. A quantidade de endotoxina foi significativamente maior nos dentes com canais radiculares infectados em relação aos dentes sadios em todas as camadas. Nos canais infectados, a quantidade de endotoxina foi significativamente maior nas amostras de dentina próximas à superfície pulpar, até 300 µm, em relação às amostras de 301 a 800 µm.

Horiba *et al.* (1991) analisaram *in vivo* 30 dentes com periodontite apical, utilizando o teste Gel Clot para quantificação de endotoxina. Os resultados mostraram que a quantidade de endotoxina foi maior em dentes sintomáticos em relação aos assintomáticos. Em dentes com área radiolúcida e exsudato, a quantidade de endotoxina também foi significativamente maior. Endotoxina foi detectada em 19 dos 20 dentes com exsudato (purulento e seroso). Assim, indicaram correlação positiva entre a quantidade de endotoxina e sinais e sintomas clínicos e presença de área radiolúcida. Também sugeriram que grande quantidade de endotoxina pode estar associada ao aumento da doença periapical.

Horiba *et al.* (1992) investigaram a ativação do sistema complemento pelo LPS purificado de *Porphyromonas endodontalis*, *Veillonella parvula* e *Fusobacterium*

nucleatum isolados de canais radiculares infectados, por meio da quantificação de C3. Os resultados mostraram que quando 1 µg de LPS foi adicionado ao soro humano, o consumo de C3 foi menor que 10% para o LPS de todas as espécies bacterianas. Quando 10 µg de LPS foram adicionados, o consumo de C3 foi aumentado de 15 a 25% para *P. endodontalis* e *F. nucleatum*. Quando 50 µg de cada LPS foram adicionados, o consumo foi maior que 60% para *P. endodontalis* e *V. parvula*. Com 100 µg de LPS, o consumo foi maior que 70% para *P. endodontalis* e *F. nucleatum*. Concluiu-se que a taxa de consumo de C3 aumentou notavelmente quando mais de 10 µg de LPS foi adicionado ao soro humano.

Yamasaki *et al.* (1992) buscaram quantificar endotoxina e identificar bactérias Gram-negativas em lesões periapicais experimentais em ratos. Após exposição dos canais radiculares ao meio oral, quantificou-se endotoxina no tecido periapical do primeiro molar inferior direito e determinou-se o número de colônias de bactérias Gram-negativas na mesma região do primeiro molar inferior esquerdo, em períodos de avaliação de 1, 3, 7, 14, 21, 28, 42, 56 e 70 dias após a exposição pulpar. Os resultados mostraram que a quantidade de endotoxina nos tecidos periapicais aumentou gradualmente do 1º ao 70º dia. A quantidade de bactérias Gram-negativas isoladas dos tecidos periapicais aumentou gradualmente do 1º ao 14º dia (26 a 82%), entretanto, no 21º dia houve diminuição (41%) e do 28º ao 70º dia houve um acréscimo de 60%. Os autores concluíram que a quantidade de endotoxina nos tecidos periapicais aumentou gradualmente com o tempo e que o aumento do número de bactérias não foi proporcional ao aumento da quantidade de endotoxina.

Khabazz *et al.* (2000) observaram a presença de endotoxina em dentes humanos com lesão cariosa sintomática (pulpite reversível) ou não sintomática (pulpite irreversível). Os maiores níveis de endotoxina foram encontrados na superfície de lesões cariosas e em dentes com sintomatologia.

Khabbaz *et al.* (2001) também verificaram maior conteúdo de endotoxina nos tecidos pulpare de dentes sintomáticos, sugerindo uma possível associação dos níveis de endotoxina com a severidade da dor pulpar e com a patogênese da doença pulpar.

Jacinto *et al.* (2005), quantificando endotoxina em canais radiculares com polpa necrosada com e sem sintomatologia clínica, verificaram altos níveis de endotoxina em canais radiculares de dentes sintomáticos, havendo correlação positiva entre a concentração

de endotoxina no canal radicular e a presença de sinais e sintomas endodônticos. Os autores sugeriram que a alta concentração de endotoxina em canais radiculares de dentes com dor espontânea, à palpação e percussão e com exsudato purulento indica que LPS é um fator biológico para o desenvolvimento de inflamação periapical aguda, sendo necessária, durante o tratamento endodôntico, a utilização de substâncias que atuem não somente como agentes antimicrobianos, mas que apresentem capacidade de inativar endotoxinas.

Oliveira *et al.* (2005) verificaram que endotoxina é capaz de se difundir pelos túbulos dentinários em direção ao cimento, atingindo a região externa da raiz após 24 horas.

Rogers *et al.* (2007) demonstraram que injeções orais de LPS derivado de *A. actinomycetemcomitans* podem induzir severa perda óssea alveolar e produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 beta, TNF-alfa e IL-6) em ratos, por até oito semanas. Assim, relataram que LPS pode iniciar a perda óssea inflamatória pela indução da liberação de citocinas inflamatórias do hospedeiro.

Vianna *et al.* (2007) observaram que mesmo com a eliminação de bactérias, o nível de endotoxinas mostra-se alto.

Martinho & Gomes (2008) verificaram que endotoxina está presente em altas concentrações em canais radiculares de dentes sintomáticos e que há uma correlação positiva entre a concentração de endotoxina no canal radicular e a presença de sinais e sintomas.

Gomes *et al.* (2012) compararam os níveis de endotoxina encontrados em dentes com infecção endodôntica primária e secundária, correlacionando-os aos achados clínicos e radiográficos. Além disso, a presença de bactérias Gram-negativas e anaeróbias também foi analisada. Foram coletadas amostras de 15 canais radiculares com infecção primária e 15 com infecção secundária, usando cones de papel. Método de LAL foi utilizado para quantificar endotoxinas e técnica de PCR foi utilizada para detecção de bactérias. Endotoxinas foram detectadas em 100% das amostras de infecção primária (15/15) e secundária (15/15), com valores médios de 7,49 EU/mL e 3,96 EU/mL, respectivamente. O valor da mediana de endotoxinas encontradas na presença de sintomas clínicos foi significativamente mais elevado em dentes com infecção primária, quando

comparado àqueles com infecção secundária. Correlação positiva foi observada entre o conteúdo de endotoxina e maior tamanho da área radiolúcida (> 3 mm). *Prevotella nigrescens* (10/15, 4/15), *Fusobacterium nucleatum* (5/15, 1/15), *Treponema denticola* (3/15, 1/15) e *Treponema socranskii* (5/15, 1/15) foram isolados em dentes com infecção primária e secundária, respectivamente. *P. endodontalis* estava presente apenas em dentes com infecção primária (5/15). Concluiu-se que dentes com infecção primária demonstraram níveis mais elevados de endotoxina e comunidade bacteriana Gram-negativa mais complexa em relação aos dentes com infecção secundária. Além disso, os níveis de endotoxina foram relacionados à gravidade da destruição óssea em tecidos periapicais, bem como ao desenvolvimento de características clínicas em dentes com infecção primária.

Endo *et al.* (2012) quantificaram *in vivo* bactérias cultiváveis e níveis de endotoxina em canais radiculares com insucesso do tratamento endodôntico, correlacionando-os às características clínicas de pacientes. Amostras microbiológicas e de endotoxinas foram coletadas de 15 canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico e lesão periapical, para avaliação por meio das técnicas de cultura, PCR e LAL. *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia* e *Tannerella forsythia* foram as espécies mais frequentemente detectadas. Endotoxina foi recuperada em 100% das amostras. Níveis mais elevados de endotoxina foram relacionados à maior dimensão da área radiolúcida (> 5 mm). Concluiu-se que os níveis de endotoxina encontrados em canais radiculares infectados estavam relacionadas à maior área radiolúcida na região periapical.

2.5 Métodos de quantificação de endotoxina

Bactérias Gram-negativas possuem, na membrana externa, moléculas de lipopolissacarídeos (LPS), também denominadas endotoxina, responsáveis por sua organização, estabilidade (Vaara & Nikaido, 1984), reprodução, proteção contra agressões externas e diminuição da permeabilidade da membrana, o que pode ser fator determinante de sua maior resistência a determinados antibióticos (Rietschel & Brade, 1992).

O LPS é constituído por lípide A, core oligossacarídeo e antígeno O (Dixon & Darveau, 2005). Antígeno O é a cadeia mais longa e variável da molécula entre as espécies

bacterianas, sendo capaz de induzir resposta imunológica específica, com a produção de anticorpos específicos (Rietschel *et al.*, 1991).

O core oligossacarídeo tem constituição pouco variável, porém, também pode induzir a formação de anticorpos específicos. É constituído por polissacarídeos e uma região denominada KDO (2-keto-3-deoxioctano), o qual se liga ao lípide A, podendo interferir em sua bioatividade (Rietschel *et al.*, 1991).

Lípide A, por sua vez, é constituído por duas moléculas de açúcares (glicosamina), modificadas por fosfato, e um número variável de cadeias de ácidos graxos, com 14 átomos de carbono, sendo a porção menos variável do LPS dentre as diferentes espécies bacterianas (Rietschel *et al.*, 1991).

Lípide A exerce grande parte das atividades endotóxicas, sendo referido como a porção efetivamente tóxica da molécula. Menor ou maior proporção de lípide A pode produzir efeitos distintos e diversos na modulação da resposta imune (Dixon & Darveau, 2005). Mesmo em baixas concentrações, podem causar respostas imunológicas específicas, estimulando a resposta inata do sistema imunológico do hospedeiro (Rietschel *et al.*, 1991; Hong *et al.*, 2004).

Diversos estudos têm buscado elucidar o papel do LPS na manutenção da resposta inflamatória nas infecções endodônticas. Hong *et al.* (2004) observaram que LPS pode gerar danos teciduais e destruição óssea. Mattison *et al.* (1987) observaram que endotoxina de *E. coli* inoculada em canais radiculares de animais promoveu inflamação e reabsorção óssea. Outros trabalhos observaram a presença de LPS em 100% dos canais radiculares de dentes com infecção endodôntica primária e lesão periapical (Jacinto *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2007; Martinho & Gomes, 2008; Martinho *et al.*, 2010a). Barthel *et al.* (1993) observaram ainda que endotoxina se adere aos tecidos mineralizados.

Devido à sua importância em endodontia, diversos estudos têm buscado SQA e MIC que sejam capazes de inativar endotoxinas presentes nos sistema de canais radiculares, para tanto, um dos métodos utilizados é a quantificação de endotoxinas, prévia e posteriormente à utilização dessas substâncias.

Existem diversos métodos para detecção e quantificação de endotoxina que utilizam a reação de LAL. São eles os testes turbidimétricos, testes colorimétricos e Gel

clot (Levin & Bang, 1968; Young, 1972; Tsuji *et al.*, 1984; Jacinto *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2007; Martinho & Gomes, 2008; Martinho *et al.*, 2010a,b).

O lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL), método de quantificação de endotoxinas utilizado no presente estudo, baseia-se na reação entre endotoxina e um componente protéico do amebócito extraído do crustáceo *Limulus polyphemus*. Na presença de endotoxinas, ocorre a cascata de coagulação pela ativação da enzima serina-protease (Hurley, 1995). Até o presente momento, este ainda é o teste mais sensível e específico disponível para esta finalidade.

2.6 Ação do preparo químico-mecânico e medicação intracanal sobre microrganismos e endotoxinas

O tratamento endodôntico consiste em três etapas fundamentais: acesso à cavidade pulpar ou abertura coronária, PQM e obturação do sistema de canais radiculares, seguidos da restauração do elemento dentário. A abertura coronária tem como objetivo fornecer um acesso direto e amplo à região apical e não meramente ao orifício de entrada dos canais radiculares (Clements & Gilboe, 1991). O PQM promove modelagem e limpeza do canal radicular. A modelagem é obtida pela ação mecânica dos instrumentos, manuais e/ou rotatórios, por meio do desgaste das paredes de dentina.

Concomitante à ação dos instrumentos, a ação de SQA é de extrema importância, visto que a anatomia dos canais radiculares é complexa, contendo diversas ramificações. Se essas ramificações não forem atingidas pelos instrumentos, podem restar substratos que propiciarão a manutenção ou indução da infecção, sendo, portanto, fundamental a utilização de SQA para que tais áreas sejam alcançadas (Paiva & Antoniazzi, 1991).

Assim, as SQA têm sido empregadas durante o PQM dos canais radiculares com a finalidade de promover dissolução de tecidos vivos ou necrosados, eliminar ou reduzir microrganismos por meio de suas propriedades antimicrobianas, reduzir os níveis de endotoxina, promover lubrificação durante o corte dos instrumentos, promover remoção de *smear layer* e propiciar menor ação citotóxica aos tecidos periapicais. Para tanto, devem

possuir atividade antimicrobiana, ação de solvência dos tecidos, tensão superficial, poder de limpeza e tolerância tecidual (Paiva & Antoniazzi, 1991).

Dentre as SQA mais freqüentemente utilizadas no tratamento endodôntico, destacam-se NaOCl e CL.

NaOCl foi introduzido na Endodontia por Walker (1936) e desde então é amplamente utilizado em diversas concentrações. Dentre as propriedades do NaOCl, destacam-se sua ação antimicrobiana (Siqueira *et al.*, 1998; Mc Donnel & Russel, 1999; Gomes *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2005; Ferraz *et al.*, 2007), capacidade de dissolução tecidual (Beltz *et al.*, 2003; Naenni *et al.*, 2004; Okino *et al.*, 2004) e propriedades desodorizantes (Spangberg, 1982).

Sua efetividade antimicrobiana advém da combinação do cloro com proteínas da membrana celular, formando compostos que interferem no metabolismo da célula (Boucher, 1979). Sua capacidade de dissolução tecidual é atribuída ao hidróxido de sódio oriundo da reação do NaOCl com água (Abou-Rass & Piccinino, 1982; Baumgatner & Cuenin, 1992). Esta depende da quantidade de matéria orgânica presente, da frequência e intensidade da agitação mecânica (fluxo do líquido) e da superfície de contato disponível do tecido (Moorer & Wesselink, 1982).

Moorer & Wesselink (1982) salientam que a ação solvente sobre os tecidos proveniente do emprego do NaOCl é devida ao ácido hipocloroso (HOCl) não dissociado e aos íons hipoclorito (OCl⁻), os quais atuam sobre proteínas, realizando hidrólise e cloraminação.

Naenni *et al.* (2004) avaliaram a capacidade de NaOCl 1%, CL 10%, peróxido de hidrogênio 3% e 30%, ácido acético 10% e ácido cítrico 10% em dissolver tecido necrosado obtido do palato de porcos. As porções de tecido necrosado foram pesadas e os tempos pré-estabelecidos em 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Observou-se que o NaOCl foi a solução que, independente do tempo, proporcionou maior dissolução de matéria orgânica.

Entretanto, o NaOCl é tóxico para os tecidos periapicais (Buck *et al.*, 2001; Tanomaru *et al.*, 2002; Gernhardt *et al.*, 2004), principalmente em concentrações mais altas e não tem demonstrado ação efetiva sobre endotoxinas (Oliveira *et al.*, 2007; Martinho & Gomes, 2008; Martinho *et al.*, 2010a,b).

Outra substância que tem sido utilizada no PQM dos canais radiculares é a CL, a qual é uma bis-biguanida catiônica com baixa citotoxicidade em mamíferos (Denton, 1991). CL atua aderindo-se à parede celular de microrganismos, alterando a permeabilidade da membrana celular, o que resulta na perda de componentes intracelulares e no desequilíbrio osmótico da célula. Em baixas concentrações, possui efeito bacteriostático e em concentrações mais elevadas exerce poder bactericida pela precipitação ou coagulação do conteúdo citoplasmático, resultando em morte celular (Greenstein *et al.*, 1985; Fardal & Turnbull, 1986). Sua atividade antimicrobiana ideal ocorre em pH 5,5 a 7,0 (Denton, 1991) e seu amplo espectro antimicrobiano compreende a eliminação tanto de microrganismos Gram-positivos quanto Gram-negativos (Delany *et al.*, 1982; Jeansone & White, 1994; Ferraz *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2005, 2006; Sena *et al.*, 2006; Ferraz *et al.*, 2007; Souza-Filho *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009).

Assim, CL, nas formulações gel ou solução, tem sido utilizada como SQA devido ao seu amplo espectro de ação antimicrobiana (Hennessey, 1973; Delany *et al.*, 1982; Greenstein *et al.*, 1986; Fardal & Turnbull, 1986; Cervone *et al.*, 1990; Vahdaty *et al.*, 1993; Siqueira & Uzeda, 1997; Ferraz *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2001; Ferguson *et al.*, 2002; Onçag *et al.*, 2003; Zamany *et al.*, 2003, Vianna *et al.*, 2004; Dametto *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2005; Sena *et al.*, 2006; Ferraz *et al.*, 2007; Manzur *et al.*, 2007), substantividade (Basrani *et al.*, 2002; Dametto *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2009b; Baca *et al.*, 2012), difusão pelos túbulos dentinários (Gomes *et al.*, 2009b) e baixa citotoxicidade (Yesilsoy *et al.*, 1995; Tanomaru *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2010; Trevino *et al.*, 2011). Possui ainda odor e sabor toleráveis e não provoca manchamento de tecidos (Denton, 1991).

Além disso, CL não afeta a matriz orgânica de colágeno na dentina (Moreira *et al.*, 2009), sendo inibidora de metaloproteinases, o que resulta em menor degradação da camada híbrida e das fibrilas colágenas da camada sub-híbrida (Gendron *et al.*, 1999). Metaloproteinases são capazes de promover degradação dos componentes da matriz extracelular e conseqüente exposição das fibras colágenas durante procedimentos de adesão, tornando-as vulneráveis à hidrólise, o que causa comprometimento da adesão de materiais à parede dos canais radiculares (De Munk, 2005). Assim, a CL tem sido utilizada também por propiciar o aumento dessa adesão.

Também tem sido demonstrado que a aplicação de CL antes do condicionamento ácido não propicia efeitos adversos sobre as restaurações adesivas imediatas na dentina coronária (Castro *et al.*, 2003), na dentina da câmara pulpar (Santos *et al.*, 2006) e no esmalte (el-Housseiny & Jamjoum, 2000), ou sobre cimento de ionômero de vidro (Cunningham & Meiers, 1997).

Castro *et al.* (2003), avaliando a ação da CL sobre o substrato dentinário ao longo do tempo, observaram os benefícios causados pela sua aplicação, como menor degradação da camada híbrida, e, conseqüentemente, maior longevidade da restauração.

Erdemir *et al.* (2004) relataram que a irrigação com solução de clorexidina (CLL) aumentou significativamente a resistência de união à dentina radicular. Estes autores sugeriram que a adsorção da CL pela dentina pode favorecer a infiltração da resina nos túbulos dentinários, o que supostamente explica os valores altos de resistência de união obtidos.

CL pode ser utilizada tanto na formulação líquida como em gel. Ferraz *et al.* (2001) foram pioneiros em propor a utilização de clorexidina gel (CLG) no preparo dos canais radiculares. Anteriormente a estes autores, a formulação gel tinha sido utilizada somente como MIC (Siqueira & Uzeda, 1997; Brum, 2013).

CLG consiste em uma base gel e gluconato de clorexidina (pH ótimo entre 5,5 a 7). O gel de natrosol (natrosol 1%, hidroxietilcelulose, pH 6-9) é um polímero de carbono biocompatível e solúvel em água, podendo ser removido dos canais radiculares por meio de irrigação com água destilada (Vivacqua-Gomes *et al.*, 2002) ou SF.

A formulação gel possui ação reológica, ou seja, devido à sua viscosidade, mantém em suspensão os resíduos oriundos da instrumentação, reduzindo a formação de *smear layer*. Essa propriedade também facilita a instrumentação, pois ao lubrificar as paredes do canal, reduz o atrito entre o instrumento e a parede, diminuindo a fratura de instrumentos. A formulação gel mantém o princípio ativo do digluconato de clorexidina em contato com os microrganismos por mais tempo, inibindo o crescimento microbiano (Vianna *et al.*, 2004).

Entretanto, CL não apresenta capacidade de dissolver tecidos orgânicos (Okino *et al.*, 2004; Mohammadi & Abbott, 2009) e tem pouca ou nenhuma ação sobre

endotoxinas (Oliveira *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2009, 2012; Endo, 2011; Endo *et al.*, 2012, 2013), mas sua ação permanece ativa mesmo na presença de sangue (Denton, 1991) e matéria orgânica (Gelinas & Goulet, 1983).

Devido ao amplo espectro de ação antimicrobiana e à incapacidade de dissolução de tecidos orgânicos pela CL, foi proposto um protocolo de irrigação em que NaOCl seria utilizado na instrumentação, seguido de EDTA, e CL seria utilizada como irrigante final (Zehnder *et al.* 2006).

Portanto, a associação de NaOCl e CL foi preconizada, principalmente, pela atividade antimicrobiana prolongada (substantividade) da CL (Vianna & Gomes, 2009) e capacidade de dissolução de tecidos e efetividade antimicrobiana do NaOCl.

Kuruvilla & Kamath (1998) observaram que o efeito antimicrobiano da associação de NaOCl 2,5% e CL 0,2% foi maior quando comparado à utilização isolada dessas substâncias, resultado também observado por Zamany *et al.* (2003) e Flach (2011).

Contudo, a associação de NaOCl à CL pode induzir à formação de um precipitado laranja-castanho, resultando em *smear layer* química recobrando os túbulos dentinários, o que pode interferir na adesão ou justaposição do material obturador (Vivacqua-Gomes *et al.*, 2001; Prado *et al.*, 2012). Além disso, este precipitado pode promover mudança na coloração dos dentes (Basrani *et al.*, 2007; Bui *et al.*, 2008; Akisue *et al.*, 2010) e possui capacidade citotóxica (Burkhardt-Holm *et al.*, 1999). Prado *et al.* (2013) recomendam irrigação abundante com água destilada para remoção de todo NaOCl do interior dos canais, de maneira que a CL possa ser utilizada, seja como irrigante final ou MIC.

Diferentes trabalhos têm avaliado a associação de NaOCl à irrigação final com CLL ou mesmo comparado a utilização dessas substâncias isoladamente quanto à sua efetividade antimicrobiana.

Vahdaty *et al.* (1993) avaliaram *in vitro* o efeito desinfetante da CL 0,2% e 2%, NaOCl 0,2% e 2%, e SF em túbulos dentinários. Raízes de incisivos bovinos foram preparadas em formato cilíndrico, esterilizadas e infectadas com *E. faecalis*. Os canais radiculares foram irrigados e amostras de dentina foram removidas nas profundidades de 100, 100-300 e 300-500 μm , a fim de verificar a presença e a quantidade de

microrganismos resistentes. CL e NaOCl foram igualmente eficientes como agentes antimicrobianos contra *E. faecalis* em concentrações similares até uma profundidade de 100 µm no interior dos túbulos dentinários.

Kuruvilla & Kamath (1998) compararam a efetividade antimicrobiana do NaOCl 2,5% e CLL 0,2%, associados ou não, no PQM. Os autores concluíram que a associação de NaOCl 2,5% e CL 0,2% apresentou maior efetividade antimicrobiana que o emprego isolado da cada solução, sendo o resultado estatisticamente diferente apenas para o NaOCl isolado.

Leonardo *et al.* (1999) analisaram *in vivo* a atividade antimicrobiana e residual da CL 2% como SQA, utilizando 22 dentes com necrose pulpar e lesões periapicais visíveis radiograficamente. Após abertura coronária, foi realizada a primeira coleta com cone de papel estéril. Os canais foram instrumentados utilizando CLL 2% e a cavidade selada com cimento de óxido de zinco e eugenol. Após 48 horas, foi realizada segunda coleta. Houve redução de 100% de *Streptococcus mutans* e 77,78% de microrganismos anaeróbios. Os autores observaram que CL previne a atividade microbiana com até 48 horas de efeitos residuais, sugerindo um possível efeito sinérgico com a MIC sobre microrganismos em áreas inacessíveis à instrumentação ou ainda em possíveis reinfecções ou infecções secundárias após a instrumentação, especialmente nos túbulos dentinários.

Ferraz *et al.* (2001) avaliaram a atividade antimicrobiana e a limpeza dos túbulos dentinários promovidas pela CLG 2% em natrosol, NaOCl 5,25% e CLL 2%, como SQA. Setenta dentes humanos foram contaminados com *E. faecalis* por 7 dias e a atividade antimicrobiana foi avaliada pela turbidez de tubos contendo meio BHI. A limpeza dos túbulos dentinários foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que CLG 2% teve maior número de tubos negativos, sem diferença estatística entre as soluções testadas. CLG 2% produziu melhor limpeza da superfície do canal radicular, com quase todos os túbulos dentinários abertos e as demais soluções testadas apresentaram *smear layer* recobrando a abertura dos túbulos dentinários. Assim, sugeriu-se que CLG 2% possui potencial para ser utilizada como SQA durante o PQM.

Ferguson *et al.* (2002) observaram que NaOCl 5,25% e CL foram efetivos contra *C. albicans*, relatando concentração inibitória mínima de <10µg/mL e <0.63µg/ mL, respectivamente.

Weber *et al.* (2003) avaliaram *in vitro* o efeito da ativação ultra-sônica passiva do NaOCl 5,25% e CL 2% sobre sua atividade antimicrobiana residual. Noventa e quatro dentes humanos extraídos foram instrumentados e irrigados com NaOCl 5,25% e CL 2%, recebendo ou não ativação ultra-sônica por 1 minuto. O conteúdo dos canais radiculares foi transferido para placas inoculadas com *Streptococcus sanguinis* e os halos de inibição de crescimento foram analisados. Os autores verificaram que o efeito residual da CL é superior ao do NaOCl com ou sem ativação final com ultra-som, podendo chegar até 168 horas.

Menezes *et al.* (2004a) avaliaram a efetividade das SQA NaOCl 2,5% e CL 2% na eliminação de microrganismos do canal radicular. Dentes humanos foram contaminados com *C. albicans* e *E. faecalis* por 7 dias. Foram realizadas coletas de amostras microbiológicas antes e após o PQM. Ambas as SQA foram efetivas na eliminação de *C. albicans* após o PQM, sem diferença estatística significativa. Entretanto, na eliminação de *E. faecalis*, a CL 2% foi estatisticamente mais efetiva que o NaOCl.

Silva *et al.* (2004) avaliaram histopatologicamente o efeito do PQM realizado com diferentes SQA sobre LPS inoculado em dentes de cães. As SQA utilizadas foram solução de NaOCl 1%, 2,5% e 5%, CLL 2% e SF. Após 60 dias de avaliação, observou-se que todos os grupos demonstraram alterações moderadas em dentina e cimento, presença de reabsorções ósseas e espessura do ligamento periodontal aumentada, entretanto, sem diferença estatística entre eles. O infiltrado inflamatório foi estatisticamente menos intenso nos canais radiculares irrigados com NaOCl 5% e CLL 2%. Contudo, nenhuma das SQA conseguiu inativar completamente os efeitos deletérios do LPS. Os autores concluíram que PQM com diferentes SQA não inativa completamente endotoxina.

Dametto *et al.* (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana da CLG 2%, CLL 2% e NaOCl 5,25% sobre *Enterococcus faecalis*. Oitenta raízes humanas foram contaminadas com *E. faecalis* por 7 dias e três coletas dos canais radiculares foram realizadas: antes da instrumentação, imediatamente após a instrumentação e 7 dias após a instrumentação. CLG 2% e CLL 2% reduziram significativamente a quantidade de

microrganismos imediatamente e após 7 dias da instrumentação. NaOCl 5,25% também reduziu a quantidade de *E. faecalis* logo após a instrumentação, entretanto, após 7 dias houve aumento do número de microrganismos.

Berber (2005) testou *in vitro* a utilização de SQA no preparo mecânico (CLG 2%, CLL 2%, NaOCl 5,25%, 2,5% e 0,5% e SF) e técnicas de instrumentação (híbrida; cérvico-apical - FOP-UNICAMP; instrumentação rotatória com HERO 642) na redução de *E. faecalis* no canal radicular e nos túbulos dentinários. Para tanto, 270 raízes de pré-molares inferiores foram autoclavadas e contaminadas por 21 dias com *E. faecalis*. Em seguida, foram divididas em 18 grupos nos quais as técnicas de instrumentação foram testadas variando as SQA. Amostras bacteriológicas do canal radicular foram coletadas antes e imediatamente após o PQM, as quais foram cultivadas a fim de determinar as unidades formadoras de colônia. Após instrumentação, as raízes foram seccionadas em 3 blocos: apical, médio e cervical. Amostras de dentina foram removidas sequencialmente com brocas tronco-cônicas e as raspas foram coletadas em tubos com BHI e plaqueadas em BHI ágar-sangue. Na luz do canal radicular, todas as substâncias, inclusive SF, quando associadas à instrumentação mecânica, promoveram redução de quase 100% nas coletas microbiológicas, imediatamente após o PQM. Nas coletas resultantes das raspas de dentina, em todos os terços, técnicas e profundidades, NaOCl 5,25% e CLG 2% obtiveram os melhores resultados na redução bacteriana nos túbulos dentinários, seguidos de NaOCl 2,5%, CLL 2% e NaOCl 0,5%. Concluiu-se que, NaOCl 5,25% e CLG 2%, associados às técnicas cérvico-apical da FOP-UNICAMP e HERO, foram mais efetivos na eliminação de *E. faecalis* nos túbulos dentinários e canal radicular.

Berber *et al.* (2006) avaliaram a efetividade do NaOCl 0,5%, 2,5% e 5,25% como SQA durante a técnica de instrumentação manual e rotatória em 180 dentes humanos previamente contaminados durante 21 dias com *E. faecalis*. Amostras foram coletadas antes e após a instrumentação. Antes do preparo, utilizou-se a técnica do cone de papel para coleta. Após, os dentes foram seccionados em três partes e as raspas de dentina foram removidas com brocas para avaliação dos terços. Na técnica da coleta utilizando-se cone de papel, todas as soluções testadas foram efetivas na redução de *E. faecalis*, sem diferença estatística entre elas. Em todas as profundidades e terços dos canais radiculares avaliados e

para todas as técnicas utilizadas, NaOCl 5,25% mostrou-se mais efetivo. As técnicas de instrumentação testadas tiveram o mesmo desempenho. Observou-se que, especialmente em altas concentrações, NaOCl foi capaz de descontaminar os túbulos dentinários, independente da técnica de instrumentação utilizada.

Vianna *et al.* (2006a) avaliaram *in vivo* a redução microbiana após PQM de canais radiculares com necrose pulpar. Trinta e dois dentes unirradiculares foram divididos em dois grupos, utilizando NaOCl 2,5% ou CLG 2%. Foram realizadas coletas antes e após a instrumentação para posterior identificação de microrganismos pelas técnicas molecular e de cultura. NaOCl foi capaz de reduzir 75% e a CL 50% do conteúdo microbiano pela cultura. Pela técnica molecular, a redução foi de 99% com o NaOCl e 96% com a CL. Os autores concluíram que o NaOCl não tem apenas capacidade de eliminar os microrganismos, mas também de remover células do canal radicular.

Martinho & Gomes (2008) demonstraram *in vivo* que o PQM, utilizando NaOCl 2,5% como SQA e instrumentação com limas manuais, promoveu redução de 59,99% nos níveis de endotoxina presentes nos canais radiculares.

Gomes *et al.* (2009a) observaram que NaOCl 2,5% e CLG 2% não foram efetivos na eliminação de endotoxina em canais radiculares com infecção primária. Antes do PQM, o valor médio de LPS foi de 272 EU/mL e 152,46 EU/mL, sendo reduzido para 86 EU/mL e 85 EU/mL para NaOCl 2,5% e CLG 2%, respectivamente. Dessa forma, maior eliminação de endotoxina foi observada quando empregado NaOCl 2,5%.

Martinho *et al.* (2010a) avaliaram *in vivo* a efetividade do PQM com NaOCl 2,5% associado ao EDTA 17% e instrumento rotatório de níquel-titânio em remover endotoxina de canais com infecção primária e periodontite apical. Os autores observaram que endotoxinas estavam presentes em 100% dos canais radiculares investigados (19/19) antes (S1) e após o PQM (S2). O conteúdo de endotoxina foi significativamente reduzido em S2 (98,06%) em comparação com S1, concluindo que o PQM com NaOCl 2,5%, EDTA 17% e instrumento rotatório de níquel-titânio foi eficaz em reduzir a carga de endotoxina de canais com infecção primária e periodontite apical.

Perochena *et al.* (2011) avaliaram o efeito de NaOCl (1%, 2,5% e 5%) e CL 2% sobre biofilme dental formado *in situ*, considerando diferentes tempos de exposição à SQA

(5, 15 e 30 min), volumes de NaOCl e CL 2% (500µl e 1mL), espessura do biofilme e área de limpeza, segundo análise do biofilme em microscópio confocal de varredura laser com corante laranja de acridina. Foram encontrados altos valores de dissolução do biofilme e dentina limpa após utilização do NaOCl 5% durante 5 e 15 minutos e com todos os grupos de NaOCl durante 30 minutos. CL 2% não dissolveu biofilme e nem atuou na limpeza dentinária quando comparada ao NaOCl.

Endo (2011) avaliou a efetividade do PQM na redução de endotoxinas de 15 dentes com insucesso da terapia endodôntica. As amostras foram coletadas antes (C1) e após o PQM (C2) utilizando limas manuais e CLG 2%. Em C1, endotoxina foi detectada em 100% das amostras (3,96 EU/mL). Houve redução de 60,6% do conteúdo de endotoxina após o PQM. Concluiu-se que o PQM com CLG 2% seguido de EDTA 17% foi eficiente na redução de microrganismos e endotoxinas dos canais radiculares, mas não foi capaz de eliminar LPS.

Endo *et al.* (2012) observaram que o PQM com CLG 2% foi mais efetivo na redução de bactérias (99,61%) que endotoxinas (60,6%).

Marinho *et al.* (2012) verificaram que a redução dos níveis de endotoxina dos canais radiculares pode ser obtida pela ampliação apical, no entanto, o PQM do canal radicular foi capaz de reduzir, mas não de eliminar endotoxina.

Neelakantan *et al.* (2013), avaliando a efetividade de diferentes SQA sobre biofilme de *E. faecalis*, observaram que NaOCl 3% apresentou atividade antibacteriana superior à CL.

EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) tem sido utilizado na terapêutica endodôntica desde 1957, quando Ostby o indicou para a instrumentação de canais atrésicos. A solução apresenta ação quelante (Heling *et al.*, 1965; Seidberg & Schelder, 1974; Kennedy *et al.*, 1986; Sen *et al.*, 1995; Kuga *et al.*, 1999; Yamashita *et al.*, 2003), biocompatibilidade aos tecidos periapicais (Ostby, 1957; Segura *et al.*, 1997) e capacidade de limpeza (Baker *et al.*, 1975; McComb & Smith, 1975; McComb *et al.*, 1976; Brancini *et al.*, 1983; Goldberg *et al.*, 1986; Çalt & Serper, 2000).

Associação de EDTA 17% ao NaOCl (McGurkin-Smith *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2007; Ozdemir *et al.*, 2010), tem se mostrado eficaz, visto que NaOCl isolado não é

capaz de remover matéria inorgânica, papel que o EDTA desempenha com êxito, enquanto NaOCl remove matéria orgânica, aumentando assim a capacidade de limpeza do canal radicular, principalmente quanto à remoção de debris e *smear layer*. Além disso, associação de EDTA aos protocolos de PQM com NaOCl tem demonstrado efetividade na redução do conteúdo microbiano e de endotoxinas dos canais radiculares infectados *in vivo* (Ozdemir *et al.*, 2007; Martinho *et al.*, 2010a,b).

A exposição da parede dentinária com NaOCl isolado ou associado ao EDTA promove desorganização morfológica da matriz orgânica dentinária com perda de estrutura na área próxima ao canal radicular, isso ocorre devido à desnaturação protéica que essa substância gera no colágeno dentinário.

CL seguida de EDTA não promove alteração morfológica na estrutura dentinária quando visualizada por meio de microscopia de polarização, assim, essa associação não interfere na qualidade do substrato dentinário e não prejudica a adaptação do cimento obturador à dentina radicular (Moreira *et al.*, 2009). Além disso, irrigação com EDTA permite maior remoção de *smear layer* quando CL é utilizada no PQM (Menezes *et al.*, 2002).

Beltz *et al.* (2003) analisaram NaOCl nas concentrações de 1,3%, 2,6% e 5,25% e EDTA 17% frente à capacidade de dissolução de tecido pulpar bovino e dentina. Os resultados demonstraram que, independente da concentração, NaOCl removeu os componentes orgânicos do tecido pulpar e dentina, efetivamente. EDTA foi capaz de solubilizar os componentes inorgânicos da dentina.

Menezes *et al.* (2003) avaliaram, por meio de microscopia eletrônica de varredura, a capacidade de limpeza e remoção de *smear layer* e debris das paredes de canais radiculares preparados e irrigados com NaOCl 2,5%, CL 2% e SF. Observou-se que a utilização de EDTA diminuiu significativamente *smear layer* para todas as substâncias avaliadas em todos os terços radiculares. Quando EDTA não foi utilizado, somente no grupo NaOCl 2,5% verificou-se quantidade significativamente maior de *smear layer*. Exceto para CL 2%, o uso de EDTA diminuiu significativamente a quantidade de debris. Concluiu-se que após PQM, faz-se necessário a utilização de EDTA, a fim de promover melhor limpeza das paredes dos canais radiculares.

Mônika & Fröner (2006) observaram que a associação de NaOCl 1% e EDTAC 17% (EDTA acrescido de Cetavlon) removeu completamente *smear layer* das paredes dentinárias, enquanto NaOCl 1% e CLG 2% não foram eficientes.

Brito *et al.* (2009), comparando três diferentes técnicas de irrigação (agulhas NaviTips, sistema EndoActivator, sistema EndoVac), associados ao NaOCl e EDTA, não observaram diferença entre as técnicas testadas.

Prado *et al.* (2013) avaliaram, por meio de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de dispersão de elétrons, os protocolos de irrigação, considerando a formação de *smear layer* química. Nos grupos onde CLG foi utilizada isoladamente ou em associação com EDTA, ácido cítrico, ácido fosfórico e CLL, não foi observada formação de *smear layer* química. Os autores sugerem que, nos casos em que se deseja associar hipoclorito e CL, o protocolo utilizando ácido fosfórico é mais viável, pois não demonstrou formação de *smear layer* química.

A utilização de MIC tem por finalidade, principalmente, reduzir ou eliminar o conteúdo microbiano e endotóxico resistente ao PQM. Entretanto, nenhuma MIC demonstra capacidade de eliminar microrganismos patogênicos presentes no sistema de canais radiculares, principalmente nos casos de difícil resolução, como periodontite apical persistente e *flare-up* (Bystrom *et al.*, 1985; Ørstavik & Haapasalo, 1990; Chong & Pitt Ford, 1992; Lopes & Siqueira, 2004). Recomenda-se a utilização de MIC em casos específicos como ápice aberto, exsudato persistente, sintomatologia periapical (dor à palpação/percussão), além de tempo insuficiente para finalização do procedimento e fadiga do paciente ou do cirurgião-dentista durante o procedimento (Gomes *et al.*, 2009).

HC tem sido amplamente utilizado como MIC devido às suas propriedades físicas, biológicas e antimicrobianas (Byström *et al.*, 1985; Valera *et al.*, 2010) que derivam da sua dissociação em íons cálcio e íons hidroxila (Spangberg, 1994). Estudos *in vivo* indicam que MIC à base de HC leva à redução ou eliminação dos microrganismos presentes nos canais (Byström *et al.*, 1985; Ørstavik *et al.*, 1991; Sjögren *et al.*, 1991; Roças & Siqueira, 2011). Porém, *in vitro*, HC demonstra menor eficácia (DiFiore, 1983; Safavi *et al.*, 1990; Estrela *et al.*, 1999; Haapasalo *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2002; 2003a,b, 2006b, 2009).

Assim, a utilização de medicação alternativa como a CL, seria uma opção de tratamento, pois esta possui atividade antimicrobiana frente a microrganismos resistentes como *Enterococcus* (Siqueira & Uzeda, 1996; Síren *et al.*, 1997; Molander *et al.*, 1998; Waltimo *et al.*, 1997, 1999; Haapasalo *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2004; Dametto *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2006b; Vianna *et al.*, 2008).

A atividade antimicrobiana da CL deve-se à sua natureza catiônica que promove aderência ao composto aniônico da superfície microbiana, capaz de alterar a integridade de sua membrana plasmática, modificando sua permeabilidade, promovendo a precipitação de proteínas citoplasmáticas e alterando o balanço osmótico, além de modificar o metabolismo, crescimento e divisão da célula (Ferraz *et al.*, 2001).

A associação de CLG 2% ao HC tem por finalidade combinar as propriedades antimicrobianas apresentadas por cada uma destas substâncias. HC induz a formação de tecido duro, promove dissolução de tecido orgânico e neutralização de endotoxina e tem a capacidade de preencher o canal radicular, prevenindo sua recontaminação (Safavi & Nichols, 1994; Gomes *et al.*, 2002). Entretanto, HC não é igualmente eficaz contra todos os microrganismos encontrados no canal radicular (Gomes *et al.*, 2002). A adição da CLG 2% ao HC poderia aumentar a atividade antimicrobiana e promover maior substantividade, fazendo desta associação uma medicação mais eficiente contra microrganismos resistentes como *E. faecalis* e *C. albicans*, mesmo após sua remoção. No preparo desta medicação, preconiza-se a proporção de 1:1 entre HC e CLG 2%, a fim de se obter uma pasta de fácil inserção no canal radicular e que apresente igual concentração de ambas as substâncias (Bueno, 2010).

Quanto à ação antimicrobiana, a associação de CLG 2% ao HC tem apresentado resultados promissores. Seu desempenho foi similar ao da CLG 2% e superior ao apresentado pela utilização isolada do HC. Os benefícios desta associação foram evidenciados por Gomes *et al.* (2006b, 2009) e Bueno (2010).

Dentre os benefícios desta associação, pode-se destacar também a obtenção de uma pasta de maior consistência, a qual atua como barreira física e impede a recontaminação do canal durante sua utilização. O pH alcançado por esta associação é maior que aquele obtido pela utilização isolada da CLG 2%, podendo auxiliar no combate à

reabsorção inflamatória interna e externa (Beltes *et al.*, 1997). A adição da CLG 2% ao HC promove maior substantividade à formulação, devido à sua capacidade de adsorção à dentina, contribuindo para manutenção da redução de microrganismos no canal radicular mesmo após sua remoção (Tanomaru *et al.*, 2002; Bueno, 2010).

Além disso, HC tem sido preconizado para neutralização de endotoxina bacteriana (Estrela *et al.*, 1995; Tanomaru *et al.*, 2002), enquanto CL não atua sobre ela (Tanomaru *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004; Vianna *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2009a; Endo, 2011; Endo *et al.*, 2012, 2013). Entretanto, Signoretti *et al.* (2011) demonstraram *in vitro* que a CL melhorou as propriedades do HC em reduzir o nível de endotoxina dos canais radiculares.

Aibel & Stevens (1999) analisaram a capacidade da CL 1,2% em inativar LPS, utilizando método de produção de IL-6 em cultura de macrófagos estimulados por LPS e LPS tratado com CL 1,2% por 40 minutos. Os resultados demonstraram que a CL 1,2% promoveu pouca ou nenhuma inativação do LPS.

Buck *et al.* (2001), avaliando o efeito de SQA e HC na degradação do LPS, observaram que água apirogênica, EDTA 15%, etanol 95%, CL 0,12%, CL 0,12% associada ao NaOCl 2,6% e NaOCl 2,6% demonstraram pouco ou nenhum efeito sobre LPS. Por outro lado, suspensão aquosa de HC 24,6 mg/mL e a associação de CL 0,12%, etanol 95% e NaOCl 2,6% inativaram LPS pela hidrólise de ligações éster das cadeias de ácidos graxos do lipídio A.

Basrani *et al.* (2002) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana residual de diferentes MIC na dentina humana. CLG 0,2%, CLG 2%, CLL 2%, HC, HC + CLG 0,2% foram inoculados em 98 raízes e mantidas no canal radicular durante 7 dias. Após, foram inoculados nos canais *E. faecalis* por 21 dias. Amostras de dentina foram coletadas com o auxílio de broca Gates-Glidden e o crescimento bacteriano foi avaliado por espectrofotometria após 72 horas de incubação em BHI. As densidades ópticas foram significativamente menores para os grupos CLG 0,2%, CLG 2% e CLL 2%, quando comparadas aos demais grupos. Os autores concluíram que CL 2% possui atividade antimicrobiana residual sobre *E. faecalis* por 7 dias.

Ferreira *et al.* (2002) observaram *in vitro* que HC 10% e CL 2%, utilizadas isoladamente, demonstraram ação antimicrobiana contra *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella nigrescens*, *Clostridium perfringens* e *Bacteroides fragilis*. CL demonstrou maior efetividade quando comparada ao HC.

Rosa *et al.* (2002) observaram que HC e digluconato de clorexidina demonstraram ação antimicrobiana contra *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum* e *Clostridium perfringens*. CL, mesmo em baixas concentrações, promoveu eliminação de bactérias anaeróbias, com maior efetividade quando comparada ao HC.

Tanomaru *et al.* (2003) observaram que o PQM com soluções de NaOCl e CL não foi capaz de inativar os efeitos da endotoxina em induzir resposta inflamatória com reabsorção óssea na região periapical de cães, entretanto, quando foi utilizado HC como MIC, este foi capaz de inativar os efeitos induzidos pela endotoxina.

Menezes *et al.* (2004b) avaliaram a atividade antimicrobiana da CLG 2%, CLG 2% + HC, natrosol, CLL 2% e HC sobre diferentes cepas de *C. albicans*, utilizando método de diluição em ágar. Suspensões contendo 10⁶ células de diferentes cepas de *C. albicans* foram semeadas em placas preparadas com as substâncias, por meio de inoculador de Steers e, após 24 horas de incubação a 37°C, verificou-se a concentração fungicida mínima. Observou-se que a associação CLG 2% + HC, em menor concentração, apresentou melhor ação sobre as cepas estudadas e concluiu-se que esta foi a medicação mais efetiva.

Ercan *et al.* (2006) avaliaram *in vitro* a efetividade da CLG 2%, HC em água destilada e CLG 2% + HC em oitenta dentes humanos unirradulares contaminados com *E. faecalis* e *C. albicans* por 5 dias. O grupo controle foi tratado apenas com SF estéril. Amostras de raspas de dentina foram coletadas com brocas Gates-Glidden após 7, 15 e 30 dias. CLG 2% e CLG 2% + HC foram significativamente mais efetivas contra *E. faecalis* e *C. albicans* que a pasta de HC, sem diferença estatística entre elas. Entretanto, os autores sugerem que para suportar esses resultados *in vitro*, estudos *in vivo* são necessários.

Gomes *et al.* (2006b) investigaram *in vitro* a atividade antimicrobiana de CLG 2%, HC associado à água estéril e HC + CLG 2% sobre microrganismos presentes em canais radiculares, utilizando teste de difusão em ágar e teste de contato direto. Os microrganismos utilizados foram: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*

faecalis, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. CLG 2% apresentou os maiores halos de inibição, levando apenas 1 minuto para inibir 100% dos microorganismos testados. Concluiu-se que a CLG 2% e o HC + CLG 2% apresentaram atividade antimicrobiana superior ao HC manipulado com água estéril.

Vianna *et al.* (2007) avaliaram *in vivo* o efeito de procedimentos endodônticos sobre microrganismos e endotoxinas. Trinta e dois dentes humanos unirradiculares com infecção endodôntica e lesões periapicais foram instrumentados com limas manuais, utilizando CLG 2% como SQA, e divididos aleatoriamente em 3 grupos de acordo com a MIC utilizada: pasta de HC, CLG 2% e HC + CLG 2%. Foram realizadas coletas das amostras antes e após o PQM e após 7 dias da MIC. Foi utilizado teste de cultura para os microrganismos e teste turbidimétrico LAL para quantificação de endotoxina. Após o PQM houve redução de 99,9% no número de microrganismos e de 44,4% da quantidade de endotoxinas. Após 7 dias do uso da MIC, ainda foram encontrados microrganismos em 54,1% dos casos, e a quantidade de endotoxina foi reduzida em apenas 1,4% dos casos. Não houve diferença estatística significativa entre as MIC. Concluiu-se que o PQM foi responsável pela maior redução da quantidade de microrganismos e endotoxinas.

Ferreira *et al.* (2007) verificaram que HC foi efetivo contra *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces israelii*, *Clostridium perfringens* e *Enterococcus faecalis*. Entretanto, *E. faecalis* foi menos susceptível ao HC, quando comparado aos demais microrganismos.

Oliveira *et al.* (2007) demonstraram *in vitro* que as soluções de NaOCl 2,5% e 5,25% e CL 2% não foram capazes de inativar LPS em canais radiculares. Por outro lado, a utilização de solução de HC e polimixina B, como agentes irrigantes, reduziram significativamente o nível de endotoxinas nos canais radiculares.

Gurgel-Filho *et al.* (2007) verificaram que o PQM com CLG 2% reduziu em 100% a contaminação por *E. faecalis*. Após 14 dias de medicação de HC houve crescimento de bactérias, sem diferença estatística entre os grupos.

Gomes *et al.* (2009b) observaram que CL utilizada isoladamente ou associada ao HC foi capaz de se difundir nos túbulos dentinários e alcançar a superfície externa da raiz, na presença ou ausência de cimento, exercendo ação antimicrobiana.

Valera *et al.* (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana do NaOCl associado a diferentes MIC (HC, CLG 2%, HC + CLG 2%) sobre *C. albicans* e *E. faecalis* inoculados em canais radiculares. Os autores verificaram que todas as MIC foram capazes de promover diminuição significativa no número de microrganismos, entretanto, somente HC + CLG 2% foi capaz de eliminar completamente os microrganismos.

Roças & Siqueira (2011) avaliaram, por meio de métodos moleculares, o efeito antimicrobiano do PQM associado à MIC em canais radiculares de dentes com lesão periapical. Foram coletadas amostras de 24 canais radiculares necróticos, antes do PQM (S1), após PQM com NaOCl 2,5% (S2), e após MIC por 7 dias com pasta de HC com glicerina (CHG) ou paramonoclorofenol canforado/glicerina (CHPG) (S3). A presença de bactérias, archaea e fungos foi analisada por meio de PCR e a identificação bacteriana foi realizada por meio de checkerboard de captura reversa para 28 patógenos endodônticos. Todas as amostras foram positivas em S1 para bactérias, mas negativas para archaea e fungos. De modo geral, 46% das amostras de S2 e 62,5% das amostras de S3 foram negativas para bactérias por PCR. As amostras de S2 e S3 foram negativas em 50% e 58% dos canais no grupo de CHG e em 42% e 67% dos canais no grupo CHPG, respectivamente. Em S2 e S3, *Propionibacterium acnes* e *Streptococcus* spp. foram mais prevalentes. Concluiu-se que o conteúdo microbiano foi reduzido substancialmente após PQM e MIC.

Signoretti *et al.* (2011), avaliando *in vitro* a influência da CLG 2% sobre pH, liberação de cálcio e capacidade do HC em reduzir endotoxinas, concluíram que CL não interfere nas propriedades químicas do HC, sendo capaz de aumentar sua capacidade de redução de endotoxina em canais radiculares.

Endo *et al.* (2013) monitoraram clinicamente a efetividade do PQM e de MIC na redução de microrganismos presentes nos canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico. Quinze dentes foram instrumentados e medicados com HC + CLG 2%, HC + SF e CLG 2%. As amostras microbiológicas e de endotoxinas foram coletadas após remoção de guta-percha (S1), após PQM utilizando CLG 2% (S2), e após utilização de MIC (S3) nos tempos de 7 e 14 dias. Bactérias cultiváveis foram recuperadas dos canais radiculares infectados nos 3 momentos das coletas, contadas e identificadas por meio de

cultura e PCR. Conteúdo microbiano diminuiu significativamente de S1 para S2. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre S2 e S3 entre os três grupos experimentais. PQM e uso de MIC promoveram reduções significativas (médias de 99,61% e 99,57%, respectivamente) do número de bactérias em comparação com S1. Um total de 110 isolados clínicos foram recuperados pela técnica de cultura, incluindo 32 diferentes espécies e 7 diferentes gêneros. Onze espécies bacterianas foram detectadas dos 13 *primers* espécie-específicos. Concluiu-se que a microbiota de dentes com insucesso do tratamento endodôntico é composta por bactérias Gram-positivas, embora bactérias Gram-negativas tenham sido detectadas por meio de método molecular. Além disso, observou-se que o PQM foi mais eficaz que a MIC na desinfecção dos canais radiculares.

Com base na literatura, observa-se que ainda não foram encontrados SQA, regime de irrigação e MIC que sejam, ao mesmo tempo, efetivos contra microrganismos e endotoxinas, tanto na luz do canal radicular, quanto nos túbulos dentinários. Tal fato motivou a realização deste trabalho.

3. PROPOSIÇÃO

Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a efetividade do PQM com diferentes SQA e da MIC sobre *E. faecalis*, *E. coli*, *C. albicans* e endotoxina de *E. coli*, tanto na luz do canal radicular quanto nos túbulos dentinários.

Objetivos específicos

a) Investigar a presença de endotoxina de *E. coli* nos canais radiculares após utilização de diferentes SQA e MIC;

b) Investigar a presença de DNA de *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans* nos canais radiculares após utilização de SQA e MIC;

c) Investigar a ação do PQM e MIC sobre *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans* em canais radiculares.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, tendo sido aprovado sob protocolo n° 008/2010, cujo certificado de aprovação encontra-se no Anexo I.

4.1 Preparo dos espécimes

4.1.1. Seleção dos espécimes

Foram utilizados dentes humanos extraídos unirradiculares ($n=520$), provenientes do Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista - UNESP.

Em sua seleção, alguns critérios foram respeitados:

- a) Ser permanente, possuir rizogênese completa, comprimento radicular de, no mínimo, 15 mm, canal único, reto e acessível, verificado quando radiografado nos sentidos vestibulo-lingual e méso-distal.
- b) Foram descartados os dentes que possuíam curvatura, calcificações, bifurcações ou qualquer anomalia anatômica em suas raízes.

Todos os dentes foram limpos por meio da remoção dos tecidos moles e cálculos aderidos com auxílio de curetas Gracey (S. S. White Artigos Dentários Ltda., Juiz de Fora, MG, Brasil). Os dentes foram seccionados próximo à junção cimento-esmalte com disco de carborundum (Carbodont, Gysi S.A., Buenos Aires, Argentina) acoplado a um mandril em micromotor, descartando-se as coroas e padronizando o comprimento dos remanescentes radiculares em aproximadamente 15 mm.

As 520 raízes foram submetidas a PQM inicial, armazenadas em SF estéril e congeladas em freezer a -20°C até sua utilização.

4.1.2 Preparo químico-mecânico inicial

Todos os espécimes foram submetidos à instrumentação prévia para padronização do diâmetro dos canais radiculares, de acordo com a técnica descrita a seguir.

Foram utilizadas brocas Gates-Glidden nº3 para preparo da região de entrada do conduto (3 mm). A partir da exploração do canal radicular e forame apical com lima tipo K (Kerr) #10 (Maillefer, Ballaigues, VD, Suíça), foi realizada a instrumentação inicial dos canais radiculares. Raízes com diâmetro menor que a lima K #10 ou maior que a lima K #20 foram descartadas.

O PQM inicial foi realizado desde o diâmetro anatômico inicial até a lima K #20 (Maillefer, Ballaigues, VD, Suíça) em toda a extensão do canal. Os canais foram irrigados com 5 mL de solução de NaOCl 1% a cada troca de lima, com auxílio de seringa estéril e aprotogênica de 5 mL (Injex, Ourinhos, SP, Brasil) e agulha estéril e aprotogênica 20 x 5,5 mm (BD, Curitiba, PR, Brasil) e irrigados com 5 mL de SF estéril e aprotogênica, aspirados e secos com cone de papel absorvente estéril e aprotogênico nº 20 (Maillefer, Ballaigues, VD, Suíça).

Após instrumentação inicial, os canais radiculares foram irrigados com 5 mL de solução de tiosulfato de sódio 5% a fim de neutralizar a ação da SQA, irrigados com 3 mL de EDTA 17% para remoção da *smear layer* e sofreram uma nova irrigação com solução de fosfato tamponado por 10 minutos, seguida de água destilada estéril por 1 hora para remoção dos possíveis resíduos de EDTA e NaOCl.

4.1.3 Vedamento apical e impermeabilização externa das raízes

Os canais radiculares foram secos com cones de papel absorvente estéreis e aprotogênicos nº 20 no comprimento do remanescente radicular por 1 minuto e foi realizado vedamento da região apical das raízes utilizando resina composta fotopolimerizável (Z-100, 3M, Dental Products, St Paul, EUA) e impermeabilização externa de todo comprimento das raízes, com duas camadas de adesivo epóxi Araldite de presa rápida (10 minutos) (Brascola, Taboão da Serra, SP, Brasil), com auxílio de pincel, exceto na região da embocadura do canal.

4.1.4 Inclusão dos espécimes em placas de poliestireno

Os procedimentos citados a seguir foram realizados no interior de uma câmara de fluxo laminar (Veco, Piracicaba, SP, Brasil), a qual foi primeiramente submetida à desinfecção com álcool 70% e incidência de luz ultravioleta por trinta minutos. Todos os materiais e instrumentos utilizados foram esterilizados e apirogenizados previamente à sua utilização.

Todos os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em placas de poliestireno de 24 poços (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, EUA), com 5 espécimes em cada placa, a fim de evitar contaminação cruzada entre os espécimes durante sua manipulação. A fixação foi realizada nos poços mais externos (borda) com resina acrílica quimicamente ativada (Clássico Artigos Odontológicos, São Paulo, SP, Brasil), recobrando os espécimes em aproximadamente 10 mm a partir do seu ápice. Todas as placas foram fechadas e embaladas individualmente para esterilização em gás de óxido de etileno (ACECIL Central de Esterilização Com. Ind. Ltda., Campinas, SP, Brasil) a 56°C.

4.2 Modelo de contaminação

Os procedimentos descritos a seguir foram realizados no interior de uma câmara de fluxo laminar, a qual foi previamente submetida à desinfecção com álcool 70% e incidência de luz ultravioleta por trinta minutos. Todos os materiais e instrumentos utilizados foram previamente esterilizados.

4.2.1 Semeadura dos microrganismos

Foram utilizadas cepas-padrão liofilizadas de *Candida albicans* (ATCC 18804), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), os quais foram semeados em caldo Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA), caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Detroit, EUA) e caldo TSB (Tryptic Soy Broth, Difco, Detroit, EUA), respectivamente, por 48 horas. A seguir, a partir da cultura em caldo, as cepas foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA) para

C. albicans, ágar *Mitis Salivarius* (Difco, Detroit, EUA) para *E. faecalis* e ágar MacConkey (Difco, Detroit, EUA) para *E. coli*. Placas contendo *C. albicans* e placas contendo *E. coli* foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 48 horas. Placas contendo *E. faecalis* foram incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 48 horas.

4.2.2 Preparo das suspensões de microrganismos

Em câmara de fluxo laminar, após crescimento dos microrganismos em placas de Petri, foram preparadas suspensões de cada microrganismo, separadamente, em SF estéril e apirogênica, contendo 10⁶ células/mL, as quais foram padronizadas em espectrofotômetro, utilizando-se comprimento de onda de 530 nm, 760 nm e 590 nm e densidade óptica de 0,284, 0,298 e 0,324 para *C. albicans*, *E. faecalis* e *E. coli*, respectivamente.

4.2.3 Contaminação dos espécimes com *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans*

O modelo de contaminação dos espécimes utilizado no presente trabalho foi adaptado a partir do modelo de contaminação proposto por Molina (2008).

Os canais radiculares dos 520 espécimes, previamente esterilizados, foram primeiramente contaminados, com auxílio de micropipeta de precisão, com 10 µL de suspensão contendo *E. coli* (10⁶ células/mL) em SF estéril e apirogênica. Os canais receberam mais 10 µL de BHI caldo e foram selados com tampão de algodão estéril embebido em BHI caldo. Os espécimes foram mantidos em estufa microbiológica a 37±1°C, em umidade relativa, por 7 dias. Após, foram adicionados nos canais radiculares 5 µL de suspensão contendo *E. faecalis* (10⁶ céls/mL), 5 µL de suspensão contendo *C. albicans* (10⁶ céls/mL) e mais 10 µL de BHI caldo. Os canais foram novamente selados com tampão de algodão embebido em BHI caldo estéril.

As placas foram fechadas e vedadas com fita adesiva e mantidas em estufa a 37±1°C por mais 21 dias, totalizando 28 dias de contaminação. Durante este período, foram adicionados 20 µL de meio de cultura estéril (BHI caldo) no interior dos canais radiculares

a cada 2 dias. Em seis poços do centro de todas as placas foram colocados chumaços de algodão umedecidos em água destilada estéril para manutenção da umidade das mesmas.

Após o período de 28 dias de contaminação, em ambiente asséptico, cada placa contendo seus espécimes foi individualmente colocada em câmara de vidro acoplada à bomba a vácuo (Tecnal, TE-058, Piracicaba, SP, Brasil), a qual foi acionada por 20 minutos, na pressão negativa de ± 650 mmHg. Tal procedimento foi previamente testado em estudo piloto, tendo demonstrado promover maior crescimento de UFC/mL (unidade formadora de colônia por mililitro) em meio de cultura BHI ágar, quando comparado ao grupo que não foi submetido à pressão negativa.

4.2.4 Coleta de confirmação da contaminação

No interior da câmara de fluxo laminar, após o período de contaminação, foi realizada coleta do conteúdo dos 400 espécimes, individualmente, para confirmação da contaminação dos canais radiculares. Para tanto, foi primeiramente coletada a amostra de endotoxina, seguida da amostra microbiológica. Para realização da coleta foram utilizados 5 cones de papel absorvente estéreis e apirogênicos (Maillefer, Ballaigues, VD, Suíça), individualmente, no comprimento da raiz por 1 minuto, dos quais um cone foi utilizado para coleta de endotoxina e os quatro cones restantes para a coleta microbiológica.

Os cones utilizados na coleta das amostras de endotoxina foram transferidos, individualmente, para tubos de vidro apirogênicos (Lonza Co., Walkersville, MD, EUA), contendo água reagente de lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL) (Lonza Co., Walkersville, MD, EUA) e seis microesferas de vidro também apirogênicas. As amostras foram armazenadas a -20°C , como recomendado pelo fabricante, para realização dos testes em bloco, pelo método turbidimétrico de LAL, a fim de verificar a permanência e quantificar as endotoxinas presentes no canal radicular, como descrito posteriormente.

Os cones utilizados nas coletas das amostras de microrganismos foram transferidos para tubos tipo Eppendorf estéreis contendo meio de transporte VMGA III. A partir do seu conteúdo, foram realizadas diluições decimais seriadas e alíquotas de 100 μL foram semeadas em triplicata em placas contendo ágar Enterococcosel, ágar Sabouraud

dextrose e ágar MacConkey, para verificação do crescimento de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli*, respectivamente, por meio da contagem de UFC/mL. As placas de ágar Enterococcosel, meio seletivo para detecção de espécies de *Enterococcus* spp., foram incubadas em 5% CO₂, a 37°C, por 2 dias. As placas de ágar Sabouraud-dextrose acrescido de 0,1% de cloranfenicol, meio seletivo para detecção de espécies de leveduras, foram incubadas por 4 dias à temperatura ambiente e depois incubadas em 10% CO₂, a 37°C, por 2 dias. As placas de ágar MacConkey foram incubadas em 10% CO₂, a 37°C, por 2 dias.

Também foi realizada confirmação do crescimento microbiano por meio do método de coloração de Gram e visualização em microscopia de luz, além de testes bioquímicos específicos (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França), posteriormente descritos. A partir do conteúdo do mesmo tubo tipo Eppendorf contendo quatro cones com amostra microbiológica por espécime, foi realizada a análise molecular, posteriormente descrita.

4.3 Efetividade de diferentes substâncias químicas auxiliares e medicações intracanaís sobre suspensão de *E. faecalis*, *E. coli*, *C. albicans* e endotoxina inoculada em canais radiculares

4.3.1 Divisão dos grupos

Placas contendo todos os espécimes ($n=520$), devidamente preparados, foram divididas aleatoriamente em grupos de acordo com a SQA utilizada durante o PQM, com e sem o uso de EDTA 17% (Figuras 1 e 2): SF estéril e apirogênica (controle); NaOCl 5,25%; CLG 2%; NaOCl 5,25% seguida de irrigação final com CLL 2%.

Os espécimes não irrigados com EDTA 17% foram analisados quanto à susceptibilidade dos microrganismos e endotoxina frente às SQA utilizadas durante o PQM, por meio dos métodos de 1) cultura seletiva- identificação fenotípica, 2) análise molecular (PCR – reação em cadeia da polimerase), 3) microscopia confocal e 4) quantificação de endotoxina pelo teste LAL.

Os espécimes irrigados com EDTA 17% foram divididos em grupos de acordo com a MIC utilizada: SF estéril e apirogênica (controle), CLG 2%, HC + CLG 2% (1:1),

HC + SF (9:1). Em seguida, também foram analisados quanto à susceptibilidade dos microrganismos e endotoxina frente às SQA utilizadas durante o PQM associadas à MIC, por meio dos métodos de 1) cultura seletiva- identificação fenotípica, 2) análise molecular, 3) microscopia confocal e 4) quantificação de endotoxina pelo teste LAL.

Contaminação	Grupo	SQA	EDTA 17%	MIC
Suspensão de <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i>	1 (n=10)	SF estéril apirrogênica (controle)	-	SF
	2 (n=30)		+	CLG 2%
	3 (n=30)		+	HC + CLG 2%
	4 (n=30)		+	HC + SF
	5 (n=30)	NaOCl 5,25%	+	CLG 2%
	6 (n=30)		+	HC + CLG 2%
	7 (n=30)		+	HC + SF
	8 (n=10)		-	SF
	9 (n=30)	CLG 2%	+	CLG 2%
	10 (n=30)		+	HC + CLG 2%
	11 (n=30)		+	HC + SF
	12 (n=10)		-	SF
	13 (n=30)	NaOCl 5,25% seguido de irrigação com CLL 2%	+	CLG 2%
	14 (n=30)		+	HC + CLG 2%
	15 (n=30)		+	HC + SF
	16 (n=10)		-	SF

Figura 1 - Distribuição dos espécimes, utilizados para análise microbiológica por cultura seletiva- identificação fenotípica/molecular e quantificação de endotoxina, nos grupos experimentais, de acordo com a SQA e MIC utilizadas (n=400)

Contaminação	Número de espécimes (n)	SQA	EDTA 17%	MIC
Suspensão de <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i>	6	SF estéril apirogênica (controle)	+	CLG 2%
	6		+	HC + CLG 2%
	6		+	HC + SF
	6		+	SF
	6		-	SF
	6	NaOCl 5,25%	+	CLG 2%
	6		+	HC + CLG 2%
	6		+	HC + SF
	6		+	SF
	6		-	SF
	6	CLG 2%	+	CLG 2%
	6		+	HC + CLG 2%
	6		+	HC + SF
	6		+	SF
	6		-	SF
	6	NaOCl 5,25% seguido de irrigação com CLL 2%	+	CLG 2%
	6		+	HC + CLG 2%
	6		+	HC + SF
	6		+	SF
	6		-	SF

Figura 2 - Distribuição dos espécimes, utilizados para análise por microscopia confocal, de acordo com a SQA e MIC utilizadas (n=120)

4.3.2 Instrumentação dos canais radiculares

Os canais de todos os espécimes foram instrumentados por meio da técnica cérvico-apical modificada pela FOP/UNICAMP, abaixo descrita, utilizando SQA correspondente ao seu grupo:

1) Pré-alargamento dos 2/3 iniciais do canal radicular, onde empregou-se a seqüência de limas rotatórias abaixo:

- a. Largo 2 (750 RPM);
- b. Hero 20.06 (Micromega, Besançon, França) (350 RPM);
- c. Gates-Glidden #5 (750 RPM);
- d. Gates-Glidden #4 (750 RPM);

e. Gates-Glidden #3 (750 RPM);

f. Gates-Glidden #2 (750 RPM).

2) Patência apical com lima K (Maillefer, Ballaigues, VD, Suíça);

3) Determinação da lima anatômica inicial com lima K;

4) Instrumentação do canal por meio de técnica rotatória, utilizando a seqüência de limas de NiTi – *Mtwo* (*Mtwo*[®], VDW, Munich, Alemanha). A instrumentação foi realizada seguindo a seqüência recomendada pelo fabricante: *Mtwo* 10/.04; *Mtwo* 15/.05; *Mtwo* 20/.06; *Mtwo* 25/.06; *Mtwo* 30/.05. A introdução de cada instrumento foi realizada em toda extensão do comprimento real de trabalho, com movimentos leves, inserindo e removendo a lima do canal radicular, evitando qualquer força no sentido apical. Foi mantida uma velocidade permanente de rotação, isto é, 300 RPM;

5) Verificação da patência apical a cada troca de lima.

No PQM, foi empregado um conjunto de limas endodônticas estéreis e apirogênicas, sendo estas utilizadas para a instrumentação de três espécimes. Antes da introdução de cada instrumento, 2 mL da SQA correspondente ao grupo estudado era introduzido no canal radicular. Após cada instrumentação, o canal era irrigado com 5 mL de SF estéril e apirogênica, a fim de auxiliar na remoção da substância anteriormente utilizada. Ao final da instrumentação, antes da colocação do EDTA 17%, 10 mL de SF foi utilizada para garantir a remoção da SQA. Nos grupos irrigados com NaOCl, após utilização do EDTA, o canal foi novamente irrigado com 2 mL de NaOCl que foi removido com 10 mL de SF.

A solução de NaOCl 5,25% foi manipulada pela Drogal Farmácia de Manipulação Ltda. (Piracicaba, SP, Brasil). A diluição do NaOCl foi realizada com água estéril, sem adição de conservantes. Devido à instabilidade do NaOCl, o mesmo foi manipulado em pequenas proporções, 24 horas antes de sua utilização.

CLG 2% (Endogel, Itapetininga, SP, Brasil) consistiu em uma base de gel de natrosol 1% e gluconato de clorexidina 2% em pH 7,0.

CLL 2% também foi manipulada pela Drogal Farmácia de Manipulação Ltda. (Piracicaba, SP, Brasil), com água estéril.

Previamente à sua utilização, a esterilidade de todas as substâncias (NaOCl, CLG, CLL e SF) foi testada, pelo método de cultura, a fim de evitar contaminação do canal radicular, sendo somente utilizadas quando atestassem cultura negativa, ou seja, ausência de microrganismos.

A irrigação foi realizada com auxílio de seringas apirogênicas de 5 mL (Injex, Ourinhos, SP, Brasil) e agulha apirogênica 20 x 5,5 mm (24 G 3/4, BD, Curitiba, PR, Brasil). A aspiração do conteúdo do canal radicular foi realizada com agulha metálica 20/30 acoplada a um intermediário unido à mangueira da bomba a vácuo (Nevoni, NSR Ind. Com. Rep. Ltda., São Paulo, SP, Brasil), sob aproximadamente 558,8 mmHg de pressão negativa. Após 7 dias da realização dessa instrumentação, todos os espécimes foram novamente instrumentados com a mesma técnica e SQA correspondente ao seu grupo.

4.3.3 Coletas do conteúdo do canal radicular

No interior da câmara de fluxo laminar, foram realizadas coletas do canal radicular em diferentes momentos após a contaminação dos espécimes (confirmação da contaminação), imediatamente após a instrumentação endodôntica; após 7 dias de instrumentação endodôntica; após a segunda instrumentação endodôntica; após 7 dias de MIC; após 14 dias de MIC e após 30 dias de MIC. Todas as coletas dos canais radiculares foram realizadas da mesma maneira, conforme anteriormente descrito no item “coleta de confirmação da contaminação”. A Figura 3 apresenta o fluxograma de todas as coletas realizadas no presente trabalho.

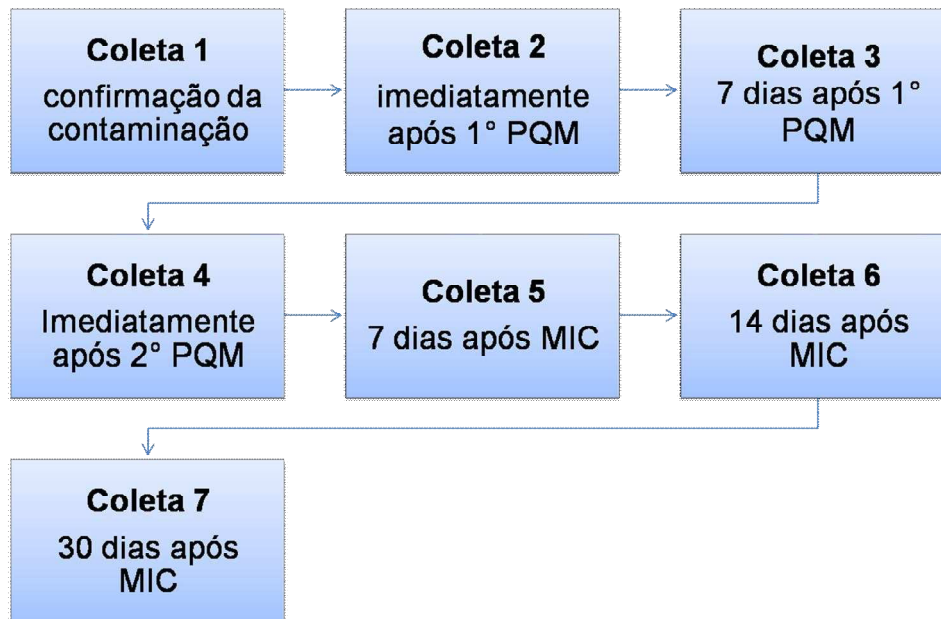


Figura 3 - Fluxograma das coletas

Imediatamente após o PQM, foi realizada coleta do conteúdo do canal radicular, e os mesmos procedimentos de coleta para análise fenotípica (isolamento, identificação e contagem de colônias) e para análise molecular foram realizados, bem como a coleta para o teste LAL de quantificação de endotoxina de *E. coli*.

Após a coleta imediata, foram inoculados 20 µL de SF estéril e apirogênica nos canais e foram posicionados tampões de algodão estéril e apirogênico embebidos em SF estéril e apirogênica na embocadura de todos os espécimes. As placas contendo os espécimes foram incubadas novamente pelo período de 7 dias a 37°C em estufa microbiológica. Após este período, novas amostras foram coletadas, com os mesmos procedimentos e cuidados da coleta anterior, a fim de verificar a permanência de microrganismos viáveis e endotoxina de *E. coli* no interior dos canais radiculares decorridos os 7 dias da instrumentação. Imediatamente após essa coleta, foi realizada uma nova instrumentação com a SQA correspondente ao grupo e realizada nova coleta.

Em seguida, todos os espécimes foram irrigados com 10 mL de SF estéril e apirogênica e aspirados. Os grupos com ausência da utilização de ácido etilenodiamino

tetra-acético 17% (EDTA, Iodontec, Porto Alegre, RS, Brasil) tiveram seus espécimes preenchidos com SF estéril e apirogênica.

Os demais espécimes foram inundados com 3 mL de EDTA 17%, por 3 minutos, sob agitação com lima K #15 e trocas de aproximadamente 1 mL a cada minuto para remoção da *smear layer*. EDTA foi removido sob irrigação com 10 mL de SF estéril e apirogênica. Os canais radiculares foram secos com cones estéreis e apirogênicos de papel absorvente nº 30 (Maillefer, Ballaigues, VD, Suíça), no comprimento do remanescente radicular por 1 minuto, e receberam a MIC correspondente ao seu grupo: CLG 2%; HC + CLG 2% (1:1); HC + SF estéril e apirogênica (9:1).

Após preenchimento dos canais radiculares com a MIC, tampões de algodão estéril e apirogênico, embebidos com a MIC correspondente, foram posicionados na embocadura dos canais e as placas foram novamente fechadas, seladas com fita adesiva e mantidas em estufa microbiológica a $37\pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa por 30 dias. Durante esse período, a medicação foi removida com auxílio de lima K #30 e SF estéril e apirogênica e, em seguida, foram realizadas três coletas do conteúdo do canal radicular: após 7 dias de MIC; após 14 dias de MIC e após 30 dias de MIC, conforme descrito anteriormente.

4.3.4 Processamento das amostras

O processamento das amostras foi realizado no laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP-UNICAMP. Os meios de cultura foram utilizados na forma de pó desidratado e suplementos seletivos pré-fabricados, que foram preparados de acordo com as orientações do fabricante.

O meio de transporte VMGA III (Viability Medium Göteborg Agar) foi preparado de acordo com a fórmula original (Möller, 1966; Dahlén *et al.*, 1993), o qual é capaz de suportar microrganismos anaeróbios estritos e facultativos sem favorecer seu crescimento. Sua consistência é semi-sólida em temperatura ambiente e semi-fluida acima de 30°C . É indicado para amostras pequenas, como aquelas coletadas por meio de pontas de papel absorvente no interior de canais radiculares, como realizado no presente trabalho.

O conteúdo das coletas foi processado pelos métodos LAL, cultura, bioquímico, PCR (técnica de reação em cadeia da polimerase) e microscopia confocal, descritos a seguir.

4.3.4.1 Quantificação de endotoxina de *E. coli* pelo método turbidimétrico do lisado de amebócito de *Limulus* (LAL)

Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar recoberta com duas camadas de gaze apirogênica. Todo material utilizado apresentava-se apirogênico (livre de endotoxinas), proveniente da Lonza (Walkersville, MD, EUA). Outros materiais, como pinças clínicas e vidros contendo esferas de vidro (utilizados para coleta) foram submetidos a 200°C por calor seco (estufa) pelo período de 4 horas, previamente à sua utilização, a fim de despirogenizá-los.

Para quantificação da endotoxina de *Escherichia coli* inoculada no interior dos canais radiculares e verificação de sua possível eliminação por meio da utilização de SQA e MIC, foi utilizado o método turbidimétrico de LAL: teste *Pyrogen*[®] 5000 (Lonza, Walkersville, MD, EUA) - uma preparação de lisado de amebócito de *Limulus*, o qual consiste em um ensaio cinético quantitativo para detecção de endotoxina de bactérias Gram-negativas.

O *kit Pyrogen-5000* compreende: 1) *Pyrogen-5000* LAL reagente; 2) endotoxina liofilizada de *Escherichia coli* 055:B5; 3) tampão de reconstituição *Pyrogen-5000*.

Para realização dos testes foram utilizados: 1) água reagente LAL (Lonza, Walkersville, MD, EUA); 2) hidróxido de sódio 0,1 N ou ácido clorídrico 0,1 N, dissolvido em água reagente LAL, para ajuste do pH da amostra, caso necessário; 3) tubo de vidro descartável e apirogênico para diluição; 4) microplaca estéril e apirogênica descartável (96 poços – 12 colunas e 8 fileiras) (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, EUA); 5) multipipetador de 8 canais; 6) reservatório para reagente (Lonza, Walkersville, MD, EUA); 7) leitor de microplacas (Ultramark, Bio-Rad Laboratories,

Japão); 8) *software* WinKQCL[®] (Lonza, Walkersville, MD, EUA); 9) cronômetro e agitador vortex.

4.3.4.1.1 Extração de endotoxina do cone de papel

A partir dos cones de papel utilizados, individualmente, para realização das coletas dos canais radiculares, as amostras de endotoxina foram reconstituídas em 1 mL de água de LAL e extraídas sob agitação mecânica em vortex por 60 segundos.

4.3.4.1.2 Padronização da diluição das amostras

Devido à sua sensibilidade, o teste LAL pode ser afetado por muitos fatores, como a presença de outros materiais biológicos além da endotoxina. Fatores de inibição devem ser evitados, para isso foi realizada a adição de uma concentração conhecida de endotoxina de *E. coli* (0,1 EU/mL) (unidade de endotoxina por mililitro) às amostras. Este procedimento, denominado *Spike*, possibilita verificar possíveis interferências na quantificação de endotoxinas.

A adição de 0,1 EU/mL de endotoxina foi realizada na amostra mãe e em 4 diluições (1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000) de 14 amostras coletadas dos canais radiculares (2 iniciais – C1, 2 após instrumentação – C2, 2 previamente à reinstrumentação – C3, 2 após a reinstrumentação – C4, 2 após 7 dias da colocação da MIC – C5, 2 após 14 dias da colocação da MIC – C6 e 2 após 30 dias da colocação da MIC – C7), por espécime. Em seguida, os testes foram realizados em duplicata, sendo da mesma amostra - 2 poços contendo 100 µL da amostra mãe ou suas diluições; e 2 poços contendo 100 µL amostra + 0,1 EU/mL de endotoxina (*spike*).

Para comprovar que não houve qualquer tipo de interferência (inibição ou desenvolvimento) da amostra com o reagente de LAL, a concentração de endotoxina recuperada dos poços contaminados, calculada pelo *software*, deveria estar compreendida entre 50% - 200%, valor este denominado controle positivo do produto (PPC). A amostra mãe e sua diluição 10⁻¹ foram as que apresentaram maiores números dentro do padrão do

PPC, assim, a diluição 10^{-1} foi selecionada para a realização dos testes de todas as amostras através do método turbidimétrico. Os testes foram realizados como descrito a seguir.

4.3.4.1.3 Padronização da curva padrão

O estabelecimento de uma curva padrão com quantidades de endotoxina conhecidas foi necessário para determinar a concentração de endotoxinas em quantidades desconhecidas (Figura 4).

A curva foi preparada utilizando solução concentrada 100 EU/mL e suas diluições: 10 EU/mL, 1,0 EU/mL, 0,10 EU/mL e 0,01 EU/mL (Tabela 1).

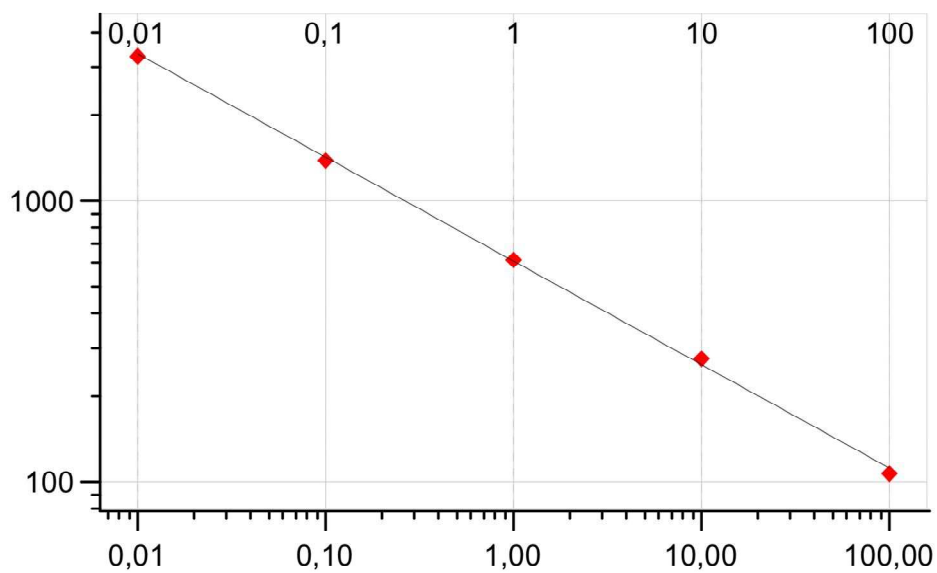


Figura 4 - Curva padrão para o método turbidimétrico (concentração: EU/mL)

Tabela 1- Estabelecimento das diluições da curva padrão nas concentrações 10 EU/mL, 1,0 EU/mL, 0,10 EU/mL e 0,01 EU/mL

Tubo	Concentração de Endotoxina (EU/mL)	Volume de água reagente LAL (mL)	Volume de solução de endotoxina adicionado à água reagente LAL
1	10	0,9	0,1mL de 100 EU/mL solução
2	1	0,9	0,1mL de 10 EU/mL solução
3	0,10	0,9	0,1mL de 1,0 EU/mL solução
4	0,01	0,9	0,1mL de 0,10 EU/mL solução

No tubo 1, preparou-se a solução contendo 10 EU/mL de endotoxina por adição de 0,1mL de 100 EU/mL de endotoxina estoque em 0,9mL de água reagente LAL. Essa solução foi vigorosamente agitada em vortex por pelo menos 60 segundos antes do procedimento;

Para o tubo 2, transferiu-se 0,1mL da solução de endotoxina 10 EU/mL em 0,9mL de água reagente LAL, resultando em 1,0 EU/mL. A solução foi vigorosamente agitada em vortex por pelo menos 60 segundos antes do início do procedimento;

Para o tubo 3, transferiu-se 0,1mL da solução de endotoxina 1,0 EU/mL em 0,9mL de água reagente LAL, resultando em 0,10 EU/mL. Essa solução foi vigorosamente agitada em vortex por pelo menos 60 segundos antes do procedimento;

Para o tubo 4, transferiu-se 0,1 mL da solução de endotoxina 0,10 EU/mL em 0,9mL de água reagente LAL, resultado em 0,01 EU/mL. Essa solução foi vigorosamente agitada em vortex por pelo menos 60 segundos antes do início do procedimento.

A eficiência da curva padrão deve ser maior ou igual a 0,98, valor este denominado de r^2 ($r \geq 0,98$). Caso o valor encontrado estivesse abaixo desse valor aceitável, o operador deveria realizar a calibração até que atingisse o nível aceitável para realizar os testes com todas as amostras.

4.3.4.1.4 Realização do teste *Pyrogent-5000*

Inicialmente, 100 μ L do *blank* (água de LAL) foram depositados em duplicata na placa de 96 poços (Figura 5). Em seguida, 100 μ L de cada ponto da curva padrão nas diferentes concentrações (100 EU/mL, 10 EU/mL, 1,0 EU/mL, 0,10 EU/mL e 0,01 EU/mL) foram distribuídos em duplicata (Figura 5). Após, 100 μ L das amostras e seus respectivos controles (PPC), ambos em duplicata, foram depositados com reagente de LAL (Figura 5). Para cada poço do controle positivo, foram adicionados 10 μ L de 0,1 EU/mL de endotoxina de *E. coli* (*spike*). Foram adicionados 100 μ L do reagente de LAL reconstituído em todos os poços, quando a placa encontrava-se posicionada no leitor. O leitor de microplacas com *software* WinKQCL[®] foi programado em 340 nm, 37°C e 100 leituras, para monitoramento automático até o desenvolvimento de uma aparência de turvação. Em seguida, a leitura foi iniciada, levando aproximadamente 60 minutos para o seu término. O tempo necessário antes do desenvolvimento da turvação (tempo de reação) é inversamente proporcional à quantidade de endotoxina presente na amostra.

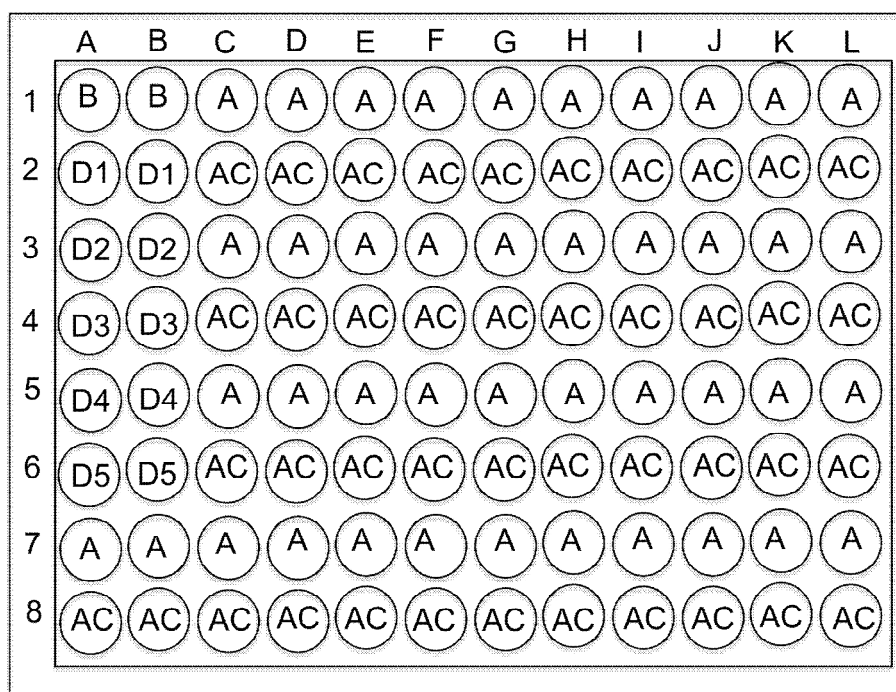


Figura 5 - Distribuição das amostras: B= *blank*; D1= 0,01 EU/mL, D2= 0,10 EU/mL; D3= 1,0 EU/mL; D4= 10 EU/mL; D5= 100 EU/mL; A= amostra; AC= amostra-controle

4.3.4.1.5 Cálculo da concentração de endotoxina

Há diversos métodos para determinar a concentração de endotoxina nas amostras. De forma contínua, durante todo o ensaio, o leitor de microplacas (*software* WinKQCL) foi monitorado na absorvância de 340 nm de cada orifício da microplaca. Usando a leitura de absorvância inicial de cada orifício como seu próprio *blank*, o leitor determina o tempo necessário para que a absorvância aumente a 0.03 unidades. Este tempo é denominado “tempo de reação”. O *software* WinKQCL executa automaticamente uma correlação linear log/log do “tempo de reação” de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os cálculos foram realizados em uma planilha do Excel fornecida pelo fabricante.

4.3.4.2 Análise microbiológica clássica

A atividade antimicrobiana das SQA e MIC utilizadas foi avaliada por meio do isolamento e contagem de UFC/mL de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* do interior dos canais radiculares. A fim de auxiliar na identificação microbiana, também foram realizadas análise da morfologia macroscópica colonial, análise da morfologia microscópica celular e identificação primária dos microrganismos por meio de testes bioquímicos.

4.3.4.2.1 Análise da morfologia colonial

Após incubação, foi analisada a morfologia das colônias em todas as placas iniciais (Placa mãe) em estereomicroscópio (Lambda Let 2. Atto Instruments Co., Hong Kong, China), em aumento de 10 vezes. A análise das colônias foi realizada de acordo com as suas características macroscópicas na placa, observando-se: tamanho, cor, forma, textura, elevação, borda, superfície e opacidade.

4.3.4.2.2 Análise da morfologia celular

A caracterização morfológica celular foi realizada por meio da leitura das lâminas, às quais receberam estas colônias e foram submetidas ao método de coloração de

Gram (Newprov, Pinhais, PR, Brasil). Após fixar o inóculo sobre a lâmina junto à chama, adicionou-se corante cristal violeta. Após um minuto, a lâmina foi lavada com água para retirar o excesso de corante. Colocou-se lugol, o qual foi removido após um minuto com álcool etílico e, em seguida, a lâmina foi novamente lavada com água. Colocou-se safranina e após um minuto retirou-se seu excesso com água. Sob microscopia óptica, determinou-se se o microrganismo era Gram-negativo (coloração rosa) ou Gram-positivo (coloração violeta).

4.3.4.2.3 Quantificação celular

Em todas as coletas, tubos tipo Eppendorf contendo as amostras do canal radicular foram agitados por 60 segundos no interior da câmara de fluxo laminar. Alíquotas (100 µL) das diluições decimais seriadas do conteúdo coletado do canal radicular foram semeadas em triplicata em placas contendo meio de cultura seletivo para cada microrganismo e foi realizada contagem de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli*, sendo os dados expressos em UFC/mL.

Para avaliação do crescimento microbiano, as placas de ágar Enterococcosel, meio seletivo para detecção de espécies de *Enterococcus* spp., foram incubadas em 5% CO₂, a 37°C, por 2 dias. As placas de ágar Sabouraud-dextrose acrescido de 0,1% de cloranfenicol, meio seletivo para detecção de espécies de leveduras, foram incubadas por 4 dias à temperatura ambiente e depois incubadas em 10% CO₂, a 37°C, por 2 dias (Vianna *et al.*, 2005a). As placas de ágar MacConkey foram incubadas em 10% CO₂, a 37°C, por 2 dias.

4.3.4.2.4 Análise bioquímica

A fim de auxiliar na identificação dos microrganismos, foram utilizados métodos de identificação pré-fabricados, ou seja, testes bioquímicos em miniatura, os quais são comercializados em *Kits* padronizados pela Biomérieux (BioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, França). Estes testes bioquímicos possuem reagentes que evidenciam, pela mudança de cor, em determinados períodos, as exigências nutricionais e compostos

específicos produzidos pelos microrganismos e fornecem gabaritos para finalizar a identificação, os quais podem ser verificados no *site* “<http://industry.biomerieux-usa.com/industry/watertesting/api/apiweb.htm>”.

Os *Kits* padronizados utilizados para a especificação primária dos microrganismos isolados foram:

- API Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para estreptococos (cocos Gram-positivos, catalase-negativa)
- API 20 E (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para enterobactérias (Bacilos entéricos Gram-negativos, catalase-positiva, oxidase-negativa).
- API AUX (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para identificar espécies de *Candida*.

Todos os tubos tipo Eppendorf com o conteúdo das coletas em meio de transporte VMGA III, imediatamente após a retirada das alíquotas para quantificação microbiológica, foram estocados em freezer -70°C para realização das análises por PCR.

4.3.4.3 Análise microbiológica molecular

PCR (técnica de reação em cadeia da polimerase) simples foi utilizada para verificar a presença de DNA de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* no interior dos canais radiculares após utilização de SQA e MIC.

4.3.4.3.1 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada com o QIA amp DNA *kit* (QIAGEN, Chatsworth, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.4.3.2 Reação de PCR

A reação de PCR foi processada na quantidade de 25 µL de uma mistura de reagentes (Master Mix) contendo as quantidades especificadas na Figura 6 para 1,5 µL de DNA da amostra.

Reagentes	Quantidade (µL)
Tampão (10 x <i>Reaction buffer</i> , Invitrogen Life Technology, São Paulo, SP, Brasil)	2,5
<i>DNTPs</i> (Invitrogen Life Technology, São Paulo, SP, Brasil)	0,5
MgCl ₂ (Invitrogen Life Technology, São Paulo, SP, Brasil)	1,25
H ₂ O <i>MiliQ</i>	17,625
<i>Primer Forward</i> 100 µM (Invitrogen Life Technology, São Paulo, SP, Brasil)	0,75
<i>Primer Reverse</i> 100 µM (Invitrogen Life Technology, São Paulo, SP, Brasil)	0,75
<i>Taq Platinum</i> (Invitrogen Life Technology, São Paulo, SP, Brasil)	0,125

Figura 6 - Proporções dos reagentes no Master Mix

A Taq DNA Polimerase escolhida foi a Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen Life Technology, São Paulo, SP, Brasil) a qual pode ser acrescentada diretamente na mistura da reação (Master Mix), evitando a necessidade de *hot start*.

A seleção dos *primers* para identificação dos microrganismos foi realizada com base na literatura científica (Figura 7). Apesar de terem sido utilizados oligonucleotídeos descritos na literatura, os ciclos de termociclagem, temperaturas, proporções e quantidade de reagentes foram testados, considerando a estrutura do Laboratório de Microbiologia aplicada à Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

Assim, para determinar a temperatura de anelamento ideal, reações de PCR contendo *primers* espécie-específicos (Figura 7) foram realizadas em um aparelho termociclador convencional (MJ96G, Biocycler Termocicladores, Curitiba, SC, Brasil) e submetidas a vários gradientes de temperatura, utilizando amostras ATCCs correspondentes e baseadas na literatura de suporte. Além das amostras, foram utilizados como controle positivo o DNA genômico purificado dos microrganismos investigados e como controle negativo água *MiliQ* estéril.

Espécie Região	Primer: Seqüência de nucleotídeo Referências Comprimento do Amplicon	Reação
<i>E. faecalis</i>	5' GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG 3' 5' CCG TCA GGG GAC GTT CAG 3' Siqueira <i>et al.</i> , 2004 310 bp	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação inicial: 95°C por 2 min • 36 ciclos de: Desnaturação: 95°C por 30s Anelamento: 60°C por 1min Extensão: 72°C por 1 min Elongamento: 72°C por 2 min
<i>C. albicans</i>	5' GCC GGT GAC GAC GCT CCA AGA GCT G 3' 5' CCG TGT TCA ATT GGG TAT CTC AAG GTC 3' Kan, 1993 158 bp	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação inicial: 95°C por 2 min • 35 ciclos de: Desnaturação: 95°C por 1min Anelamento: 55°C por 30s Extensão: 72°C por 1min Elongamento: 72°C por 10 min
<i>E. coli</i>	5' CTA CGT GCC AGC AGC CGC GG 3' 5' CTC ACG ACA CGA GCT GAC GA 3' Nasidze <i>et al.</i> , 2009 570 bp	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação inicial: 95°C por 1 min • 35 ciclos de: Desnaturação: 95°C por 1 min Anelamento: 62°C por 1min Extensão: 72°C por 1min Elongamento: 72°C por 2 min

Figura 7 - Dados sobre as reações e *primers* espécie-específicos utilizados para cada microrganismo investigado

4.3.4.3.3 Eletroforese

As amostras, após reação de PCR (produtos da amplificação), foram conservadas a 4°C ou analisadas imediatamente por eletroforese. Utilizou-se gel de agarose a 1% (Invitrogen Life Technology, São Paulo, SP, Brasil) em tampão de Tris-borato EDTA (pH 8,0) e corado com brometo de etídio (5µg/mL, Invitrogen Life Technology, São Paulo, SP, Brasil).

Foi incluído em cada gel, um padrão de peso molecular de 100 bp (DNA ladder, Invitrogen Life Technology, São Paulo, SP, Brasil). Após o término de cada corrida (60 volts por 1 hora), as bandas foram observadas com auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta. A documentação fotográfica dos géis foi obtida com o sistema Image Master-VDS (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra) e a captura das imagens foi realizada pelo programa LISCAP *Image Capture Software*.

4.3.4.4 Análise microbiológica por microscopia confocal

4.3.4.4.1 Procedimentos de preparo e coloração dos espécimes

Cento e vinte espécimes foram instrumentados de acordo com o protocolo preconizado para cada grupo, irrigados com e sem EDTA 17%, e analisados por microscopia confocal quanto à susceptibilidade dos microrganismos frente às SQA utilizadas durante o PQM e MIC.

No interior da câmara de fluxo laminar, imediatamente após o período de exposição às SQA e MIC, os espécimes foram irrigados duas vezes com SF estéril, por 1 minuto cada. Em seguida, foram fragmentados, no sentido longitudinal do remanescente radicular, com o auxílio de cinzel e martelo, gerando duas hemi-seções.

Os espécimes foram colocados, individualmente, em poços de microplaca e corados com 100 µL da solução *Live/Dead[®] BacLight Bacterial Viability Kit L7012* (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, EUA), sendo, para tanto, gotejada sobre o espécime. Após aplicação do corante, a placa foi fechada e envolta em papel laminado, a fim de realizar a difusão dos corantes no espécime sob ausência de luz e em temperatura de $\pm 30^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos, segundo recomendações do fabricante. Cada espécime foi processado e analisado individualmente, imediatamente após o período de exposição às SQA e MIC.

Para o preparo do corante *Live/Dead[®] BacLight* foram adicionados 1,5 µL do componente A e 1,5 µL do componente B a 0,97 mL de solução salina 0,85%, imediatamente antes de sua utilização, sendo o mesmo mantido em local protegido da luz e do calor durante todos os procedimentos.

Live/Dead[®] BacLight Bacterial Viability Kit consiste na combinação de SYTO-9 e iodeto de propídio. O SYTO-9 é um corante fluorescente de ácido nucléico que marca em verde microrganismos viáveis e não viáveis. O iodeto de propídio é um corante fluorescente de ácido nucléico que marca em vermelho e penetra apenas as células com membranas danificadas, assim, apenas as células não viáveis são visualizadas.

4.3.4.4.2 Análise em microscopia confocal a laser

Para análise por meio de microscópio confocal, foi utilizada uma lamínula de vidro sobre a superfície de todos os espécimes, individualmente.

As amostras coradas foram examinadas em microscopia confocal de varredura a laser (MCVL Leica TCS-SP5 AOBS, Leica Microsystems CMS, Mannheim, Alemanha), equipado com laser de Argônio e laser de Hélio-Neônio, usando lente objetiva de 63 vezes de aumento, com óleo de imersão. Os comprimentos de onda de absorção e emissão utilizados foram 480/500 nm para SYTO-9 e 490/635 nm para iodeto de propídio, respectivamente. As imagens foram obtidas por meio do *software* Leica Application Suite-Advanced Fluorescence (LAS AF, Leica Microsystems CMS, Mannheim, Alemanha) sob resolução de 1024 x 1024 *pixels*. Foram escaneados, no mínimo, cinco campos ópticos, aleatoriamente escolhidos, por cada hemi-seção radicular, sendo portanto observadas 10 áreas por espécime.

As imagens foram registradas pelo microscópio confocal a cada secção do espécime, adquiridas sequencialmente, sempre com os mesmos ajustes de gama, brilho e contraste para todas as amostras.

4.3.4.4.3 Análise quantitativa

A fim de avaliar a distribuição do biofilme, as fotomicrografias foram transferidas para o *software* ImageJ[®] (Research Services Branch, Bethesda, MD, EUA), onde foram analisadas quantitativamente.

Os canais de imagem foram separados conforme seu constituinte verde (SYTO-9, células viáveis) e vermelho (iodeto de propídio, células não viáveis). As imagens foram tratadas com contraste, a fim de discriminar os microrganismos marcados do plano de fundo. O número de microrganismos (*E. faecalis* e *E. coli*) nas imagens foi estimado por meio de um contador celular automático (Plugin, ITCN-Image-based tool for counting nuclei, versão 1.6) no *software* ImageJ (<http://www.bioimage.ucsb.edu/downloads/automatic-nuclei-counter-plug-infor-imagej>).

As partículas com largura de 5 *pixels*, distância mínima de 2,5 *pixels* e valor de limiar 10 foram contadas. O valor de limiar foi selecionado com base em tamanhos bacterianos típicos (Malic *et al.*, 2009). A contagem de *C. albicans* foi realizada manualmente. A análise estatística foi realizada no programa SAS (SAS Institute Inc., versão 9.0, Cary, NC, EUA), utilizando-se ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, em nível de significância de 5%.

4.4 Análise estatística

Os dados foram tabulados utilizando-se *software* Excel versão 2007 e a análise estatística foi realizada por meio de *software* R versão 2.7.2.

5. RESULTADOS

5.1 Análise microbiológica clássica

5.1.1 Comprovação do modelo experimental de contaminação

Estudo piloto, para comprovação do modelo experimental de contaminação pela inoculação de *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans* durante 28 dias no interior de canais radiculares, foi realizado por meio do cálculo de UFC/mL dos microrganismos presentes e por análise em microscopia eletrônica de varredura (Figura 8), os quais atestaram a validade do modelo de contaminação utilizado.

Por meio desses testes, em todo o período experimental, não foi observada contaminação por espécies microbianas diferentes daquelas utilizadas no presente estudo, em todos os espécimes avaliados. Observou-se também a presença, bem como a viabilidade de *E. faecalis*, *C. albicans* e *E. coli* em todos os espécimes, nos diferentes momentos de avaliação.

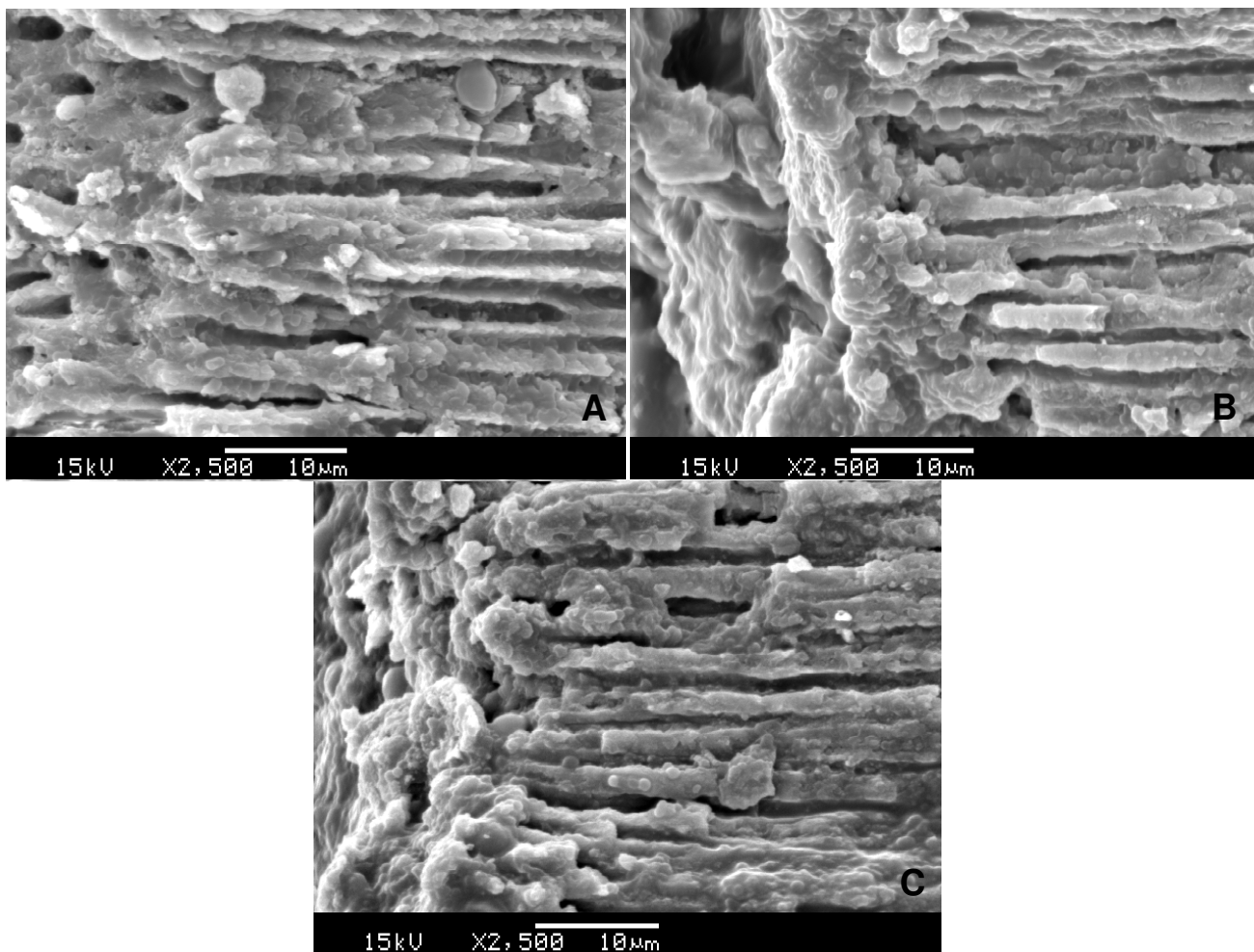


Figura 8 - Fotomicrografias em MEV (aumento de 2500x) para confirmação da contaminação de canais radiculares após 28 dias de inoculação com *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans*: A) terço cervical, B) terço médio, C) terço apical

5.1.2 Quantificação celular

Para realização da análise estatística, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, o qual tem por objetivo observar se as diferentes k amostras provêm da mesma população ou de populações idênticas em relação às médias. Este teste supõe que a variável tenha distribuição contínua e exige mensuração, no mínimo, em nível ordinal. Sendo assim, os dados foram classificados em escala ordinal, realizando-se comparações entre elas, considerando o nível de 5% de significância.

A análise dos resultados obtidos a partir da quantificação celular mostrou diferença estatística significativa (p-valor = $2,02 \times 10^{-09}$) entre os grupos (1 a 16), na metodologia de cultura, ao longo das 7 coletas e entre os microrganismos (Apêndice I).

Na análise dos grupos (1 a 16) em relação à coleta 1, foi possível verificar que houve diferença significativa entre os grupos, sendo calculado p-valor de $9,389 \times 10^{-16}$. Na análise dos grupos (1 a 16) em relação à coleta 2, houve diferença significativa (p-valor = 0,01518). Considerando a coleta 3, os grupos (1 a 16) diferiram significativamente entre si, apresentado p-valor de 0,04569. Considerando a coleta 4, observou-se diferença significativa entre os grupos (1 a 16) (p-valor de $5,606 \times 10^{-6}$). Considerando as coletas 5, 6 e 7, individualmente, houve diferença significativa entre os grupos (1 a 16), com p-valor de $1,887 \times 10^{-8}$, $2,391 \times 10^{-16}$ e $6,436 \times 10^{-8}$, respectivamente (Apêndice I).

Como se pode observar na tabela 2, onde estão representados os p-valores de cada uma das análises da metodologia de cultura, a análise das coletas dentro de cada grupo (exceto o grupo 5), individualmente, foi estatisticamente significativa. Pode-se observar também que há repetição dos p-valores, o que se deve ao fato de que nos grupos 11, 12, 13, 14 e 15, dentro da metodologia cultura, apenas a primeira coleta apresentou a variável resposta diferente de zero, sendo todas as demais nulas. Nota-se que nesta metodologia, apenas dentro do grupo 5 não houve diferença significativa entre as coletas. Como se considerou o nível de significância de 5%, há evidências suficientes para rejeitar as hipóteses nulas, ou seja, as coletas dentro dos grupos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 diferiram significativamente entre si.

Tabela 2 - Análise de comparação das coletas dentro dos 16 grupos de acordo com a metodologia de cultura (p-valor)

	Cultura
Coletas no grupo 1	0,0009118
Coletas no grupo 2	0,01246
Coletas no grupo 3	2,51 x 10 ⁻⁷
Coletas no grupo 4	0,006985
Coletas no grupo 5	0,2301 *ns
Coletas no grupo 6	0,001536
Coletas no grupo 7	0,0277
Coletas no grupo 8	2 x 10 ⁻¹⁶
Coletas no grupo 9	8 x 10 ⁻¹¹
Coletas no grupo 10	6,25 x 10 ⁻⁶
Coletas no grupo 11	2 x 10 ⁻¹⁶
Coletas no grupo 12	2 x 10 ⁻¹⁶
Coletas no grupo 13	2 x 10 ⁻¹⁶
Coletas no grupo 14	2 x 10 ⁻¹⁶
Coletas no grupo 15	2 x 10 ⁻¹⁶
Coletas no grupo 16	4,106 x 10 ⁻¹⁵

*ns – diferença não significativa; **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG 2%), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG 2%), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG 2%), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG 2%), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG 2%, EDTA, CLG 2%), **G10** (CLG 2%, EDTA, HC+CLG 2%), **G11** (CLG 2%, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG 2%, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG 2%), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG 2%), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)

Na análise do grupo 1 (PQM com SF, ausência de EDTA e ausência de MIC) (Apêndice I), na metodologia de cultura, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição de microrganismos na segunda coleta, aumento na terceira coleta, diminuição na quarta coleta, aumento na quinta coleta, diminuição na sexta coleta e aumento na sétima.

Na análise do grupo 2 (PQM com SF, presença de EDTA e MIC de CLG 2%) (Apêndice I), na metodologia de cultura, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição de microrganismos na segunda coleta, aumento na terceira coleta e diminuição na quarta coleta. Na quinta, sexta e sétima coletas observou-se ausência total de microrganismos.

Na análise do grupo 3 (PQM com SF, presença de EDTA e medicação de HC + CLG 2%) (Apêndice I), na metodologia de cultura, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição de microrganismos na segunda coleta, aumento na terceira coleta, diminuição na quarta, quinta e sexta coletas e aumento na sétima.

Na análise do grupo 4 (PQM com SF, presença de EDTA e MIC de HC + SF) (Apêndice I), na metodologia de cultura, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição de microrganismos na segunda coleta, aumento na terceira coleta e diminuição na quarta coleta. Na quinta, sexta e sétima coletas observou-se ausência total de microrganismos.

Na análise do grupo 5 (PQM com NaOCl 5,25%, presença de EDTA e MIC de CLG 2%) (Apêndice I), na metodologia de cultura, considerando a correlação entre as 7 coletas, não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve ausência total de microrganismos na segunda coleta, aumento na terceira coleta e ausência total na quarta, quinta, sexta e sétima coletas.

Na análise do grupo 6 (PQM com NaOCl 5,25%, presença de EDTA e MIC de HC + CLG 2%) (Apêndice I), na metodologia de cultura, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve ausência total de microrganismos na segunda coleta, aumento na terceira coleta e ausência total na quarta, quinta, sexta e sétima coletas.

Na análise do grupo 7 (PQM com NaOCl 5,25%, presença de EDTA e MIC de HC + SF) (Apêndice I), na metodologia de cultura, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve ausência total de microrganismos na segunda coleta, aumento na terceira coleta e ausência total na quarta, quinta, sexta e sétima coletas.

Na análise do grupo 8 (PQM com NaOCl 5,25%, ausência de EDTA e ausência de MIC) (Apêndice I), na metodologia de cultura, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve ausência total de microrganismos na segunda coleta, aumento na terceira coleta e ausência total na quarta, quinta, sexta e sétima coletas.

Na análise do grupo 9 (PQM com CLG 2%, presença de EDTA e MIC de CLG 2%) (Apêndice I), na metodologia de cultura, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve ausência total de microrganismos na segunda coleta, aumento na terceira coleta (presença de microrganismos em 10% dos espécimes) e ausência total na quarta, quinta, sexta e sétima coletas.

Na análise do grupo 10 (PQM com CLG 2%, presença de EDTA e MIC de HC + CLG 2%) (Apêndice I), na metodologia de cultura, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve ausência total de microrganismos na segunda coleta, aumento na terceira coleta (presença de microrganismos em 6,6% dos espécimes) e ausência total na quarta, quinta, sexta e sétima coletas.

Na análise do grupo 11 (PQM com CLG 2%, presença de EDTA e MIC de HC + SF) (Apêndice I), na metodologia de cultura, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve ausência total de microrganismos na segunda, terceira, quarta, quinta, sexta e sétima coletas.

Na análise do grupo 12 (PQM com CLG 2%, ausência de EDTA e ausência de MIC) (Apêndice I), na metodologia de cultura, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve ausência total de microrganismos na segunda, terceira, quarta, quinta, sexta e sétima coletas.

Na análise do grupo 13 (PQM com NaOCl 5,25% seguido de irrigação com CLL 2%, presença de EDTA e MIC de CLG 2%) (Apêndice I), na metodologia de cultura, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve ausência total de microrganismos na segunda, terceira, quarta, quinta, sexta e sétima coletas.

Na análise do grupo 14 (PQM com NaOCl 5,25% seguido de irrigação com CLL 2%, presença de EDTA e MIC de HC + CLG 2%) (Apêndice I), na metodologia de cultura, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve ausência total de microrganismos na segunda, terceira, quarta, quinta, sexta e sétima coletas.

Na análise do grupo 15 (PQM com NaOCl 5,25% seguido de irrigação com CLL 2%, presença de EDTA e MIC de HC + SF) (Apêndice I), na metodologia de cultura, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve ausência total de microrganismos na segunda, terceira, quarta, quinta, sexta e sétima coletas.

Na análise do grupo 16 (PQM com NaOCl 5,25% seguido de irrigação com CLL 2%, ausência de EDTA e ausência de MIC) (Apêndice I), na metodologia de cultura, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve ausência total de microrganismos na segunda, terceira, quarta, quinta, sexta e sétima coletas.

Estas e demais correlações, considerando a análise dos grupos, podem ser observadas no Apêndice I.

5.2 Análise microbiológica molecular

A análise microbiológica molecular pelo método de PCR convencional demonstrou presença de DNA de *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans* em todos os espécimes testados em relação a todas as coletas, SQA e MIC utilizadas.

Considerando a comparação entre os grupos (1 a 16), entre os microrganismos e entre as 7 coletas dentro do mesmo grupo, não houve diferença estatística significativa nesta metodologia (Figura 9).

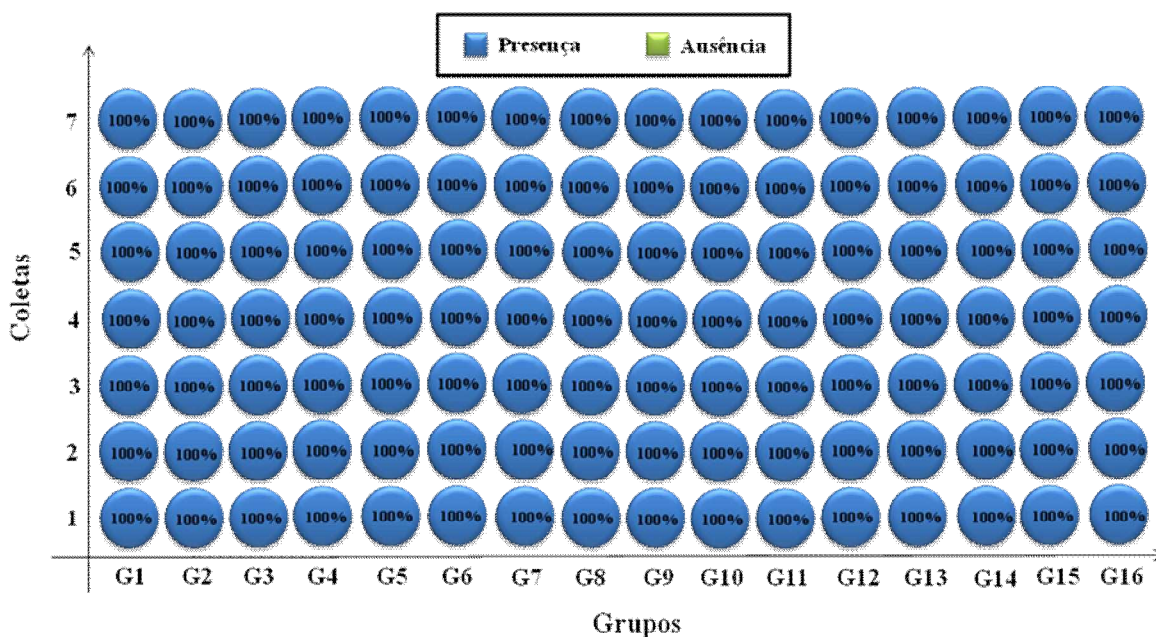


Figura 9 - Resultado da metodologia de PCR, considerando todos os grupos, microrganismos e coletas. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG 2%), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG 2%), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG 2%, EDTA, CLG 2%), **G10** (CLG 2%, EDTA, HC+CLG 2%), **G11** (CLG 2%, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG 2%, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG 2%), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG 2%), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)

5.3 Análise microbiológica por microscopia confocal

5.3.1 Fotomicrografias representativas

As fotomicrografias representativas da análise microbiológica por meio de microscopia confocal estão apresentadas no Apêndice II.

5.3.2 Análise dos dados

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* SAS (SAS Institute Inc., version 9.0; Cary, NC, EUA), aplicando nível de significância de 5%. Os dados que não assumiram padrão de distribuição normal de erros foram transformados, como sugerido pelo *software*. A comparação dos dados de quantificação de células, após PQM imediato ou após diferentes períodos de MIC, foi realizada por meio de análise de variância a um critério, seguido de teste de Tukey (fator de estudo: tratamento). A análise dos dados de quantificação de células, referente ao PQM imediato, foi realizada utilizando análise de variância a um critério, seguido de teste de Tukey (fator de estudo: tratamento). A análise dos dados de quantificação de células, referente aos tratamentos com MIC, foi realizada utilizando análise de variância a dois critérios, seguido de teste de Tukey (fatores de estudo: tratamento e tempo de medicação).

Comparando-se todas as SQA e MIC, o número de células viáveis diminuiu entre os grupos imediato e após 7, 14 e 30 dias de MIC, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$), encontrando-se menor número de células viáveis no grupo de medicação após 30 dias (Figura 10).

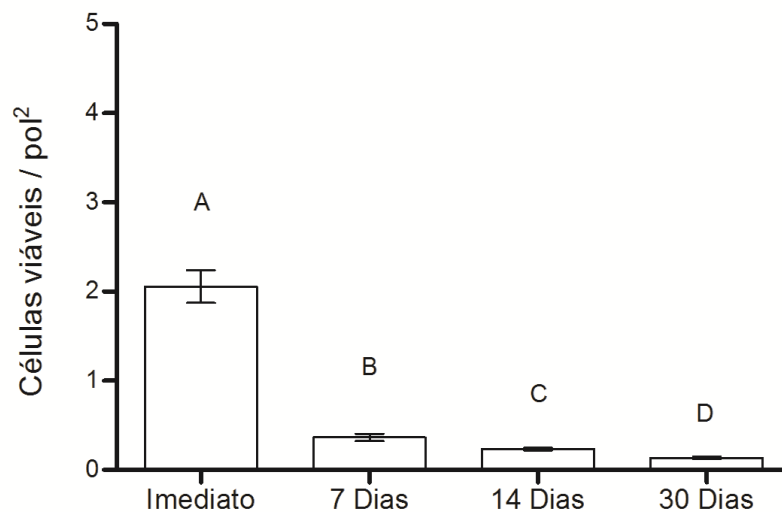


Figura 10 - Quantificação de células viáveis após PQM imediato e diferentes períodos de MIC, obtida por análise computadorizada (células/pol²). Letras distintas indicam diferença estatística significativa. ANOVA a um critério, Tukey, $p < 0,05$

Comparando-se todas as SQA e MIC, o número de células não viáveis diminuiu entre os grupos imediato e após 7 e 14 dias de MIC, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Após 30 dias de MIC, o número de células não viáveis mostrou discreto aumento, entretanto, não diferiu estatisticamente dos grupos de 7 e 14 dias de MIC ($p > 0,05$) (Figura 11).

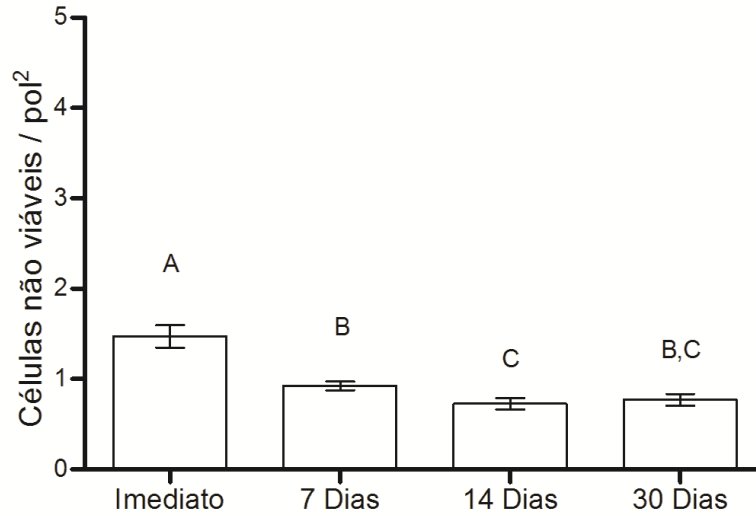


Figura 11 - Quantificação de células não viáveis após PQM imediato e diferentes períodos de MIC, obtida por análise computadorizada (células/pol²). Letras distintas indicam diferença estatística significativa. ANOVA a um critério, Tukey, $p < 0,05$

Comparando-se todas as SQA e MIC, o número de células totais (viáveis e não viáveis) diminuiu entre os grupos imediato e após 7 e 14 dias de medicação, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Entre 14 e 30 dias de MIC, houve discreta diminuição do número de células, sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$) (Figura 12).

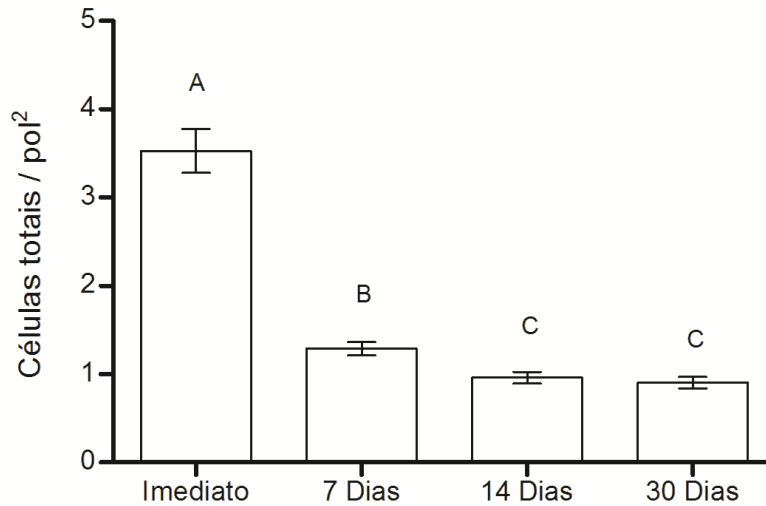


Figura 12 - Quantificação de células totais após PQM imediato e diferentes períodos de MIC, obtida por análise computadorizada (células/pol²). Letras distintas indicam diferença estatística significativa. ANOVA a um critério, Tukey, $p < 0,05$

Após PQM com SF, o número de células viáveis diminuiu entre os grupos imediato e após 7 e 14 dias de medicação, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Entre 14 e 30 dias de MIC, houve discreta diminuição do número de células viáveis, sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$) (Figura 13). O número de células não viáveis diminuiu entre os grupos imediato e após 7 dias de medicação, sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Entre 7 e 14 dias de MIC houve diminuição do número de células não viáveis, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Entre 14 e 30 dias de MIC, o número de células não viáveis mostrou discreto aumento, sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$) (Figura 13) (Apêndice II).

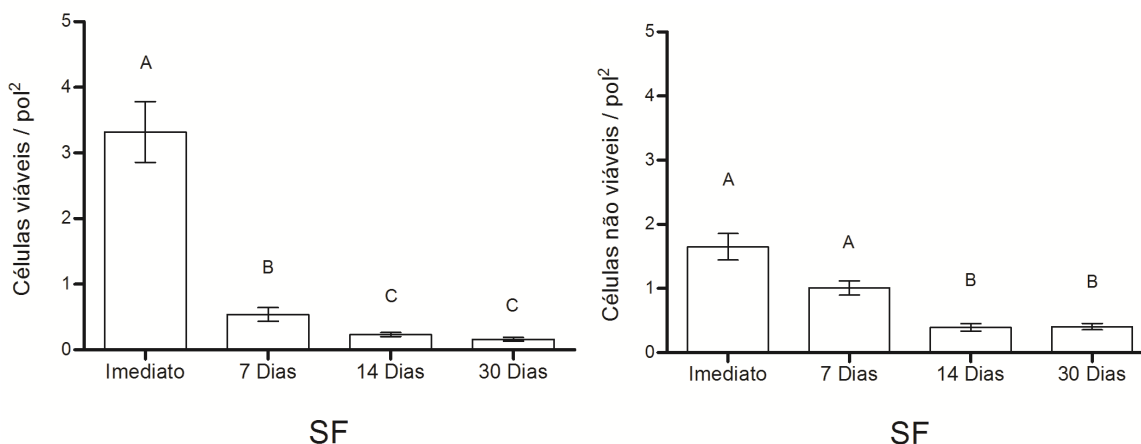


Figura 13 - Quantificação de células viáveis e não viáveis após PQM imediato com SF e após diferentes períodos de MIC, obtida por análise computadorizada (células/pol²). Letras distintas indicam diferença estatística significativa. ANOVA a um critério, Tukey, $p < 0,05$

Na comparação entre os grupos de SF com ou sem EDTA 17%, sem a utilização de MIC, houve diminuição tanto de células viáveis quanto de células não viáveis no grupo com EDTA 17%.

Na comparação entre os grupos de SF com ou sem EDTA 17%, com a utilização de diferentes protocolos de MIC, houve maior redução de células viáveis no protocolo de EDTA 17% seguido de medicação de HC + CLG 2% após 30 dias.

Na comparação entre os grupos de SF com ou sem EDTA 17%, com a utilização de diferentes protocolos de MIC, houve maior redução de células não viáveis no protocolo de EDTA 17% seguido de medicação de CLG 2% após 30 dias.

Na comparação entre os grupos de SF com ou sem EDTA 17%, com a utilização de diferentes protocolos de MIC, houve maior redução de células totais no protocolo de EDTA 17% seguido de medicação de CLG 2% após 30 dias.

Após PQM com CLG 2%, o número de células viáveis diminuiu entre os grupos imediato e após 7 dias de MIC, ocorrendo discreto aumento após 14 dias de medicação, e diminuição após 30 dias de medicação, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (Figura 14). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de 7 e 14 dias após medicação ($p > 0,05$). O número de células não viáveis diminuiu entre os grupos

imediate e após 7, 14 e 30 dias de MIC, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Entre os grupos imediato e de 7 dias de medicação e entre os grupos de 14 e 30 dias de medicação não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) (Figura 14) (Apêndice II).

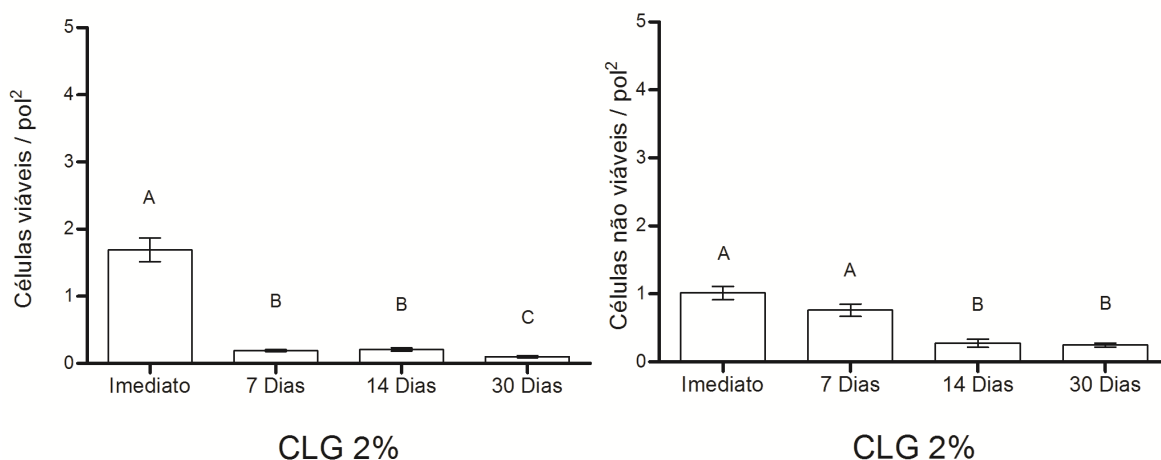


Figura 14 - Quantificação de células viáveis e não viáveis após PQM imediato com CLG 2% e após diferentes períodos de MIC, obtida por análise computadorizada (células/pol²). Letras distintas indicam diferença estatística significativa. ANOVA a um critério, Tukey, $p < 0,05$

Na comparação entre os grupos de CLG 2%, com ou sem EDTA 17%, sem a utilização de MIC, houve diminuição de células viáveis e discreto aumento de células não viáveis no grupo com EDTA 17%.

Na comparação entre os grupos de CLG 2%, com a utilização de diferentes protocolos de MIC, houve maior redução de células viáveis no protocolo de medicação de HC + CLG 2% após 30 dias.

Na comparação entre os grupos de CLG 2%, com a utilização de diferentes protocolos de MIC, houve maior redução de células não viáveis no protocolo de medicação de CLG 2% após 30 dias.

Na comparação entre os grupos de CLG 2%, com a utilização de diferentes protocolos de MIC, houve maior redução de células totais no protocolo de medicação de HC + SF após 30 dias.

Após PQM com NaOCl 5,25%, o número de células viáveis diminuiu entre os grupos imediato e após 7, 14 e 30 dias de MIC, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (Figura 15). Entre os grupos de 7 e 14 dias de medicação não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$). O número de células não viáveis diminuiu entre os grupos imediato e após 7 dias de medicação, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Observou-se aumento de células não viáveis após 14 e 30 dias de MIC, sem diferença estatística significativa entre esses grupos ($p > 0,05$) (Figura 15) (Apêndice II).

Após PQM com NaOCl 5,25% seguido de irrigação com CLL 2%, o número de células viáveis diminuiu entre os grupos imediato e após 7, 14 e 30 dias de MIC, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (Figura 15). Entre os grupos de 7 e 14 dias de medicação não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$). O número de células não viáveis diminuiu entre os grupos imediato e após 7 dias de medicação, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Observou-se aumento de células não viáveis após 14 e 30 dias de MIC, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (Figura 15) (Apêndice II).

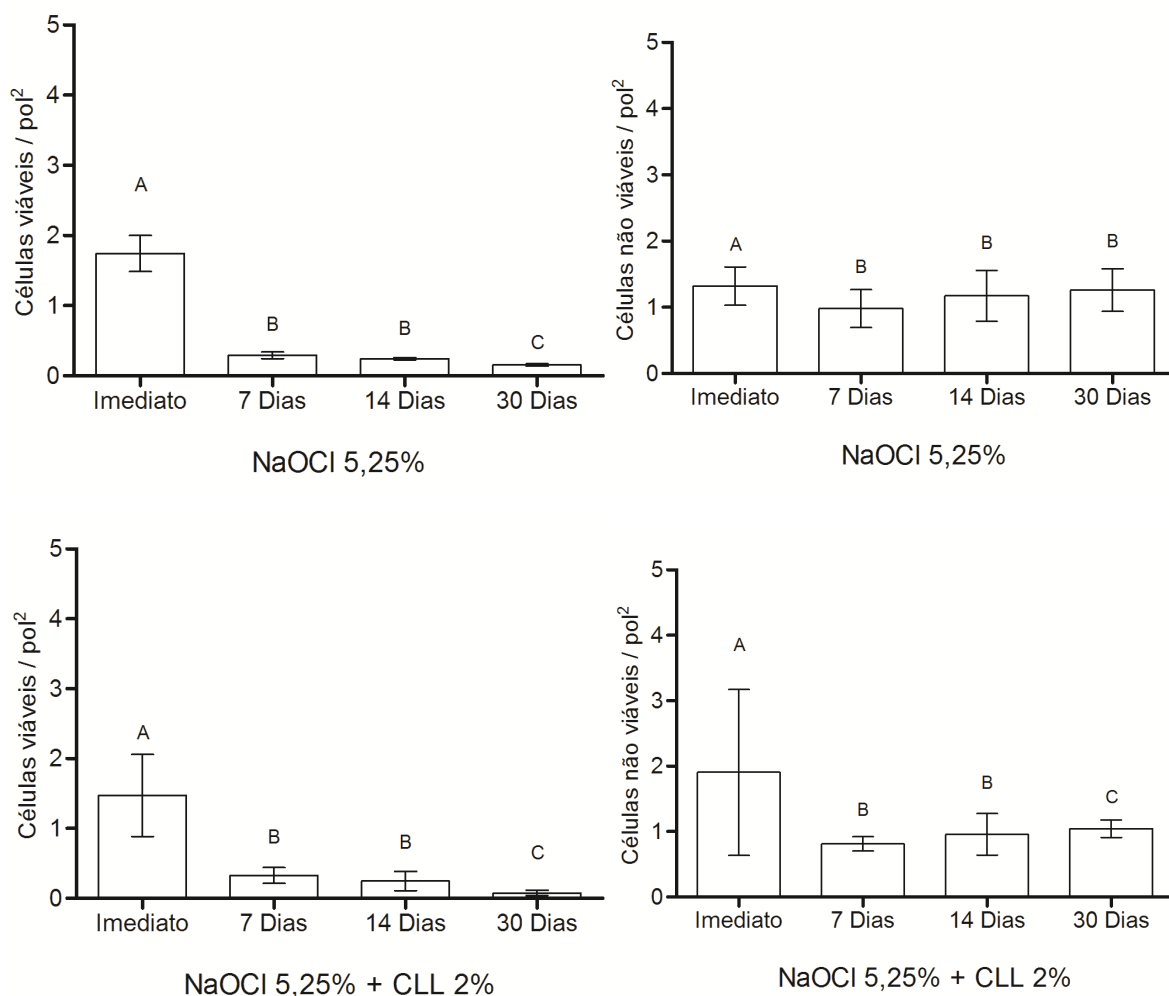


Figura 15 - Quantificação de células viáveis e não viáveis após PQM imediato com NaOCl 5,25% e NaOCl 5,25% seguido de CLL 2% e após diferentes períodos de MIC, obtido por análise computadorizada (células/pol²). Letras distintas indicam diferença estatística significante. ANOVA a um critério, Tukey, $p < 0,05$

Na comparação entre os grupos de NaOCl 5,25%, com ou sem EDTA 17%, sem a utilização de MIC, houve diminuição de células viáveis e discreto aumento de células não viáveis no grupo com EDTA 17%.

Na comparação entre os grupos de NaOCl 5,25%, com a utilização de diferentes protocolos de MIC, houve maior redução de células viáveis no protocolo de medicação de CLL 2% após 30 dias.

Na comparação entre os grupos de NaOCl 5,25%, com a utilização de diferentes protocolos de MIC, houve maior redução de células não viáveis no protocolo de medicação de HC + SF após 30 dias.

Na comparação entre os grupos de NaOCl 5,25%, com a utilização de diferentes protocolos de MIC, houve maior redução de células totais no protocolo de medicação de HC + SF após 30 dias.

Na comparação entre os grupos de NaOCl 5,25% seguido de irrigação final com CLL 2%, com ou sem EDTA 17%, sem a utilização de MIC, houve aumento tanto de células viáveis quanto não viáveis no grupo com utilização de EDTA 17%.

Na comparação entre os grupos de NaOCl 5,25% seguido de irrigação final com CLL 2%, com a utilização de diferentes protocolos de MIC, houve redução de células viáveis no protocolo de medicação de HC + CLG 2% após 30 dias.

Na comparação entre os grupos de NaOCl 5,25% seguido de irrigação final com CLL 2%, com a utilização de diferentes protocolos de MIC, houve redução de células não viáveis no protocolo de medicação de CLG 2% após 30 dias.

Na comparação entre os grupos de NaOCl 5,25% seguido de irrigação final com CLL 2%, com a utilização de diferentes protocolos de MIC, houve redução de células totais no protocolo de medicação de HC + SF após 30 dias. Demais correlações podem ser observadas nas Tabelas 3 a 6.

Tabela 3 - Quantificação de células viáveis, não viáveis e totais nos grupos, considerando PQM imediato, obtida por análise computadorizada (células/in², média ± desvio-padrão, n= 6)

SQA	EDTA 17%	Viáveis	Não viáveis	Totais
Controle (sem PQM)	-	8,03 ± 0,85 A	2,56 ± 0,47 A	10,59 ± 0,88 A
SF	-	4,24 ± 0,84 B	2,08 ± 0,36 A,B	6,32 ± 1,11 B
SF	+	2,71 ± 0,94 C	1,22 ± 0,59 B	3,93 ± 1,51C
CLG 2%	-	1,80 ± 0,69 D	0,97 ± 0,37 B	2,77 ± 1,02 C
CLG 2%	+	1,58 ± 0,45 D	1,05 ± 0,26 B	2,63 ± 0,66 C
NaOCl 5,25%	-	2,17 ± 0,93D,C	1,27 ± 0,36 B	3,44 ± 1,12 C
NaOCl 5,25% + CLL 2%	-	1,38 ± 0,62 D	1,02 ± 0,50 B	2,40 ± 1,00 C
NaOCl 5,25%	+	1,32 ± 0,60 D	1,37 ± 0,23 B	2,69 ± 0,65 C
NaOCl 5,25% + CLL 2%	+	1,57 ± 0,61 D	2,79 ± 1,18 A	4,36 ± 1,53B,C

Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre os grupos. ANOVA a um critério, Tukey, p< 0,05

Tabela 4 - Quantificação de células viáveis nos grupos, considerando MIC em diferentes tempos, obtida por análise computadorizada (células/in², média ± desvio-padrão, n= 6)

SQA	EDTA 17%	MIC	7 Dias	14 Dias	30 Dias
SF	-	CLG 2%	1,05 ± 0,18 A,a	0,44 ± 0,08 B,a	0,46 ± 0,09 B,a
SF	-	HC + SF	0,98 ± 0,22 A,a	0,54 ± 0,12 B,a	0,39 ± 0,05 B,a
SF	-	HC + CLG 2%	0,52 ± 0,17 A,b	0,19 ± 0,05 B,b,c	0,12 ± 0,03 B,b
SF	+	HC + SF	0,20 ± 0,13 A,c	0,19 ± 0,03 A,b,c	0,08 ± 0,03 B,b
SF	+	CLG 2%	0,38 ± 0,15 A,b,c	0,18 ± 0,06 B,b,c	0,09 ± 0,04 B,b
SF	+	HC + CLG 2%	0,40 ± 0,08 A,b,c	0,10 ± 0,03 B,b	0,07 ± 0,04 B,b
CLG 2%	+	CLG 2%	0,16 ± 0,03 A,c	0,20 ± 0,06 A,b,c	0,14 ± 0,04 A,b
CLG 2%	+	HC + SF	0,18 ± 0,05 A,c	0,12 ± 0,08 A,b,c	0,09 ± 0,03 A,b
CLG 2%	+	HC + CLG 2%	0,22 ± 0,04 A,c	0,21 ± 0,05 A,c	0,06 ± 0,02 B,b
NaOCl 5,25%	+	CLG 2%	0,16 ± 0,06 A,B,c	0,22 ± 0,07 A,c	0,12 ± 0,03 B,b
NaOCl 5,25%	+	HC + SF	0,17 ± 0,12 A,d,c	0,26 ± 0,05 A,c	0,15 ± 0,07 A,b
NaOCl 5,25%	+	HC + CLG 2%	0,59 ± 0,09 A,b	0,26 ± 0,10 B,c	0,14 ± 0,04 B,b
NaOCl 5,25% + CLL 2%	+	HC + SF	0,24 ± 0,07 A,c	0,14 ± 0,07 A,B,b,c	0,10 ± 0,04 B,b
NaOCl 5,25% + CLL 2%	+	CLG 2%	0,28 ± 0,08 A,c	0,16 ± 0,09 A,b,c	0,08 ± 0,03 B,b
NaOCl 5,25% + CLL 2%	+	HC + CLG 2%	0,41 ± 0,17 A,b,c	0,25 ± 0,03 B,c	0,06 ± 0,03 B,b

Letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tempos de medicação. Letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre os grupos. ANOVA a dois critérios, Tukey, p < 0,05

Tabela 5 - Quantificação de células não viáveis nos grupos, considerando MIC em diferentes tempos, obtida por análise computadorizada (células/in², média ± desvio-padrão, n= 6)

SQA	EDTA 17%	MIC	7 Dias	14 Dias	30 Dias
SF	-	CLG 2%	1,47 ± 0,20 A,a	0,36 ± 0,05 B,a	0,43 ± 0,12 B,a,b
SF	-	HC + SF	1,11 ± 0,11 A,b	0,40 ± 0,08 B,a	0,35 ± 0,11 B,a,b
SF	-	HC + CLG 2%	1,02 ± 0,16 A,b	0,78 ± 0,10 B,b	0,73 ± 0,12 B,a
SF	+	HC + SF	0,57 ± 0,21 A,c	0,25 ± 0,18 B,a	0,21 ± 0,08 B,b
SF	+	CLG 2%	0,53 ± 0,18 A,c	0,29 ± 0,15 B,a	0,19 ± 0,07 B,b
SF	+	HC + CLG 2%	0,77 ± 0,25 A,c,d	0,29 ± 0,10 B,a	0,25 ± 0,07 B,b
CLG 2%	+	CLG 2%	0,52 ± 0,08 A,c	0,33 ± 0,16 B,a	0,18 ± 0,06 B,b
CLG 2%	+	HC + SF	0,55 ± 0,07 A,c	0,35 ± 0,12 B,a	0,19 ± 0,09 B,b
CLG 2%	+	HC + CLG 2%	0,91 ± 0,18 A,a,b	0,22 ± 0,10 B,a	0,32 ± 0,05 B,b
NaOCl 5,25%	+	CLG 2%	0,92 ± 0,17 A,a,b	1,21 ± 0,28 A,c	1,29 ± 0,37 A,c
NaOCl 5,25%	+	HC + SF	1,26 ± 0,28 A,a,b	1,46 ± 0,47 A,c	1,10 ± 0,13 A,c
NaOCl 5,25%	+	HC + CLG 2%	1,13 ± 0,16 A,a,b	0,80 ± 0,20 A,b,c	1,35 ± 0,36 A,c
NaOCl 5,25% + CLL 2%	+	HC + SF	0,76 ± 0,12 A,b,d	0,70 ± 0,05 A,b	0,99 ± 0,12 A,c
NaOCl 5,25% + CLL 2%	+	CLG 2%	0,79 ± 0,15 A,b,d	0,65 ± 0,06 A,b	0,72 ± 0,15 A,c
NaOCl 5,25% + CLL 2%	+	HC+ CLG 2%	0,87 ± 0,07 A,b,d	1,22 ± 0,23 A,c	1,10 ± 0,13 A,c

Letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tempos de medicação. Letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre os grupos. ANOVA a dois critérios, Tukey, p< 0,05

Tabela 6 - Quantificação de células totais nos grupos, considerando MIC em diferentes tempos, obtida por análise computadorizada (células/in², média ± desvio-padrão, n= 6)

SQA	EDTA 17%	MIC	7 Dias	14 Dias	30 Dias
SF	-	CLG 2%	2,52 ± 0,84A,a	0,80 ± 0,11B,a	0,89 ± 0,16B,a
SF	-	HC + SF	2,09 ± 0,56 A,a	0,94 ± 0,25 B,a	0,74 ± 0,18 B,a
SF	-	HC+ CLG 2%	1,54 ± 0,22A,b	0,97 ± 0,24B,a	0,85 ± 0,13B,a
SF	+	HC + SF	0,77 ± 0,19A,c	0,44 ± 0,13B,b	0,29 ± 0,15B,b
SF	+	CLG 2%	0,91 ± 0,22 A,c,d	0,47 ± 0,15 B,b	0,28 ± 0,12 B,b
SF	+	HC+ CLG 2%	1,17 ± 0,28A,c,d	0,39 ± 0,12B,b	0,32 ± 0,06B,b
CLG 2%	+	CLG 2%	0,68 ± 0,09A,c	0,53 ± 0,31B,b	0,32 ± 0,03B,b
CLG 2%	+	HC + SF	0,73 ± 0,15 A,c	0,47 ± 0,21 B,b	0,28 ± 0,04 B,b
CLG 2%	+	HC+ CLG 2%	1,13 ± 0,05 A,d	0,43 ± 0,13B,b	0,38 ± 0,04B,b
NaOCl 5,25%	+	CLG 2%	1,08 ± 0,16A,d	1,43 ± 0,26A,c	1,41 ± 0,39A,c
NaOCl 5,25%	+	HC + SF	1,43 ± 0,13A,d	1,72 ± 0,48A,c	1,25 ± 0,13A,c
NaOCl 5,25%	+	HC+ CLG 2%	1,72 ± 0,09A,b	1,06 ± 0,17A,a,c	1,49 ± 0,35A,c
NaOCl 5,25% + CLL 2%	+	CLG 2%	1,00 ± 0,11 A,d	0,84 ± 0,22 A,a	1,09 ± 0,11 A,a,c
NaOCl 5,25% + CLL 2%	+	HC + SF	1,00 ± 0,06A,d	0,83 ± 0,08A,a	1,07 ± 0,10A,a,c
NaOCl 5,25% + CLL 2%	+	HC+ CLG 2%	1,28 ± 0,08A,d	1,47 ± 0,21A,c	1,16 ± 0,13A,a,c

Letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tempos de medicação. Letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre os grupos. ANOVA a dois critérios, Tukey, p < 0,05

5.4 Quantificação de endotoxina de *E. coli*

A análise dos resultados da metodologia de quantificação de endotoxina entre os grupos (1 a 16) demonstrou diferença estatística significativa (p-valor = 0,0001093) (Apêndice III).

A análise entre as 7 coletas dentro de cada um dos 16 grupos, individualmente, demonstrou diferença estatística significativa na maioria das análises (grupos 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16), exceto nos grupos 2 e 3 que apresentaram p-valores de 0,2798 e 0,08539, respectivamente.

Na análise entre os grupos, em relação às coletas 1 e 2 (Apêndice III) não foi observada diferença estatística significativa, sendo calculado p-valor de 0,3232 e 0,6717, respectivamente. Na análise entre grupos, em relação à coleta 3 (Apêndice III) foi possível verificar que houve diferença significativa entre os grupos, sendo calculado p-valor de $3,589 \times 10^{-5}$. No grupo 4 (Apêndice III) não foi observada diferença estatística significativa, sendo calculado p-valor de 0,05458. Ainda na análise entre grupos, em relação às coletas 5, 6 e 7 (Apêndice III), foi possível verificar que houve diferença significativa entre os grupos, sendo calculado p-valor de 0,003026, $8,664 \times 10^{-5}$ e $3,939 \times 10^{-7}$, respectivamente.

Na análise do grupo 1 (PQM com SF, ausência de EDTA e ausência de MIC) (Apêndice III), na metodologia de quantificação de endotoxina, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição do conteúdo de endotoxina na segunda coleta, aumento na terceira coleta, diminuição na quarta coleta, aumento na quinta coleta, diminuição na sexta coleta e aumento na sétima.

Na análise do grupo 2 (PQM com SF, presença de EDTA e MIC de CLG) (Apêndice III), na metodologia de quantificação de endotoxina, considerando a correlação entre as 7 coletas, não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição do conteúdo de endotoxina na segunda coleta, aumento na terceira coleta, diminuição na quarta, quinta e sexta coletas e aumento na sétima.

Na análise do grupo 3 (PQM com SF, presença de EDTA e medicação de HC + CLG 2%) (Apêndice III), na metodologia de quantificação de endotoxina, considerando a correlação entre as 7 coletas, não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição do conteúdo de endotoxina na segunda coleta, aumento na terceira coleta e diminuição na quarta, quinta, sexta e sétima coletas.

Na análise do grupo 4 (PQM com SF, presença de EDTA e MIC de HC + SF) (Apêndice III), na metodologia de quantificação de endotoxina, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve redução do conteúdo de endotoxina na segunda, terceira e quarta coletas. Na quinta, sexta e sétima coletas, observou-se aumento do conteúdo de endotoxina.

Na análise do grupo 5 (PQM com NaOCl 5,25%, presença de EDTA e MIC de CLG 2%) (Apêndice III), na metodologia de quantificação de endotoxina, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição do conteúdo de endotoxina na segunda coleta, aumento na terceira, diminuição na quarta, quinta e sexta e aumento na sétima coleta.

Na análise do grupo 6 (PQM com NaOCl 5,25%, presença de EDTA e MIC de HC + CLG 2%) (Apêndice III), na metodologia de quantificação de endotoxina, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve redução do conteúdo de endotoxina na segunda coleta, aumento na terceira coleta, diminuição na quarta, aumento na quinta e sexta e diminuição na sétima coleta.

Na análise do grupo 7 (PQM com NaOCl 5,25%, presença de EDTA e MIC de HC + SF) (Apêndice III), na metodologia de quantificação de endotoxina, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição do conteúdo de endotoxina na segunda coleta, aumento na terceira coleta, diminuição na

quarta e quinta, aumento na sexta e a sétima manteve-se com nível de endotoxina similar à sexta coleta.

Na análise do grupo 8 (PQM com NaOCl 5,25%, ausência de EDTA e ausência de MIC) (Apêndice III), na metodologia de quantificação de endotoxina, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição do conteúdo de endotoxina na segunda, terceira, quarta e quinta coletas, na sexta e sétima coletas houve aumento.

Na análise do grupo 9 (PQM com CLG 2%, presença de EDTA e MIC de CLG 2%) (Apêndice III), na metodologia de quantificação de endotoxina, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição do conteúdo de endotoxina na segunda coleta, aumento na terceira, diminuição na quarta, aumento na quinta, diminuição na sexta e aumento na sétima coleta.

Na análise do grupo 10 (PQM com CLG 2%, presença de EDTA e MIC de HC + CLG 2%) (Apêndice III), na metodologia de quantificação de endotoxina, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição do conteúdo de endotoxina na segunda coleta, aumento na terceira, diminuição na quarta e aumento na quinta, sexta e sétima coletas.

Na análise do grupo 11 (PQM com CLG 2%, presença de EDTA e MIC de HC + SF) (Apêndice III), na metodologia de quantificação de endotoxina, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição do conteúdo de endotoxina na segunda, aumento na terceira, diminuição na quarta, aumento na quinta, diminuição na sexta e aumento na sétima coleta.

Na análise do grupo 12 (PQM com CLG 2%, ausência de EDTA e ausência de MIC) (Apêndice III), na metodologia de quantificação de endotoxina, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição do

conteúdo de endotoxina na segunda coleta, aumento na terceira, diminuição na quarta, aumento na quinta, diminuição na sexta e aumento na sétima coleta.

Na análise do grupo 13 (PQM com NaOCl 5,25% seguido de irrigação com CLL 2%, presença de EDTA e MIC de CLG 2%) (Apêndice III), na metodologia de quantificação de endotoxina, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição do conteúdo de endotoxina na segunda, terceira e quarta coletas, aumento na quinta, diminuição na sexta e aumento na sétima coleta.

Na análise do grupo 14 (PQM com NaOCl 5,25% seguido de irrigação com CLL 2%, presença de EDTA e MIC de HC + CLG 2%) (Apêndice III), na metodologia de quantificação de endotoxina, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição do conteúdo de endotoxina na segunda coleta, aumento na terceira, diminuição na quarta, quinta e sexta e aumento na sétima coleta.

Na análise do grupo 15 (PQM com NaOCl 5,25% seguido de irrigação com CLL 2%, presença de EDTA e MIC de HC + SF) (Apêndice III), na metodologia de quantificação de endotoxina, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição do conteúdo de endotoxina na segunda coleta, aumento na terceira, diminuição na quarta, quinta e sexta e aumento na sétima coleta.

Na análise do grupo 16 (PQM com NaOCl 5,25% seguido de irrigação com CLL 2%, ausência de EDTA e ausência de MIC) (Apêndice III), na metodologia de quantificação de endotoxina, considerando a correlação entre as 7 coletas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Na correlação entre as coletas, neste grupo, em relação à primeira coleta, houve diminuição do conteúdo de endotoxina na segunda coleta, aumento na terceira, diminuição na quarta, aumento na quinta, sexta e sétima coletas.

5.5 Análises microbiológica clássica, molecular e de quantificação de endotoxina

Na análise de comparação entre as metodologias de cultura, endotoxina e PCR, verificou-se p-valor de $2,2 \times 10^{-16}$, o qual mostrou diferença estatística significativa. Com isso, fez-se necessário realizar o desdobramento desta análise, sendo, para tanto, realizada uma análise para cada metodologia, separadamente (Tabela 7), onde foram consideradas as variáveis: dezesseis grupos, três microrganismos e sete coletas.

Houve diferença significativa entre os grupos dentro das metodologias de cultura (p-valor = $2,02 \times 10^{-09}$) e endotoxina (p-valor = 0,0001093) (Tabela 7), sendo assim, foi realizado o desdobramento das análises por grupo, individualmente, dentro de cada uma dessas metodologias. Para a metodologia de PCR, a diferença não foi significativa.

Considerando as três metodologias (cultura, LAL e PCR), não foi observada diferença significativa nas metodologias de quantificação de endotoxina e PCR (Tabela 7), comprovando-se que a diferença detectada na análise conjunta foi devido aos grupos dentro da metodologia de cultura.

Em relação à análise entre os microrganismos testados, houve diferença significativa apenas na metodologia de cultura, com p-valor de $3,47 \times 10^{-14}$. Para a metodologia de PCR, a diferença não foi significativa. Foi possível verificar também que houve diferença significativa entre as coletas dentro das metodologias de cultura (p-valor = $2,2 \times 10^{-16}$) e endotoxina (p-valor $2,897 \times 10^{-15}$). Para a metodologia de PCR, a diferença não foi significativa.

Tabela 7 - Análise individual por metodologia considerando 16 grupos, 3 microrganismos e 7 coletas (p-valor)

	Grupo	Microrganismo	Coleta
Cultura	$2,02 \times 10^{-09}$	$3,47 \times 10^{-14}$	$2,2 \times 10^{-16}$
Endotoxina	0,0001093	-	$2,897 \times 10^{-15}$
PCR	*ns	*ns	*ns

*ns = diferença não significativa

5.5.1 Correlação entre coletas por grupo

A Tabela 8 apresenta os p-valores da análise entre coletas por grupo, considerando as metodologias de cultura, endotoxina e PCR. Dentro de cada grupo, separadamente, foram correlacionadas as sete coletas entre si. Esse desdobramento foi realizado devido ao resultado da análise entre os grupos ter demonstrado diferença significativa tanto entre grupos quanto entre coletas.

Tabela 8 - Análise de comparação das coletas dentro dos 16 grupos de acordo com cada metodologia (p-valor)

	Cultura	Endotoxina	PCR
Coletas no grupo 1	0,0009118	0,002466	*ns
Coletas no grupo 2	0,01246	0,2798 *ns	*ns
Coletas no grupo 3	$2,51 \times 10^{-7}$	0,08539 *ns	*ns
Coletas no grupo 4	0,006985	0,00356	*ns
Coletas no grupo 5	0,2301 *ns	0,01909	*ns
Coletas no grupo 6	0,001536	0,1584 *ns	*ns
Coletas no grupo 7	0,0277	$2,97 \times 10^{-7}$	*ns
Coletas no grupo 8	2×10^{-16}	$3,353 \times 10^{-11}$	*ns
Coletas no grupo 9	8×10^{-11}	$1,633 \times 10^{-6}$	*ns
Coletas no grupo 10	$6,25 \times 10^{-6}$	$4,823 \times 10^{-10}$	*ns
Coletas no grupo 11	2×10^{-16}	$5,404 \times 10^{-6}$	*ns
Coletas no grupo 12	2×10^{-16}	$1,402 \times 10^{-5}$	*ns
Coletas no grupo 13	2×10^{-16}	0,01078	*ns
Coletas no grupo 14	2×10^{-16}	0,0004732	*ns
Coletas no grupo 15	2×10^{-16}	0,002762	*ns
Coletas no grupo 16	$4,106 \times 10^{-15}$	0,000224	*ns

*ns – diferença não significativa; **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG 2%), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG 2%), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG 2%), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG 2%), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG 2%, EDTA, CLG 2%), **G10** (CLG 2%, EDTA, HC+CLG 2%), **G11** (CLG 2%, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG 2%, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG 2%), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG 2%), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)

5.5.2 Correlação entre grupos por coleta

Inicialmente, foi realizada uma análise considerando os grupos dentro de cada coleta, correlacionando as metodologias cultura, endotoxina e PCR entre si. As três metodologias em questão diferiram significativamente entre si. A análise dos grupos (1 a 16) em relação à coleta 1 e às três metodologias mostrou-se estatisticamente significativa (p-valor= $4,57 \times 10^{-14}$). Em relação à coleta 2, também foi significativa, com p-valor de 0,01557. Na coleta 3, não houve diferença significativa entre os grupos, sendo o p-valor de 0,050531. Na coleta 4, a diferença entre os grupos foi significativa, sendo p-valor de $1,204 \times 10^{-5}$. Na coleta 5, também foi possível verificar diferença significativa entre os grupos (p-valor= $6,915 \times 10^{-8}$). Na coleta 6, houve diferença significativa, com p-valor de $2,054 \times 10^{-14}$. Na coleta 7, também houve diferença significativa (p-valor de $2,433 \times 10^{-7}$).

Como na análise descrita acima foram consideradas as três metodologias em conjunto, demais análises foram realizadas a fim de correlacionar os grupos dentro de cada coleta, separando-as por metodologia (Tabela 9).

Tabela 9 - Comparação dos 16 grupos dentro de cada coleta, individualmente, considerando cada metodologia separadamente (p-valor)

	Cultura	Endotoxina	PCR
Grupos na coleta 1	$9,389 \times 10^{-16}$	0,3232 *ns	*ns
Grupos na coleta 2	0,01518	0,6717 *ns	*ns
Grupos na coleta 3	0,04569	$3,589 \times 10^{-5}$	*ns
Grupos na coleta 4	$5,606 \times 10^{-6}$	0,05458 *ns	*ns
Grupos na coleta 5	$1,887 \times 10^{-8}$	0,003026	*ns
Grupos na coleta 6	$2,391 \times 10^{-16}$	$8,664 \times 10^{-5}$	*ns
Grupos na coleta 7	$6,436 \times 10^{-8}$	$3,939 \times 10^{-7}$	*ns

*ns = diferença não significativa

6. DISCUSSÃO

6.1 Confirmação da contaminação

Na primeira coleta (confirmação do crescimento microbiano), em todos os grupos avaliados (1 a 16), foi observado crescimento de *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans* e presença de endotoxina de *E. coli* em todos os espécimes, confirmando o modelo de contaminação proposto por Molina (2008). Este modelo de contaminação baseia-se na associação destes três microrganismos, estabelecendo o período de contaminação de 28 dias para *E. coli* e 21 dias para *C. albicans* e *E. faecalis*.

Entretanto, no presente trabalho, após o período de 28 dias de contaminação, os espécimes foram ainda submetidos à pressão negativa por 20 minutos, a fim de promover maior penetração e conseqüente crescimento de microrganismos. Tal procedimento demonstrou, em estudo piloto, ser efetivo, quando comparado aos resultados de espécimes que não foram submetidos à pressão negativa.

6.2 Ação da solução fisiológica sobre microrganismos e endotoxina

No presente trabalho, por meio do método de cultura, observou-se que PQM com SF, na ausência ou presença de EDTA, foi efetivo na redução do conteúdo de microrganismos do canal radicular, entretanto, não foi capaz de eliminá-los. Quando a avaliação foi realizada por meio de microscopia confocal, observou-se que PQM com SF também promoveu redução de microrganismos nos túbulos dentinários. Por meio do método de PCR, observou-se presença de DNA dos microrganismos avaliados, em todos os espécimes testados, após PQM. Estes resultados demonstram que a utilização de uma SQA, mesmo biologicamente inerte, como a SF, associada à instrumentação e irrigação/aspiração efetivas dos canais radiculares, pode promover a redução de microrganismos. Estes resultados corroboram com aqueles encontrados por Ferraz *et al.* (2001), Menezes *et al.* (2004a), Gomes *et al.* (2008), Martinho *et al.* (2010a), Endo (2011) e Endo *et al.* (2012, 2013).

O instrumento endodôntico utilizado no presente trabalho, no preparo mecânico dos canais radiculares, foi o sistema rotatório *Mtwo*, o qual demonstra adequada capacidade de corte e excelente capacidade de remoção de debris dentinários, devido ao ângulo de corte positivo e à conformação de sua secção transversal, comprovado por diferentes autores (Foschi *et al.*, 2004; Schäfer *et al.*, 2006; Vahid *et al.*, 2009; Martinho *et al.*, 2010a).

Além disso, com a sequência de limas rotatórias utilizada no presente trabalho obteve-se diâmetro apical referente à lima #30. Esse diâmetro anatômico do canal radicular promove ampliação suficiente para possibilitar a chegada da SQA no terço apical (Foschi *et al.*, 2004; Usman *et al.*, 2004).

Observou-se também, em avaliação por microscopia confocal, uma maior redução do conteúdo de microrganismos nos túbulos dentinários quando, no PQM com SF, associou-se EDTA 17%, comparado ao protocolo onde EDTA 17% não foi utilizado. Este resultado pode estar associado à utilização deste agente quelante, o qual promoveu remoção da *smear layer* e aumento da permeabilidade dentinária, facilitando a atuação da SQA nos túbulos dentinários. Segundo Love (1996) e Buck *et al.* (2001), *smear layer* atua como uma barreira física, reduzindo a ação das SQA, soluções irrigadoras e MIC nos túbulos dentinários.

Por meio do método de cultura, observou-se que logo após PQM com SF, a qual não possui atividade antimicrobiana, os microrganismos, que sobreviveram à instrumentação e irrigação, recontaminaram o canal radicular. Segundo Byström & Sundqvist (1981, 1983), isso ocorre porque não houve uma completa eliminação dos microrganismos, mas sim uma redução microbiana na luz do canal. Devido a isso, têm sido preconizados protocolos que utilizem SQA com efetiva atividade antimicrobiana no preparo dos canais radiculares.

Por meio do método de cultura, observou-se que na ausência de MIC ocorreu aumento de microrganismos no canal radicular. Este resultado está associado à proliferação de microrganismos presentes no interior dos túbulos dentinários, os quais conseguiram sobreviver ao PQM, recontaminando a luz do canal. Assim, na tentativa de eliminar microrganismos resistentes ao PQM, diferentes protocolos de utilização de MIC têm sido

propostos. Gomes *et al.* (2009) recomendam a utilização de MIC em casos específicos como ápice aberto, exsudato persistente, sintomatologia periapical (dor à palpação ou percussão), além de tempo insuficiente para finalização do tratamento endodôntico e fadiga do paciente ou cirurgião-dentista.

Após PQM com SF observou-se, por meio do método de cultura, que a MIC de CLG 2% foi efetiva na eliminação de microrganismos dos canais radiculares, comprovando sua efetividade antimicrobiana. Entretanto, por meio do método de PCR, observou-se presença de DNA dos microrganismos avaliados, em todos os espécimes testados, após utilização da MIC, mesmo tendo o método de cultura demonstrado ausência de microrganismos. A medicação de CL tem se mostrado uma opção efetiva de tratamento devido à sua atividade antimicrobiana, substantividade e baixa citotoxicidade. Outros estudos *in vitro* e *in vivo* também têm comprovado a efetividade da CL como MIC na redução do número de microrganismos (Basrani *et al.*, 2002; Menezes *et al.*, 2004b; Ercan *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2006c; Vianna *et al.*, 2006a,b; Manzur *et al.*, 2007).

Após PQM com SF observou-se, por meio do método de cultura, que a MIC de HC + SF também foi efetiva na eliminação de microrganismos dos canais radiculares, comprovando sua efetividade antimicrobiana. Entretanto, por meio do método de PCR, observou-se presença de DNA dos microrganismos avaliados, em todos os espécimes testados, após utilização da MIC, mesmo tendo o método de cultura demonstrado ausência de microrganismos. HC tem sido utilizado como MIC devido às suas propriedades físicas, biológicas e antimicrobianas (Byström *et al.*, 1985; Gomes *et al.*, 2006c; Valera *et al.*, 2010). Outros autores também observaram redução ou eliminação de microrganismos após a utilização desta medicação (Byström *et al.*, 1985; Ørstavik *et al.*, 1991; Sjögren *et al.*, 1991). Entretanto, estudos *in vitro* em dentes humanos infectados (Estrela *et al.*, 1999) e dentes bovinos infectados (Safavi *et al.*, 1990; Gomes *et al.*, 2003b) demonstraram que HC não promoveu eliminação de microrganismos.

Por meio do método de cultura, observou-se que a MIC de HC + CLG 2%, utilizada por diferentes períodos de tempo (7, 14 e 30 dias), não foi efetiva na desinfecção dos canais radiculares previamente instrumentados com SF. Por meio do método de PCR, observou-se presença de DNA dos microrganismos avaliados, em todos os espécimes

testados, após utilização da MIC. Vianna *et al.* (2007) também não observaram grande redução de microrganismos quando esta medicação foi utilizada por 7 dias, em canais instrumentados com CLG 2%. Entretanto, outros autores concluíram que essa associação é mais eficaz que a medicação de HC em água estéril contra *E. faecalis* inoculado no interior de túbulos dentinários (Evans *et al.*, 2003; Ercan *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2006c, 2009b), devido, principalmente, à associação das propriedades antimicrobianas de ambas as substâncias.

Observou-se também, em avaliação por microscopia confocal, após PQM com SF e EDTA 17%, que as MIC de CLG 2%, HC + CLG 2% e HC + SF, após 30 dias, promoveram redução do conteúdo de microrganismos nos túbulos dentinários. Utilizando diferentes metodologias, outros estudos também demonstraram a efetividade da CL (Basrani *et al.*, 2002; Menezes *et al.*, 2004b; Ercan *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2006c; Vianna *et al.*, 2006a,b; Manzur *et al.*, 2007) e do HC (Barthel *et al.*, 2002; Lynne *et al.*, 2003; Ercan *et al.*, 2006; Valera *et al.*, 2010) na redução ou eliminação de microrganismos nos canais radiculares.

Por meio do método de LAL, observou-se que PQM com SF, na presença ou ausência de EDTA, foi efetivo na redução do conteúdo de endotoxina, entretanto, não foi capaz de eliminá-lo. Essa redução parece estar relacionada principalmente ao desempenho da instrumentação endodôntica utilizando limas rotatórias e ao fluxo e refluxo da solução irrigadora, os quais promovem remoção de debris dentinários.

Estudos *in vivo* utilizando limas manuais têm demonstrado que o PQM tem reduzida capacidade em remover endotoxina dos canais radiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical (Vianna *et al.*, 2007; Martinho & Gomes 2008). Entretanto, a utilização de instrumentos rotatórios parece aumentar a efetividade da remoção/redução de endotoxinas do interior dos canais radiculares (Martinho *et al.*, 2010a).

Tanto no grupo avaliado após 7 dias do PQM com SF, quanto no grupo de ausência de MIC durante 7, 14 e 30 dias, o conteúdo de endotoxina aumentou, o que se deve à recontaminação do canal radicular por microrganismos que sobreviveram à instrumentação. A medicação de HC + CLG 2% promoveu redução do conteúdo de

endotoxina, enquanto as medicações de HC + SF e a medicação de CLG 2% não demonstraram essa capacidade.

A redução de endotoxina observada no presente grupo após medicação de HC + CLG2% também pode estar associada à instrumentação prévia com SF, a qual é uma substância que não tem ação antimicrobiana e, conseqüentemente, não atua na morte celular. Por meio da utilização de SQA com efetividade antimicrobiana, ocorre morte celular e maior liberação de endotoxinas. Assim, a redução de microrganismos e endotoxinas obtida por meio da irrigação com SF está associada à instrumentação e ao fluxo e refluxo durante a irrigação e aspiração. Estas manobras facilitam a remoção da dentina superficial das paredes do canal radicular, removendo assim o conteúdo de endotoxina ligado a ela.

Contrariando os resultados do presente estudo, Vianna *et al.* (2007) não observaram efeito sinérgico na associação HC + CLG2% contra endotoxinas ou microrganismos após 7 dias de sua utilização. Valera *et al.* (2010) observaram que HC, e HC + CLG 2% foram efetivos na redução de *E. coli* e endotoxina, sendo HC mais efetivo.

6.3 Ação da CLG 2% sobre microrganismos e endotoxina

Observou-se, por meio do método de cultura, que PQM com CLG 2%, na presença ou ausência de EDTA 17%, foi efetivo tanto na redução quanto na eliminação de microrganismos dos canais radiculares. Por meio de avaliação por microscopia confocal, PQM com CLG 2% promoveu redução do conteúdo de microrganismos nos túbulos dentinários. Por meio do método de PCR, observou-se presença de DNA dos microrganismos avaliados, em todos os espécimes testados, após PQM. Estes resultados se devem ao amplo espectro de ação antimicrobiana e efeito residual da CL, os quais favorecem a desinfecção do sistema de canais radiculares.

A ação antimicrobiana da CL advém de sua capacidade em se ligar a regiões eletronegativas da bactéria e atacar a membrana citoplasmática bacteriana, causando prejuízos na bicamada de fosfolipídios, perda do equilíbrio osmótico e liberação do material intracelular (Vianna *et al.*, 2006a). Seus efeitos residuais perduram por até 168

horas (Weber *et al.*, 2003). Isso ocorre devido à sua capacidade em se adsorver aos tecidos duros dentários com graduada e prolongada liberação em níveis terapêuticos (Dametto *et al.*, 2005).

No PQM, a CLG 2% também facilita a instrumentação, devido à lubrificação do canal e conseqüente diminuição do atrito do instrumento endodôntico contra as paredes do canal radicular. Ainda, durante a instrumentação, a CLG 2% propicia uma superfície radicular mais limpa, devido à menor formação de *smear layer*, quando comparada ao NaOCl e à CLL (Ferraz *et al.*, 2001, 2007).

Observou-se, por meio do método de cultura, que mesmo após 30 dias, período em que os canais não receberam MIC, ocorreu ausência de microrganismos nos canais, o que pode ser atribuído à ação residual da CL utilizada no PQM. Por meio do método de cultura, observou-se ainda que, aliada ao PQM com CLG 2%, a utilização de MIC de CLG 2%, HC + CLG 2% e HC + SF se mostrou efetiva na eliminação de microrganismos do canal radicular. Em avaliação por microscopia confocal, após PQM com CLG 2%, a utilização de medicação de CLG 2%, HC + SF e HC + CLG 2%, após 30 dias, foi efetiva na redução do conteúdo de microrganismos dos túbulos dentinários, mas não foi capaz de eliminá-lo. Entretanto, por meio do método de PCR, observou-se presença de DNA dos microrganismos avaliados, em todos os espécimes testados, após utilização das MIC, mesmo tendo o método de cultura demonstrado ausência de microrganismos.

Tais substâncias têm sido utilizadas como MIC devido, principalmente, à sua ação contra microrganismos presentes no sistema canais radiculares. Diferentes trabalhos têm atestado a efetividade antimicrobiana da CL (Siqueira & Uzeda, 1996; Síren *et al.*, 1997; Waltimo *et al.*, 1997, 1999; Molander *et al.*, 1998; Haapasalo *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2006c, 2009b), do HC (Barthel *et al.*, 2002; Lynne *et al.*, 2003; Ercan *et al.*, 2006; Valera *et al.*, 2010) e da associação de HC + CL (Barthel *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2003; Ercan *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2006c, 2009b) como MIC na desinfecção de canais radiculares, embora alguns trabalhos não tenham obtido bons resultados com essa associação (Portenier *et al.*, 2002; Barbin *et al.*, 2008) e outros tenham observado atividade antimicrobiana mais pronunciada na formulação contendo apenas HC quando comparado à CL + HC (Lynne *et al.*, 2003).

Por meio do método de LAL, observou-se que PQM com CLG 2%, na presença ou ausência de EDTA, promoveu redução de endotoxina do canal radicular, entretanto, não conseguiu eliminá-la. Corroborando com esse resultado, Endo (2011) observou que PQM com CLG 2% seguido de EDTA 17% foi eficiente na redução de endotoxina dos canais radiculares, mas não foi capaz de eliminá-la. Tanomaru *et al.* (2002) e Silva *et al.* (2004) também observaram que a CL não foi capaz de eliminar endotoxina.

As MIC CLG 2%, HC + CLG 2% e HC + SF, no presente estudo, não promoveram redução ou eliminação de endotoxina. Corroborando com este resultado, Vianna *et al.* (2007) observaram *in vivo* que 7 dias após a utilização das MIC de HC, CLG e sua associação, endotoxina foi reduzida em apenas 1,4%.

Outros trabalhos têm comprovado a ação do HC na eliminação do LPS (Estrela *et al.*, 1995; Tanomaru *et al.*, 2002). Entretanto, sabe-se que a baixa difusão de íons hidroxila através da dentina infectada, ou mesmo a capacidade tampão da dentina podem impedir a ação da pasta de HC (Haapasalo *et al.*, 2000).

6.4 Ação do NaOCl 5,25% sobre microrganismos e endotoxina

Observou-se, por meio dos métodos de cultura e microscopia confocal, que após PQM com NaOCl 5,25%, na presença ou ausência de EDTA 17%, houve redução de microrganismos nos canais radiculares e túbulos dentinários, respectivamente. Por meio do método de PCR, observou-se presença de DNA dos microrganismos avaliados, em todos os espécimes testados, após PQM. Este resultado deve-se à efetividade antimicrobiana e capacidade de dissolução de tecidos, inerentes ao NaOCl.

NaOCl tem sido utilizado como SQA, devido, principalmente, à sua efetividade antimicrobiana, a qual advém da combinação do cloro com proteínas da membrana celular, formando compostos que interferem no metabolismo da célula (Boucher, 1979) e induzem o rompimento de sua membrana (Mc Donnel & Russel, 1999). Quando NaOCl entra em contato com a matéria orgânica, ocorrem reações químicas de saponificação, neutralização e cloraminação. O ácido hipocloroso e os íons hipoclorito apresentam atividade de hidrolizar e degradar aminoácidos. A reação de cloraminação entre o cloro e o grupamento

amina dos aminoácidos, com a formação de cloraminas, interfere no metabolismo celular. O cloro, o qual é um oxidante forte, apresenta ação antimicrobiana pela inibição enzimática bacteriana, a partir de uma oxidação irreversível dos grupos sulfidril de enzimas bacterianas essenciais (Barbin, 1999).

NaOCl tem sido utilizado, em endodontia, em diferentes concentrações, como 0,5%, 1%, 2%, 2,5% e 5,25%. Suas propriedades estão relacionadas à sua concentração, assim, sua efetividade antimicrobiana é diretamente proporcional à quantidade de ácido hipocloroso presente na solução (Boucher, 1979). Especialmente em altas concentrações, como 5,25%, NaOCl é capaz de descontaminar os túbulos dentinários em todas as profundidades e terços dos canais radiculares (Berber *et al.*, 2006).

Corroborando com o presente trabalho, outros estudos, também utilizando microscopia confocal, observaram a efetividade antimicrobiana do NaOCl. Chávez *et al.* (2010) observaram eliminação de 91% de *E. faecalis* pela ação de NaOCl. Perochena *et al.* (2011) observaram dissolução do biofilme e dentina limpa após utilização de NaOCl 5%.

Entretanto, apesar do NaOCl 5,25% ter reduzido o conteúdo microbiano imediatamente após a instrumentação, o qual foi observado por meio do método de cultura, após 7 dias ocorreu aumento do número de microrganismos. Dametto *et al.* (2005) também observaram recontaminação do canal radicular após 7 dias do PQM.

Observou-se, por meio do método de cultura, que, aliada ao PQM com NaOCl 5,25%, a utilização de MIC de CLG 2%, HC + CLG 2% e HC + SF mostrou-se efetiva na eliminação de microrganismos nos canais radiculares. No grupo com ausência da utilização de MIC, mesmo após 30 dias, não houve recontaminação dos canais radiculares, o que pode ser atribuído à ação antimicrobiana do NaOCl 5,25%, durante o PQM, o qual é capaz de descontaminar o canal e dissolver debris. Entretanto, por meio do método de PCR, observou-se presença de DNA dos microrganismos avaliados, em todos os espécimes testados, após utilização das MIC, mesmo tendo o método de cultura demonstrado ausência de microrganismos.

Observou-se, por meio de microscopia confocal, que aliada ao PQM com NaOCl 5,25%, a utilização de MIC de CLG 2%, HC + CLG 2% e HC + SF mostrou-se efetiva na redução de microrganismos nos túbulos dentinários. Corroborando com o

presente trabalho, Valera *et al.* (2009) observaram que HC e CLG 2%, isoladamente, promoveram redução de microrganismos, mas ao contrário dos resultados do presente trabalho, a MIC de HC + CLG 2% foi capaz de eliminar completamente os microrganismos.

No presente estudo, por meio do método de LAL, observou-se que PQM com NaOCl 5,25%, na presença ou ausência de EDTA 17%, foi efetivo na redução do conteúdo de endotoxina, entretanto, não foi capaz de eliminá-lo. Apesar de sua atividade antimicrobiana, o NaOCl não tem demonstrado ação efetiva na eliminação de endotoxinas (Martinho & Gomes, 2008; Gomes *et al.*, 2009a). Oliveira *et al.* (2007) também observaram *in vitro* que as soluções de NaOCl 2,5% e 5,25% não foram capazes de inativar LPS em canais radiculares.

As medicações de CLG 2%, HC + CLG 2% e HC + SF não promoveram redução ou eliminação de endotoxina em canais irrigados com NaOCl 5,25%. Entretanto, Estrela *et al.* (1995) e Tanomaru *et al.* (2002) observaram efetividade do HC na eliminação do LPS.

6.5 Ação do NaOCl 5,25% seguido de CLL 2% sobre microrganismos e endotoxina

Por meio do método de cultura, observou-se que PQM com NaOCl 5,25% seguido de irrigação com CLL 2%, na presença ou ausência de EDTA 17%, foi efetivo na eliminação de microrganismos do canal radicular. Por meio de avaliação por microscopia confocal, observou-se que NaOCl 5,25% seguido de irrigação final com CLL 2% foi efetivo na redução de microrganismos presentes nos túbulos dentinários. Entretanto, por meio do método de PCR, observou-se presença de DNA dos microrganismos avaliados, em todos os espécimes testados, após PQM.

PQM com NaOCl 5,25% e irrigação final com CLL 2% tem por finalidade a associação das propriedades antimicrobianas dessas duas substâncias, bem como a substantividade da CL e capacidade de dissolução de tecidos do NaOCl. A CL mantém sua ação desinfetante mesmo na presença de resíduos orgânicos, enquanto o NaOCl demonstra menor atividade antimicrobiana na presença de matéria orgânica (Gelinas & Goulet, 1983).

Para Vianna & Gomes (2009), a associação de NaOCl e CL não demonstra atividade antimicrobiana superior à CL utilizada isoladamente. Entretanto, Zamany *et al.* (2003) e Flach (2011) demonstraram que essa associação resultou em aumento da desinfecção dos canais radiculares, o que pode levar a um resultado clinicamente relevante.

Entretanto, a literatura aponta que materiais endodônticos podem reagir quimicamente no interior dos canais radiculares, levando à deposição do produto dessa reação em suas paredes. NaOCl em associação com CL pode produzir um precipitado marrom-alaranjado, identificado como para-cloroanilina (Basrani *et al.*, 2007; Basrani *et al.*, 2009; Basrani *et al.*, 2010). Esse precipitado pode promover a formação de *smear layer* química recobrando os túbulos dentinários (Akisue *et al.*, 2010), bem como levar à alteração da coloração dentária, tendo mostrado ser citotóxico e carcinogênico (Burkhardt-Holm *et al.*, 1999; Basrani *et al.*, 2007).

No presente grupo, *smear layer* química decorrente do uso de NaOCl seguido da irrigação com CLL 2%, pode não ter sido depositada, ou ter sido removida pela irrigação abundante com SF, ou mesmo, quando presente, não ter interferido negativamente na capacidade da SQA em limpar os túbulos dentinários. Este resultado corrobora com Thomas & Sem (2010) e Nowicki & Sem (2011), os quais não observaram a formação de para-cloroanilina na associação entre NaOCl e CL.

Observou-se, por meio do método de cultura, que a associação do NaOCl 5,25% seguida de irrigação final com CLL 2%, no PQM, a protocolos de medicação com HC+ SF, CLG 2% e HC + CLG 2% foi efetiva na eliminação de microrganismos dos canais radiculares. Por meio de avaliação por microscopia confocal, observou-se que PQM com NaOCl 5,25% seguido de irrigação final com CLL 2%, associados à medicação com HC + SF, CLG 2% e HC + CLG 2% foi efetivo na redução de microrganismos dos túbulos dentinários. Entretanto, por meio do método de PCR, observou-se presença de DNA dos microrganismos avaliados, em todos os espécimes testados, após utilização das MIC, mesmo tendo o método de cultura demonstrado ausência de microrganismos. Diferentes trabalhos têm demonstrado a efetividade antimicrobiana de tais MIC frente a microrganismos associados às patologias pulpares e periapicais, como CL (Ercan *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2006c; Vianna *et al.*, 2006a,b; Manzur *et al.*, 2007), HC (Sjögren *et al.*,

1991; Lynne *et al.*, 2003) e HC + CL (Barthel *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2003; Ercan *et al.*, 2006).

No grupo com ausência da utilização de MIC, mesmo após 30 dias, foi observada, por meio do método de cultura, ausência de microrganismos, o que pode ser atribuído à ação antimicrobiana do hipoclorito 5,25%, durante o PQM, o qual, especialmente em altas concentrações, pode ser capaz de descontaminar os túbulos dentinários e dissolver debris, como observado por Berber *et al.* (2006), e também à ação residual da CL utilizada na irrigação final, a qual consiste na capacidade em se adsorver aos tecidos duros dentários com graduada liberação (Dametto *et al.*, 2005), prolongando seu efeito antimicrobiano.

Por meio do método de LAL, observou-se que o PQM com NaOCl 5,25% seguido de irrigação com CLL 2%, na presença ou ausência de EDTA 17%, foi efetivo na redução do conteúdo de endotoxina, entretanto, não foi capaz de eliminá-lo. Apesar de sua atividade antimicrobiana, NaOCl não tem demonstrado ação efetiva sobre endotoxinas (Martinho & Gomes, 2008). Da mesma forma, não tem sido observada atividade efetiva da CL na eliminação de endotoxina (Tanomaru *et al.*, 2002; Endo, 2011).

Diante da incapacidade do NaOCl (Oliveira *et al.*, 2007; Martinho *et al.*, 2008) e da CL (Oliveira *et al.*, 2007; Vianna *et al.*, 2007) em eliminar o conteúdo de endotoxina, a redução de endotoxina observada no presente grupo parece não estar relacionada apenas à SQA, mas principalmente à ação mecânica dos instrumentos endodônticos e ao fluxo e refluxo da solução irrigadora, os quais promovem remoção de debris dentinários.

Também não foi observada efetividade das MIC de CLG 2%, HC + CLG 2% e HC + SF na redução ou eliminação de endotoxina. Enquanto a literatura afirma que a CL tem pouca ou nenhuma ação sobre endotoxinas (Okino *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2007; Endo, 2011), estudos têm comprovado a ação do HC na eliminação do LPS (Estrela *et al.*, 1995; Tanomaru *et al.*, 2002). Entretanto, a ineficácia do HC sobre endotoxina, observada no presente estudo, pode estar relacionada à baixa difusão de íons hidroxila através da dentina infectada, a qual pode impedir sua ação.

6.6 Considerações finais

O objetivo principal da terapia endodôntica é eliminar, ou ao menos reduzir, o número de microrganismos, e ainda remover o tecido pulpar infectado ou necrótico presente no interior do sistema de canais radiculares (Thomas & Sem, 2010). Para tanto, instrumentos manuais e/ou rotatórios são utilizados concomitantemente às SQA e soluções irrigadoras, no PQM dos canais radiculares.

A MIC tem por finalidade potencializar a sanificação do sistema de canais e túbulos dentinários (Byström & Sundqvist, 1981, 1983; Byström *et al.*, 1985; Sundqvist, 1998; Gomes *et al.*, 2009b), sendo fundamental sua utilização em canais radiculares com exsudato persistente e sintomatologia periapical (dor à palpação/ percussão) (Gomes *et al.*, 2009b).

Devido à importância de microrganismos e endotoxinas na etiologia de patologias pulpares e periapicais, torna-se fundamental avaliar a ação de diferentes SQA e MIC sobre os mesmos, a fim de obter um tratamento endodôntico mais efetivo. Assim, diferentes trabalhos têm sido desenvolvidos, testando a efetividade de diversos protocolos de instrumentação, irrigação e tempos de MIC.

O presente estudo foi desenvolvido a fim de investigar a efetividade de diferentes protocolos de irrigação e de MIC por 7, 14 e 30 dias sobre o conteúdo de microrganismos e endotoxina, tanto na luz do canal (avaliada por meio de técnicas de cultura, PCR e quantificação de endotoxina), quanto nos túbulos dentinários (avaliada por meio de microscopia confocal), analisando tanto a presença ou ausência de microrganismos, mas também se as células microbianas continuaram viáveis frente aos diferentes protocolos utilizados. Para tanto, foram utilizadas 520 raízes, sendo que em 400 foram empregadas as metodologias de cultura, PCR e quantificação de endotoxinas, e nas demais 120 foi realizada análise por meio de microscopia confocal.

Por meio da metodologia de cultura, observou-se redução considerável e mesmo eliminação de microrganismos, imediatamente após diferentes protocolos de PQM. Berber *et al.* (2005) também observaram redução de quase 100% da cultura microbiológica imediatamente após PQM.

Entretanto, no presente trabalho, pelo método de cultura, após 7 dias do PQM, ocorreu recontaminação dos canais pelos microrganismos, indicando que o PQM foi capaz de eliminar microrganismos da luz do canal, mas estes continuavam presentes nos túbulos dentinários. Observou-se ainda, após diferentes protocolos de MIC, redução ou mesmo eliminação dos microrganismos após 7, 14 ou 30 dias de sua utilização. Vianna *et al.* (2007) não observaram grande redução de microrganismos após 7 dias de medicação, assim como Berber (2008), 14 dias após a utilização das mesmas medicações testadas no presente estudo.

Entretanto, por meio da metodologia de PCR, observou-se a presença de DNA de todos os microrganismos após utilização de SQA e MIC, mesmo nos grupos que apresentaram ausência de microrganismo pelo método de cultura.

Quando esses mesmos protocolos de PQM e MIC foram avaliados, por meio da metodologia de microscopia confocal, observou-se que nenhuma substância foi capaz de eliminar microrganismos presentes no interior dos túbulos dentinários, observando maior redução de microrganismos após PQM e após 30 dias de MIC, quando comparado a 7 ou 14 dias de sua utilização.

Observou-se ainda, por meio da metodologia de LAL, que nenhum protocolo de PQM e MIC foi capaz de eliminar endotoxina, entretanto, maior redução de endotoxina foi observada imediatamente após a realização do PQM, ocorrendo aumento de endotoxina após 7 dias do PQM. MIC não foi capaz de eliminar o conteúdo de endotoxina.

Dessa forma, pôde-se observar que mesmo naqueles protocolos de PQM e MIC que apresentaram ausência de microrganismos pelo método de cultura, ocorreu presença de microrganismos pelo método confocal, presença de endotoxina pelo método LAL e presença de DNA pelo método PCR.

Estes resultados atestam que as SQA e MIC utilizadas no presente trabalho foram eficientes na redução de microrganismos presentes na luz do canal radicular. Entretanto, nenhuma das SQA e MIC, estas ainda que por 30 dias no interior nos canais radiculares, foi capaz de eliminar microrganismos presentes no interior dos túbulos dentinários, corroborando com Gomes *et al.* (2009b) que afirmam que a efetividade do

PQM e da MIC dependem da vulnerabilidade das espécies microbianas presentes no sistema de canais radiculares.

Verifica-se ainda a importância da utilização de SQA com efetiva capacidade antimicrobiana e ação residual, principalmente diante do recente advento da instrumentação rotatória, onde novos instrumentos confeccionados com uma liga de NiTi melhorada (*M-Wire*) foram lançados no mercado. Estes têm como proposta serem de uso único no canal radicular, simplificando a sequência de tratamento (De-Deus *et al.*, 2010; Bürklein *et al.*, 2012) e, comparados aos sistemas rotatórios que empregam múltiplos instrumentos, têm demonstrado serem também efetivos na redução microbiana (Alves *et al.*, 2012). Entretanto, sua utilização diminui ainda mais o tempo de instrumentação e, conseqüentemente, o tempo de contato da SQA com os substratos presentes nos canais radiculares (Brum, 2013).

A MIC, ao contribuir para redução do conteúdo de microrganismos, também demonstra sua importância na terapêutica endodôntica, principalmente naqueles casos com exsudato persistente, dor à percussão e/ou palpação, que indicam a presença de microrganismos no sistema de canais radiculares.

Os resultados do presente trabalho demonstram a importância do PQM para o sucesso do tratamento endodôntico, pois nem a medicação por 30 dias foi capaz de reduzir o conteúdo microbiológico/endotóxico dos túbulos dentinários. Por meio da instrumentação adequada do canal radicular em toda a sua extensão, patência e ampliação foraminal, principalmente nos casos de dentes com necrose pulpar, e do uso de uma SQA com ampla atividade antimicrobiana, ação residual e baixa citotoxicidade, espera-se reduzir consideravelmente o nível de microrganismos e endotoxinas nos canais radiculares. Este estado de limpeza é complementado com a obturação hermética dos canais radiculares, selamento apical por meio de cimento endodôntico com adequada propriedade física e antimicrobiana e selamento coronário por meio de uma restauração coronária definitiva ou confecção de prótese imediatamente após o término do tratamento endodôntico.

Dessa forma, busca-se com o selamento coronário e apical, evitar a entrada de novos microrganismos no interior do canal radicular, além da entrada de nutrientes que levem à proliferação dos microrganismos existentes no interior dos túbulos dentinários,

propiciando ambiente desfavorável à manutenção da infecção e, conseqüentemente, o restabelecimento/manutenção da saúde periapical.

7. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos e nas condições experimentais deste estudo, pode-se concluir que:

- Preparo químico-mecânico com clorexidina 2%, hipoclorito de sódio 5,25% e hipoclorito de sódio 5,25% seguido de clorexidina líquida 2% reduziu *E. coli*, *E. faecalis*, *C. albicans* e endotoxina de *E. coli*.
- Medicações intracanaís de clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio associado à solução fisiológica e hidróxido de cálcio associado à clorexidina gel 2% reduziram *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans*.
- Preparo químico-mecânico e medicação intracanal não eliminaram endotoxina de *E. coli*.
- Após preparo químico-mecânico e medicação intracanal, observou-se presença de DNA de *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans*.
- Menor redução microbiana ocorreu nos túbulos dentinários comparada à luz do canal radicular.

REFERÊNCIAS*

1. Abou-Rass M, Piccinino MV. The effectiveness of four irrigation methods on the removal of root canal debris. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982; 54: 323-8.
2. Aibel K, Stevens R. Effect of chlorhexidine on IL-6 induction by LPS. *J Endod.* 1999; 25(4): 282.
3. Akisue E, Tomita VS, Gavini G, Poli de Figueiredo JA. Effect of the combination of sodium hypochlorite and chlorhexidine on dentinal permeability and scanning electron microscopy precipitate observation. *J Endod.* 2010; 36(5): 847-50.
4. Alves FRF, Almeida BM, Neves MAS, Moreno JO, Rôças IN, Siqueira Jr. JF. Disinfecting oval-shaped root canals: Effectiveness of different supplementary approaches. *J Endod.* 2011; 37(4): 496-501.
5. Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Castillo F, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. *J Endod.* 2012; 38(7): 927-30.
6. Baker NA, Eleazer PD, Averbach RE, Seltzer S. Scanning electron microscopic study of the efficacy of various irrigating solutions. *J Endod.* 1975; 1(4): 127-35.
7. Barbin EL. Estudo *in vitro* do efeito da adição de lauril dietileno glicol éter sulfato de sódio nas soluções de NaOCl sobre suas propriedades físico-químicas anteriores e posteriores à dissolução do tecido pulpar bovino [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo/Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 1999.
8. Barbin EL, Saquy PC, Guedes DFC, Sousa Neto MD, Estrela C, Pécora JD. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. *J Endod.* 2008; 34(12): 1508-14.
9. Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod J.* 1997; 30(3): 155-9.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas nas normas do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

10. Barthel CR, Zimmer S, Zilliges S, Schiller R, Roulet JF. *In situ* antimicrobial effectiveness of chlorhexidine and calcium hydroxide: gel and paste versus gutta-percha points. J Endod. 2002; 28(6): 427-30.
11. Basrani B, Santos M, Tjaderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J *et al.* Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002; 94(2): 240-5.
12. Basrani BR, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. J Endod. 2007; 33(8): 966-9.
13. Basrani BR, Manek S, Fillery E. Using diazotization to characterize the effect of heat or sodium hypochlorite on 2.0% chlorhexidine. J Endod. 2009; 35(9): 1296-9.
14. Basrani BR, Manek S, Mathers D, Fillery E, Sodhi RN. Determination of 4-chloroaniline and its derivatives formed in the interaction of sodium hypochlorite and chlorhexidine by using gas chromatography. J Endod. 2010; 36(2): 312-4.
15. Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. J Endod. 1992; 18(12): 605-12.
16. Beltes PG, Pissiotis E, Koulaouzidou E, Kortsaris AH. In vivo evaluation of chlorhexidine solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. J Endod. 1997; 8: 200-4.
17. Beltz RE, Torabinejad M, Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulpand dentin. J Endod. 2003; 29: 334-7.
18. Berber VB. Verificação da redução de *Enterococcus faecalis* no canal radicular e nos túbulos dentinários utilizando diferentes substâncias químicas auxiliares e técnicas de instrumentação: estudo *in vitro*. [dissertação]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas/Faculdade de Odontologia; 2005.
19. Berber VB. Estudo *in vivo* de patógenos endo-periodontais pelo método clássico e PCR e susceptibilidade a medicações locais. [tese]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas/Faculdade de Odontologia; 2008.

20. Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA *et al.* Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J.* 2006; 39(1): 10-7.
21. Boucher NM. A tool to improve the biocidal efficacy of sterilands of disinfectants in hospital or dental practice. *Can J Pharm Scien.* 1979; 14: 1-12.
22. Brancini MR, Bramanti CM, Berbet A. Poder de limpeza de algumas soluções irrigadoras analisado pelo microscópio de varredura. *Rev Paul Endod.* 1983; 4(1): 116-22.
23. Brum CBB. Comparação entre técnicas de instrumentação e substâncias químicas auxiliares na redução de *Enterococcus faecalis* no canal radicular: estudo *in vitro*. [dissertação]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas/Faculdade de Odontologia; 2013.
24. Buck RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. *J Endod.* 2001; 27(5): 325-7.
25. Bueno GO. Medicação intracanal: revisão da literatura contemporânea. [Monografia Especialização]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas/Faculdade de Odontologia; 2010.
26. Burkhardt-Holm P, Oulmi Y, Schroeder A, Storch V, Braunbeck T. Toxicity of 4-chloraniline in early life stages of Zebrafish (*Danio rerio*): II cytopathology and regeneration of liver and gills after prolonged exposure to waterborne 4 chloraniline. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1999; 37(1): 85-102.
27. Bürklein S, Hinschitza K, Dammaschke T, Schäfer E. Shaping ability and cleaning effectiveness of two single-filesystems in severely curved root canals of extracted teeth: Reciproc and WaveOne versus Mtwo and ProTaper. *Int Endod J.* 2012; 45: 449–61.
28. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res.* 1981; 89(4): 321-8.
29. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg.* 1983; 55(3): 307-12.

30. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.* 1985; 1(5): 170-5.
31. Çalt S, Serper A. Smear layer removal by EGTA. *J Endod.* 2000; 26(8): 459-61.
32. Castro FL, Andrade MF, Duarte Junior SL, Vaz LG, Ahid FJ. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *J Adhes Dent.* 2003; 5: 129-38.
33. Cervone F, Tronstad L, Hammond B. Antimicrobial effect of chlorhexidine in a controlled release delivery system. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 6(1): 33-6.
34. Chandra A. Discuss the factors that affect the outcome of endodontic treatment. *Aust Endod J.* 2009; 35(2): 98-107.
35. Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod.* 2010; 36(1): 70-7.
36. Chong BS, Pitt Ford TT. The role of medication in root canal treatment. *Int Endod J* 1992; 25 (2): 97-106.
37. Costerton JW, Levandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49: 711-45.
38. Dahlén G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res.* 1980; 59(6): 1033-40.
39. Dahlén G, Möller AJR. Microbiology of endodontic infections. In: Slots J, Taubman MA, eds. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology.* St Louis: Mosby year book; 1992. p. 444-75.
40. Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Möller AJR. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol.* 1993; 8(6): 375-82.
41. Dahlén G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21(1): 6-11.
42. Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPF, Zaia AA, Teixeira FB, Souza Filho FJ. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine

- gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005; 99(6): 768-72.
43. De-Deus G, Barino B, Zamolyi RQ, Souza E, Fonseca Jr. A, Fidel S, Fidel RASF. Suboptimal debridement quality produced by the single-file f2 protaper technique in oval-shaped canals. J Endod. 2010; 36(11): 1897-900.
 44. Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1982; 53(5): 518-23.
 45. Del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MAH, Cavenago BC, Villas-Boas MH, Graeff MS *et al.* Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. Endod J. 2011; 37(8): 1134-8.
 46. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, Van Meerbeek B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. J Den Res. 2005; 84: 118-32.
 47. Denton GW. Chlorhexidine. In: Block SS (editor). Disinfection, sterilization and preservation. Philadelphia: Lea & Febiger; 1991. p. 274-89.
 48. Difiore PM, Peters DD, Setterstrom JA. The antibacterial effects of calcium hydroxide apexification pastes on *Streptococcus sanguis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1983; 55(1): 91-4.
 49. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. J Endod. 2002; 28(10): 689-93.
 50. Dixon DR, Darveau RP. Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure. J Dent Res. 2005; 84(7): 584-95.
 51. Dwyer TG, Torabinejad M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. J Endod. 1981; 7(1): 31-5.
 52. Egan MW, Spratt DA, Nq YL, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. Int Endod J. 2002; 35(4): 321-9.

53. el-Housseiny AA, Jamjoum H. The effect of caries detector dyes and a cavity cleansing agent on composite resin bonding to enamel and dentin. *J Clin Pediatr Dent.* 2000; 25: 57-63.
54. Endo MS. Identificação de microrganismos e quantificação de endotoxinas em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical [dissertação]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas/Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2011.
55. Endo MS, Ferraz CC, Zaia AA, Almeida JF, Gomes BP. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: monitoring of the endodontic retreatment. *Eur J Dent.* 2013 (no prelo).
56. Endo MS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31(10): 2575-83.
57. Ercan E, Dalli M, Dulgergil T. *In vitro* assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102(2): 27-31.
58. Erdemir A, Ari H, Gungunes H, Belli S. Effect of medications for root canal treatment on bonding to root canal dentin. *J Endod.* 2004; 30: 113-6.
59. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe IR. Mechanism of the action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J.* 1995; 6(2): 85-90.
60. Evans MD, Baumgartner C, Khemaleelakul S, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod.* 2003; 29(5): 338-9.
61. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc.* 1986; 112(6): 863-9.
62. Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. *J Endod.* 2002; 28(2): 68-71.

63. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2001; 27(7): 452-5.
64. Ferraz CC, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *Braz Dent J.* 2007; 18(4): 294-8.
65. Ferreira CM, da Silva Rosa OP, Torres SA, Ferreira FB, Bernardinelli N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Braz Dent J.* 2002;13(2):118-22.
66. Ferreira FB, Torres SA, Rosa OP, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC, Gomes BP. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104(5):709-16.
67. Flach N. Avaliação *in vitro* do efeito de diferentes soluções irrigadoras sobre o biofilme bacteriano: uma análise por meio de microscopia confocal [monografia]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Faculdade de Odontologia; 2011.
68. Foschi F, Nucci C, Montebugnoli L, Marchionni S, Breschi L, Malagnino VA *et al.* SEM evaluation of canal wall dentine following use of Mtwo and ProTaper NiTi rotary instruments. *Int Endod J.* 2004; 37(12): 832-9.
69. Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20(5): 289-95.
70. Gelinas P, Goulet J. Neutralization of the activity of eight disinfectants by organic matter. *J Appl Bacteriol.* 1983; 54: 243-7.
71. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6: 437-9.
72. Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *Int Endod J.* 2004; 37(4): 272-80.

73. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1994; 27(6): 291-8.
74. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dentistry.* 1996a; 24(1-2): 47-55.
75. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J.* 1996b; 29(4): 235-41.
76. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of endodontic signs and symptoms with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J.* 1996c; 29: 69-75.
77. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2001; 34(6): 424-8.
78. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Rosalen PL, Teixeira FB, Zaia AA *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. *Brazilian Dent J.* 2002; 13(3): 155-61.
79. Gomes BP, Sato E, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2003a; 36(9): 604-9.
80. Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L *et al.* Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. *Int Endod J.* 2003b; 36(4): 267-75.
81. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA *et al.* Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19(2): 71-6.
82. Gomes BP, Pedroso JA, Jacinto RC, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA *et al.* *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. *Braz Dent J.* 2004; 15(1): 30-5.

83. Gomes BP, Vianna ME, Matsumoto CU, Rossi VP, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FJ. Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 100(4): 512-7.
84. Gomes BPFA, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102(4): 544-50.
85. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC *et al.* Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod.* 2006; 32(10): 937-40.
86. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod.* 2008; 34(5): 537-40.
87. Gomes BPFA, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod.* 2009a; 35(10): 1350-3.
88. Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA *et al.* Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent.* 2009b; 37(1): 76-81.
89. Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod.* 2012; 38(8): 1082-6.
90. Grassi TF, Camargo EA, Salvadori DM, Marques ME, Ribeiro DA. DNA damage in multiple organs after exposure to chlorhexidine in Wistar rats. *Int J Hyg Environ Health.* 2007; 210(2): 163-7.
91. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol.* 1986; 57(6): 370-7.
92. Gurgel-Filho ED, Vivacqua-Gomes N, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of the effectiveness of the chemomechanical preparation against

- Enterococcus faecalis* after single or multiple-visit root canal treatment. Braz Oral Res. 2007; 21(4): 308-13.
93. Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TMT, Ørstavik D, Haapasalo MPP. Inactivation of local root canal medicaments by dentin: an *in vitro* study. Int Endod J. 2000; 33(2): 126-31.
 94. Hennessey TD. Antibacterial properties of Hibitane. J Clin Periodontol. 1977; 4(5): 36-48.
 95. Hennessey TS. Some antibacterial properties of chlorhexidine. J Periodontal Res Suppl. 1973; 12: 61-7.
 96. Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM *et al.* The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. J Oral Pathol Med. 2004; 33(3): 162-9.
 97. Horiba N, Maekawa Y, Matsumoto T, Nakamura H. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. J Endod. 1990; 16(7): 331-4.
 98. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1991; 71(4): 492-5.
 99. Horiba N, Maekawa Y, Yamauchi Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Complement activation by lipopolysaccharides purified from Gram negative bacteria isolated from infected root canal. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1992; 74(5): 492-5.
 100. Hurley JC. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. Clin Microbiol Rev. 1995; 8(2): 268-92.
 101. Imlay JA, Stuart L. DNA damage and oxygen radical toxicity. Science. 1988; 240(4857): 1302-9.
 102. Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. J Med Microbiol. 2005; 54(8): 777-83.
 103. Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza Filho FB. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. Int Endod J. 2006; 39(1): 62-70.

104. Jacinto RC, Gomes BP, Desai M, Rajendran D, Shah HN. Bacterial examination of endodontic infections by clonal analysis in concert with denaturing high performance liquid chromatography. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22(6): 403-10.
105. Kan VL. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *J Infect Dis*. 1993; 168(3): 779-83.
106. Kennedy WA, Walker WA, Gough RW. Smear layer removal effect on apical leakage. *J Endod*. 1986; 12(1): 21-7.
107. Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in caries: association with pulpal pain. *Int Endod J*. 2000; 33(2): 132-7.
108. Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 91(5): 587-93.
109. Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod*. 1998; 24: 472-6.
110. Lee W, Lim S, Son HH, Bae KS. Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin activated human lymphocytes. *J Endod*. 2004; 30(4): 209-12.
111. Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *Int Endod J*. 2010; 43(5): 430-5.
112. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LAB, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod*. 1999; 25(3): 167-71.
113. Levin J, Bang FB. Clottable protein in *Limulus*; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh*. 1968; 19(1): 186-97.
114. Li L, Hsiao WWL, Nandakumar R, Barbuto SM, Mongoidn EF, Paster BJ *et al*. Analyzing endodontic infection by deep coverage pyrosequencing. *J Dent Res*. 2010; 89(9): 980-4.

- 115.Lima KC, Fava LR, Siqueira JF Jr. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. J Endod. 2001; 27(10): 616-9.
- 116.Lopes HP, Siqueira JF Jr. Endodontia, Biologia e Técnica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
- 117.Love RM. Regional variation in root dentinal tubule infection by *Streptococcus gordonii*. J Endod. 1996; 22(6): 290-3.
- 118.Love RM. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J. 2001; 34(5): 399-405.
- 119.Lynne RE, Liewehr FR, West LA, Patton WR, Buxton TB, Mcpherson JC. *In vitro* antimicrobial activity of various medication preparations on *E. faecalis* in root canal dentin. J Endod. 2003; 29(3): 187-90
- 120.Mackane L, Kadel J. Essential and applications. New York: McGraw-Hill; 1986.
- 121.Malic S, Hill KE, Hayes A, Percival SL, Thomas DW, Williams DW. Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent *in situ* hybridization (PNA FISH). Microbiology. 2009; 155(Pt 8): 2603-11.
- 122.Manzur A, Gonzales AM, Pozos A, Silva-Herzoq D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. J Endod. 2007; 33(2): 114-8.
- 123.Marinho AC, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. Influence of the apical enlargement size on the endotoxin level reduction of dental root canals. J Appl Oral Sci. 2012; 20(6): 661-6.
- 124.Martinho FC, Gomes BPF. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. J Endod. 2008; 34(3): 268-72.
- 125.Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF *et al.* Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. J Endod. 2010a; 36(11): 1766-9.
- 126.Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BPF. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions

- against macrophage in the release of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. J Endod. 2010b; 36(9): 1467-74.
127. Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BPFA. Antigenicity of primary endodontic infection against macrophages by the levels of PGE2 production. J Endod. 2011; 37(5): 602-7.
128. Mattison GD, Haddix JE, Kehoe JC, Progulsk-Fox A. The effect of *Eikenella corrodens* endotoxin on periapical bone. J Endod. 1987; 13(12): 559-65.
129. Mc Donnel G, Russel AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(1): 147-79.
130. McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A. Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)₂. J Endod. 2005; 31(5): 359-63.
131. Menezes AC, Zanet CG, Valera MC. Smear layer removal capacity of disinfectant solutions used with and without EDTA for the irrigation of canals: a SEM study. Pesqui Odontol Bras. 2003; 17(4): 349-55.
132. Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo CHR, Mancini MNG. *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. Int Endod J. 2004a; 37(5): 311-9.
133. Menezes MM, Valera MC, Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Ação antimicrobiana da clorexidina associada ao hidróxido de cálcio sobre *C. albicans*. In: Anais da 21^a Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2004b. Águas de Lindóia. São Paulo: SBPqO; 2004. p. 207. [Resumo Pc 038].
134. Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. Scanning. 1988; 10(4): 128-38.
135. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. Int Endod J. 2009; 42: 288-302.
136. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J. 1998; 31(1): 1-7.
137. Molina FP. Associação de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Escherichia coli* em canais radiculares e avaliação dos efeitos de extratos naturais sobre os

- microrganismos e endotoxinas [dissertação]. São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista/Faculdade de Odontologia; 2008.
- 138.Möller AJR. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth; methodological studies [Akademiförlaget]. Göteborg-Sweden: 1966.
- 139.Mônika CM, Fröner IC. A scanning electron microscopic evaluation of different root canal irrigation regimens. *Braz Oral Res.* 2006;20(3):235-40.
- 140.Montagner F. Identificação microbiológica em dentes com necrose pulpar e abscessos periapicais e a susceptibilidade antimicrobiana de algumas bactérias anaeróbias isoladas [dissertação]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas/Faculdade de Odontologia; 2009.
- 141.Montagner F. Comunidades microbianas em canais radiculares e abscessos periapicais agudos e susceptibilidade de algumas bactérias anaeróbias estritas isoladas [tese]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas/Faculdade de Odontologia; 2010.
- 142.Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FGC, Sanches PF, Gomes BPFA. Clustering behavior in microbial communities from acute endodontic infection. *J Endod.* 2012; 38(2): 158-62.
- 143.Moorer WR, Wesselink PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J.* 1982; 15(4): 187-96.
- 144.Moreira DM, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Line SR, Zaia AA. Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. *J Endod.* 2009; 35(7): 1023-7.
- 145.Murray P R. *Microbiologia Médica.* 4ª ed Elsevier, 2004.
- 146.Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod.* 2004; 30: 785-7.
- 147.Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res.* 2009; 19(4): 636-43.
- 148.Nastri N, Nastri M, Jewtuchowicz V, Mujica M, Lovanniti C, Gualtieri A *et al.* Prevalence of *Candida* species in necrotic pulp with chronic periapical processes. *Acta Odontol Latinoam.* 2011; 24(2): 183-7.

149. Neelakantan P, Subbarao C, Sharma S, Subbarao CV, Garcia-Godoy F, Gutmann JL. Effectiveness of curcumin against *Enterococcus faecalis* biofilm. Acta Odontol Scand. 2013 (no prelo) (doi: 10.3109/00016357.2013.769627).
150. Nóbrega LMM. Investigação da microbiota de canais radiculares infectados de dentes sintomáticos e com lesão periapical por cultura, clonagem e sequenciamento de gene 16S rRNA [tese]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas/Faculdade de Odontologia; 2012.
151. Nóbrega LM, Delboni MG, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. Treponema diversity in root canals with endodontic failure. Eur J Dent. 2013; 7(1): 61-8.
152. Novitsky TJ, Roslansky PF, Siber GR, Warren HS. Turbidimetric method for quantifying serum inhibition of *Limulus* amoebocyte lysate. J Clin Microbiol. 1985; 21(2): 211-6.
153. Nowicki JB, Sem DS. An *in vitro* spectroscopic analysis to determine the chemical composition of the precipitate formed by mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. J Endod. 2011; 37(7): 983-8.
154. Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. Int Endod J. 2004; 37(1): 38-41.
155. Oliveira LD, Carvalho CAT, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. Braz Oral Res. 2005; 19(1): 5-10.
156. Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CA, Valera MC. *In vitro* effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007; 104(1): 135-42.
157. Onçag O, Hosgor M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. Int Endod J. 2003; 36(6): 423-32.
158. Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. Endod Dent Traumatol. 1990; 6(4): 142-9.

159. Ørstavik D, Kerekes K, Molven O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study. *Int Endod J.* 1991; 24(1): 1-7.
160. Ostby B. Chelation in root canal therapy - Ethylenediamine tetra-acetic acid for cleansing and widening of root canals. *Odont Tidskrift.* 1957; 65(2): 3-11.
161. Ozdemir HO, Buzoglu HD, Calt S, Stabholz A, Steinberg D. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on *Enterococcus faecalis* biofilm colonization in young and old human root canal dentin: in vitro study. *J Endod.* 2010; 36(5): 842-6.
162. Ozok AR, Persoon IF, Huse SM, Keijser BJJ, Wesselink PR, Crielaard W *et al.* Ecology of the microbiome of the infected root canal system: a comparison between apical and coronal root segments. *Int Endod J.* 2012; 45(6): 530-41.
163. Paiva JH, Antoniazzi JH. *Endodontia - bases para a prática clínica.* 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1991. 720 p.
164. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in Lithuanian population. *J Endod.* 2000; 26(10): 593-5.
165. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J.* 2001; 34(6): 429-34.
166. Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J.* 2002; 35(8): 698-702.
167. Pinheiro ET, Gomes BPPA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003a; 36(1): 1-11.
168. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol.* 2003b; 18(2): 100-3.

169. Pinheiro ET, Penas PP, Endo M, Gomes BP, Mayer MP. Capsule locus polymorphism among distinct lineages of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. J Endod. 2012; 38(1): 58-61.
170. Pitts DL, Williams BL, Morton JTH. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. J Endod. 1982; 8(1): 10-8.
171. Portenier I, Haapasalo H, Ørstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentine, dentine matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. J Endod. 2002; 28(9): 634-7.
172. Prado M, Simao RA, Gomes BP. Evaluation of different irrigation protocols concerning the formation of chemical smear layer. Microsc Res Tech. 2013; 76(2): 196-200.
173. Rietschel ET, Seydel U, Zähringer U, Schade UF, Brade L, Loppnow H *et al.* Bacterial endotoxin: molecular relationships between structure and activity. Infect Dis Clin North Am. 1991;5(4):753-79.
174. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. Sci Am. 1992; 267(2): 54-61.
175. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. J Clin Microbiol. 2012; 50(5): 1721-4.
176. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Andrade AFB, Uzeda M. Identification of selected putative oral pathogens in primary root canal infections associated with symptoms. Anaerobe. 2002; 8(4): 200-8.
177. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J Endod. 2004; 30(5): 315-20.
178. Rogers JE, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, Giannobile WV *et al.* *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. J Periodontol. 2007; 78(3): 550-8.
179. Safavi KE, Spangberg LSW, Langerland K. Root canal dentinal tubule disinfection. J Endod. 1990; 16(5): 207-10.

- 180.Santos JN, Carrilho MR, De Goes MF, Zaia AA, Gomes BP, Souza-Filho FJ, et al. Effect of chemical irrigants on the bond strength of a self-etching adhesive to pulp chamber dentin. *J Endod.* 2006; 32: 1088-90.
- 181.Schäfer E, Erler M, Dammaschke T. Comparative study on the shaping ability and cleaning efficiency of rotary Mtwo instruments. Part 1. Shaping ability in simulated curved canals. *Int Endod J.* 2006; 39(3): 196-202.
- 182.Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod.* 1975; 1(1): 19-21.
- 183.Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J.* 2005; 38(10): 735-42.
- 184.Segura JJ, Calva JR, Guerrero JM, Jimenez-Planas A, Sampedro C, Llamas R. EDTA inhibits in vitro substrate adherence capacity of macrophages: endodontic implications. *J Endod.* 1997; 23(4): 205-8.
- 185.Seidberg BH, Schilder H. An evaluation of EDTA in endodontics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1974; 37(4): 609-20.
- 186.Sen BH, Wesselink PR, Türkün M. The smear layer: a phenomenon in root canal therapy. *Int Endod J.* 1995; 28(3): 141-8.
- 187.Sena NT, Gomes BPF, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J.* 2006; 39(11): 878-85.
- 188.Seol JH, Cho BH, Chung CP, Bae KS. Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2006; 32(2): 110-4.
- 189.Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria *in vitro*: a three-dimensional quantitative analysis. *J Endod.* 2009; 35(7): 981-5.
- 190.Signoretti FGC, Gomes BP, Montagner F, Tosello FB, Jacinto RC. Influence of 2% chlorhexidine gel on calcium hydroxide ionic dissociation and its ability of reducing endotoxin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 111 (5): 653-8.

- 191.Silva L, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin *in vivo*. J Endod. 2002; 28(2): 94-8.
- 192.Silva LA, Leonardo MR, Assed D, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. Braz Dent J. 2004; 15(2): 109-14.
- 193.Siqueira JF Jr, Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. J Endod. 1996; 22(12): 674-6.
- 194.Siqueira JF Jr, Batista MMD, Fraga RC, Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. J Endod. 1998; 24(6): 414-6.
- 195.Siqueira JF Jr, Lopes HP. Microbiologia endodôntica. In: Siqueira JF Jr, Lopes HP. Endodontia; Biologia e Técnica. Rio de Janeiro: MEDSI; 1999. 650 p.
- 196.Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. Int Endod J. 1999; 32(5): 361-9.
- 197.Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Abad EC, Castro AJR, Gahyva SM. Bacterial Leakage in coronally unsealed canal obturated with 3 different techniques. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod. 2000; 90(5): 647-50.
- 198.Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto RS, Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001; 92(4): 451-7.
- 199.Siqueira JF Jr, Rôças IN, Oliveira JC, Santos KR. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA directed PCR. J Endod. 2001b; 27(3): 164-7.
- 200.Siqueira JF Jr, Rôças IN, Moraes SR, Santos KR. Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. Int Endod J. 2002; 35(4): 345-51.
- 201.Siqueira JF Jr, Rôças IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontics pathogens. J Dent. 2003; 31(5): 333-9.

202. Siqueira JF Jr, Roças IN. Polymerase chain reaction based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(1): 85-94.
203. Siqueira JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(5): 632-41.
204. Siqueira JF Jr, Roças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part I - Current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod.* 2005; 31(6): 411-23.
205. Siqueira JF Jr, Roças IN, Cunha CD, Rosado AS. Novel bacterial phylotypes in endodontic infections. *J Dent Res.* 2005; 84(6): 565-9.
206. Siqueira JF Jr, Roças IN. Update on endodontic microbiology: candidate pathogens and patterns of colonization. *Endodontic Practice Today.* 2008; 2(1): 7-20.
207. Siqueira JF Jr, Roças IN, Alves FRF, Silva MG. Bacteria in the apical root canal of teeth with primary apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod.* 2009; 107(5): 721-6.
208. Siren E, Haapasalo M, Ranta K, Salmi P, Kerosuo E. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int End J.* 1997; 30(2): 91-5.
209. Sjögren U, Hägglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod.* 1990; 16(10): 498-504.
210. Sjögren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J.* 1991; 24(3): 119-25.
211. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997; 30(5): 297-306.
212. Sonntag D, Ott M, Kook K, Stachniss V. Root canal preparation with the NiTi systems K3, Mtwo and ProTaper. *Aust Endod J.* 2007; 33(2): 73-81.
213. Spangberg LSW. Endodontic Medicaments. In: Smith DC & Williams DF, eds. *Biocompatibility of Dental Materials.* Boca Raton, USA: CRC Press 1982: 223-57.

214. Spangberg LSW. Intracanal medication. In: Endodontics. Ingle JI, Bakland L. eds. Baltimore: WILLIAMS & WILKINS; 1994. ed. 4. p. 627-40.
215. Stuart CH, Schwartz SA, Beesom TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod. 2006; 32(2): 93-98.
216. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. J Endod. 2002; 28(4): 304-10.
217. Sunde PT, Olsen I, Göbel UB, Theegarten D, Winter S, Debelian GJ *et al.* Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. Microbiology. 2003; 149(Pt 5): 1095-102.
218. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. J Endod. 1992; 18(9): 427-30.
219. Sundqvist G, Fidgor D, Sjogren U. Microbiology analyses of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1998; 85(1): 86-93.
220. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LAB, Anibal EF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. Int Endod J. 2002; 35(9): 735-9.
221. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LAB. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. Int Endod J. 2003; 36(11): 733-9.
222. Tanomaru JMG, Rodrigues VMT, Tanomaru Filho M, Spolidorio DMP, Ito IY. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras empregadas em Endodontia. Rev Paul Odontol. 2005; 27(1): 38-40.
223. Thomas JE, Sem DS. An *in vitro* spectroscopic analysis to determine whether parachloroaniline is produced from mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. J Endod. 2010; 36(2): 315-7.
224. Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM *et al.* Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. J Endod. 2011; 37(8): 1109-15.

225. Tronstad L, Kreshtool D, Barnett F. Microbiological monitoring and results of treatment of extraradicular endodontic infection. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 6(3): 129-36.
226. Tsuji K, Martin PA, Bussey DM. Automation of chromogenic substrate *Limulus* amoebocyte lysate assay method for endotoxin by robotic system. *Appl Environ Microbiol.* 1984; 48(3): 550-5.
227. Usman N, Baumgartner JC, Marshall JG. Influence of instrument size on root canal debridement. *J Endod.* 2004; 30(2): 110-2.
228. Vaara M, Nikaido H. Outer membrane organization. In: Rietschel ET. ed. *Handbook of Endotoxin.* Amsterdam: ELSEVIER; 1984. v. 1. p. 1-45.
229. Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules *in vitro*. *Endod Dent Traumatol.* 1993; 9(6): 243-8.
230. Vahid A, Roohi N, Zayeri F. A comparative study of four rotary NiTi instruments in preserving canal curvature, preparation time and change of working length. *Aust Endod J.* 2009; 35(2): 93-97.
231. Valera MC, Rego JM, Jorge AOC. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. *J Endod.* 2001; 27(6): 401-3.
232. Valera MC, Silva KC, Maekawa LE, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Camargo CH *et al.* Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17(6): 55-9.
233. Valera MC, Rosa JA, Maekawa LE, Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY *et al.* Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 110(4): 70-4.
234. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(1): 79-84.
235. Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontics infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2005a; 20(4): 253-8.

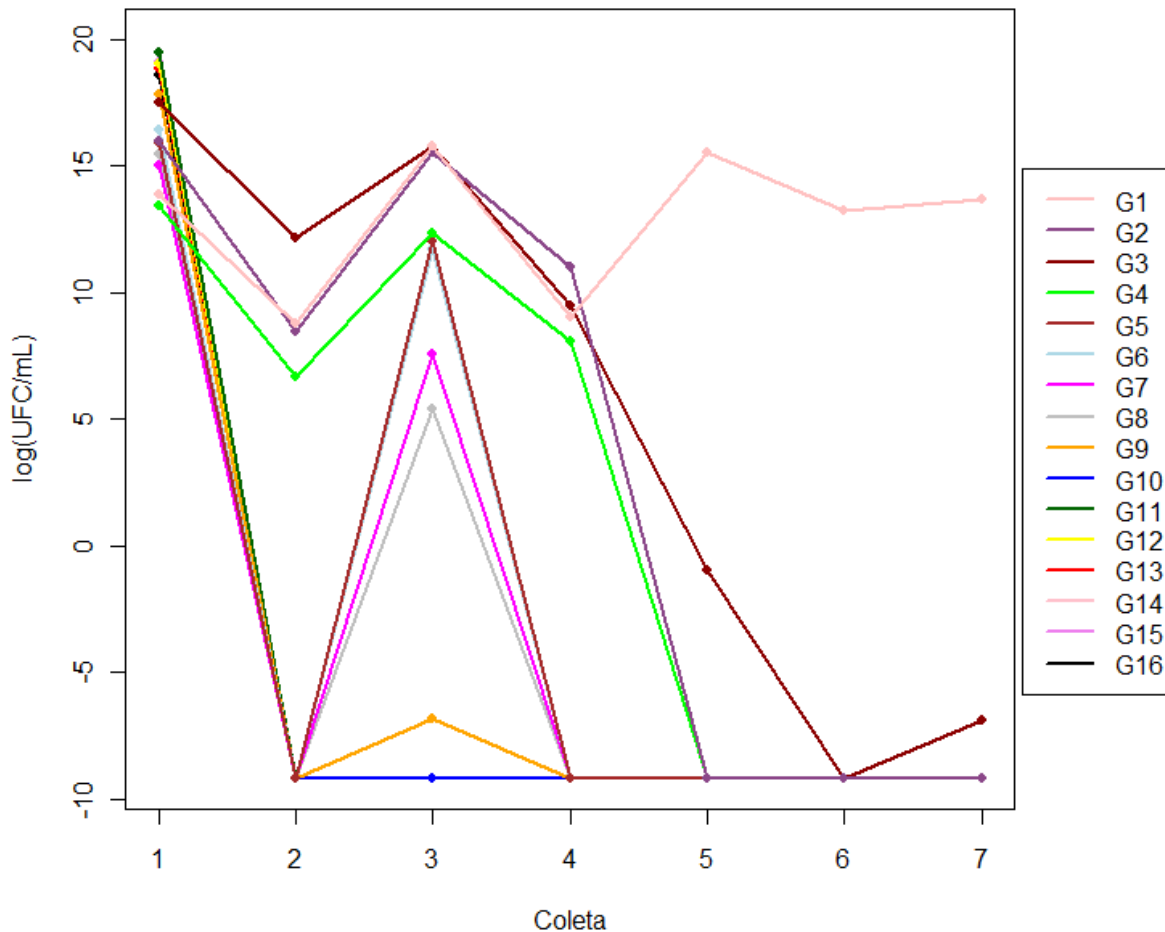
236. Vianna ME, Gomes BP, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FJ. *In vitro* evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. *Braz Dent J.* 2005b; 16(3): 175-80.
237. Vianna ME, Horz HP, Gomes BPF, Conrads G. *In vivo* evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J.* 2006a; 39(6): 484-92.
238. Vianna ME, Gomes BPF, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Avaliação *in vitro* do efeito dos procedimentos endodônticos sobre microrganismos e LPS. In: Anais da 23^a Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2006. Águas de Lindóia. São Paulo: SBPqO; 2006b. p. 161. [Resumo Pa084].
239. Vianna ME, Conrads G, Gomes BPF, Horz HP. Identification and quantification of Archaea involved in primary endodontic infection. *J Clin Microb.* 2006c; 44(4): 1274-82.
240. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BPF. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(6): 411-8.
241. Vianna ME, Gomes BP. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107(4): 585-9.
242. Vianna ME, Conrads G, Gomes BPF, Horz HP. T-RFLP-based *mcrA* gene analysis of methanogenic archaea in association with oral infections and evidence of a novel *Methanobrevibacter* phylotype. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(5): 417-22.
243. Vivacqua-Gomes N, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. *Int Endod J.* 2002; 35(9): 791-5.
244. Waltimo TM, Sirén E, Torkko H, Olsen I, Haapasalo M. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997; 30(2): 96-101.
245. Waltimo TM, Ørstavik D, Siren EK, Haapasalo MP. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J.* 1999; 32(6): 421-9.

246. Waltimo TMT, Ørstavik D, Sirén EK, Haapasalo MPP. *In vitro* yeast infection of human dentin. *J Endod.* 2000; 26(4): 207-9.
247. Watson T. Applications of high speed confocal imaging techniques in operative dentistry. *Scanning.* 1994; 16(3): 168-73.
248. Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. *J Endod.* 2003; 29(9): 562-4.
249. Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M, Hashioka K, Horiba N, Nakamura H. Endotoxin and Gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. *J Endod.* 1992; 18(10): 501-4.
250. Yamashita JC, Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA. Scanning electron microscopic study of the cleaning ability of chlorhexidine as a root-canal irrigant. *Int Endod J.* 2003; 36(6): 391-4.
251. Yelsilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod.* 1995; 21(10): 513-5.
252. Yeung SY, Huang CS, Chan CP, Lin CP, Lee PH, Jia HW *et al.* Antioxidant and pro-oxidant properties of chlorhexidine and its interaction with calcium hydroxide solutions. *Int Endod J.* 2007; 40(11): 837-44.
253. Young GR, Parashos P, Messer H. The principles of techniques for cleaning root canals. *Aust Dent J Supp.* 2007; 52:(1 Suppl): S52-S63.
254. Young NS, Levin J, Prendergast RA. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mediation. *J Clin Invest.* 1972; 51(7): 1790-7.
255. Zamany A, Safavi K, Spangberg LS. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96(5): 578-81.
256. Zapata RO, Bramante CM, Moraes IG, Bernardineli N, Gasparoto TH, Graeff MSZ *et al.* Confocal laser scanning microscopy is appropriated to detect viability of *Enterococcus faecalis* in infected dentine. *J Endod.* 2008; 34(10): 1198-201.
257. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006; 32(5): 389-98.

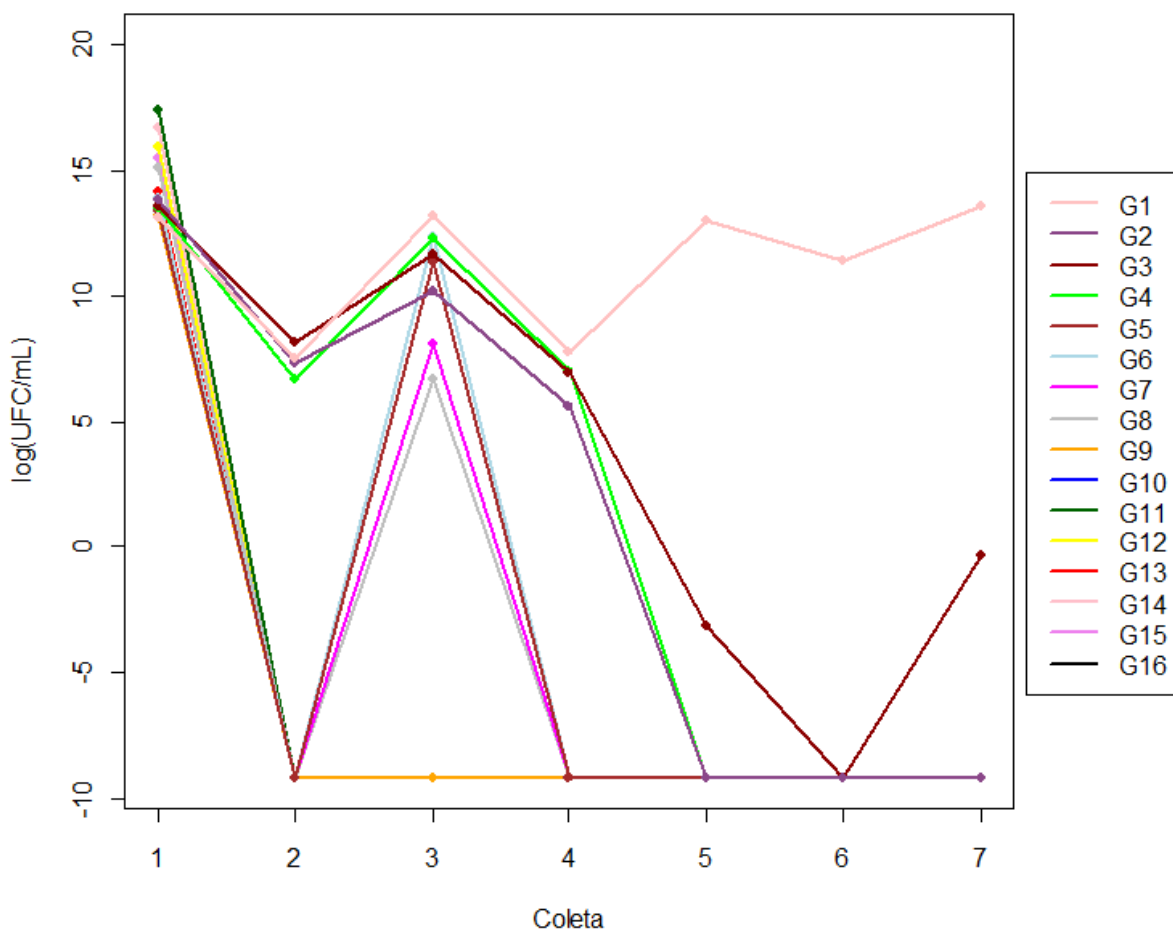
258. Zoletti GO, Siqueira JF Jr, Santos BS. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and independent approaches. J Endod. 2006; 32(8): 722-26.

APÊNDICE

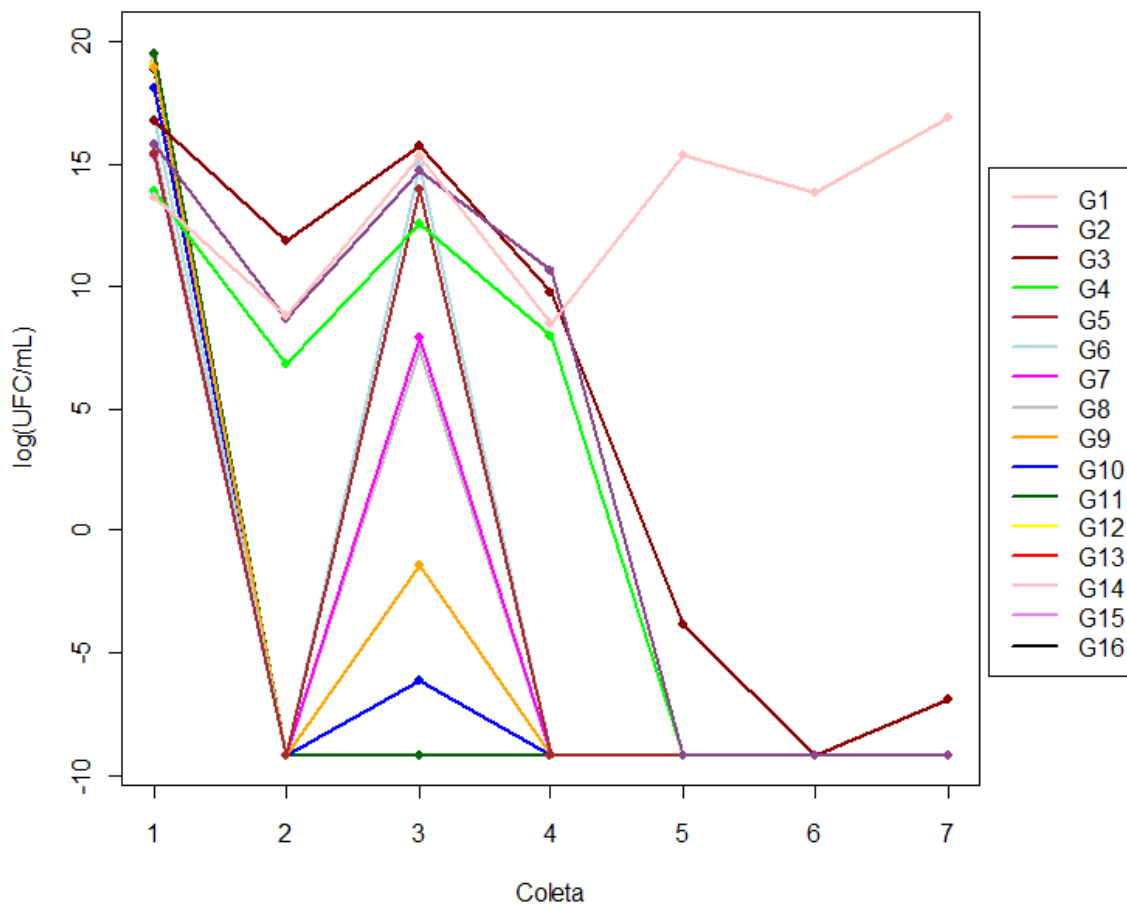
Apêndice I – Análise microbiológica clássica (cultura)



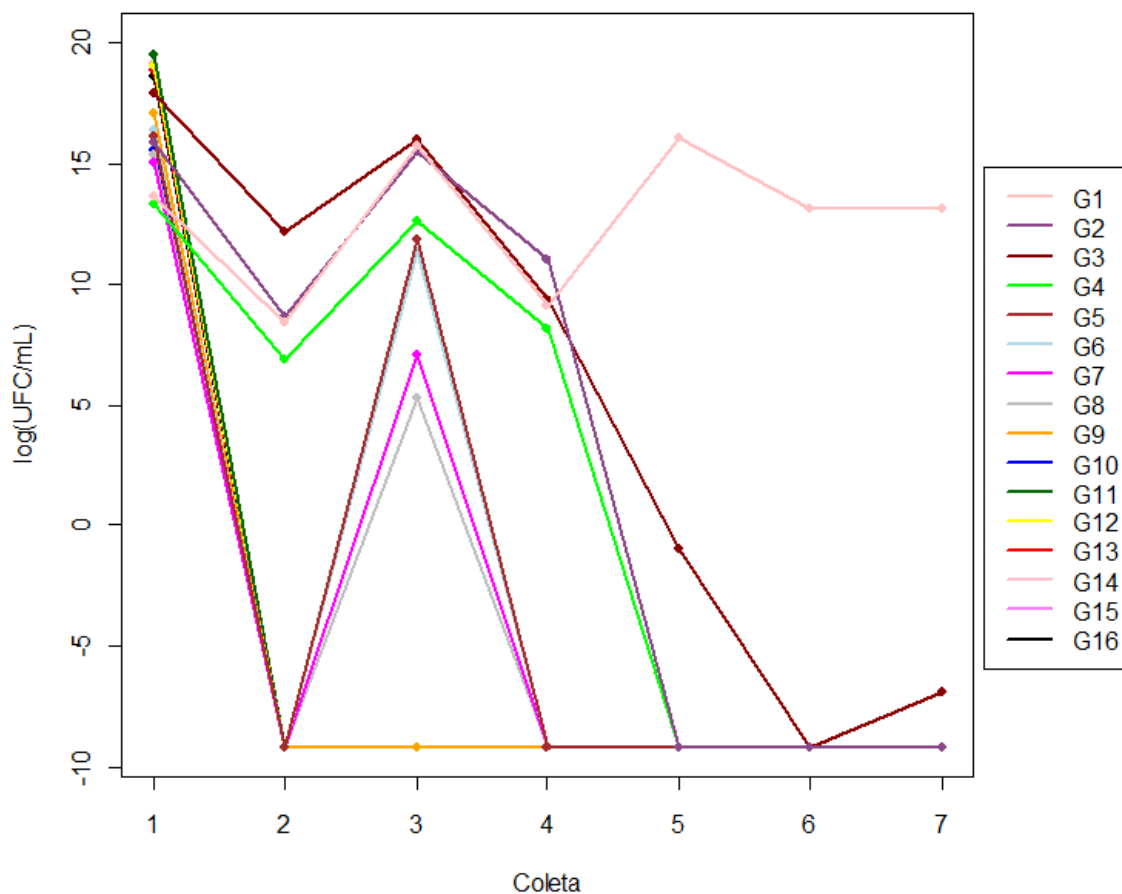
Perfis médios dos resultados da metodologia de cultura dos 16 grupos ao longo das 7 coletas. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)



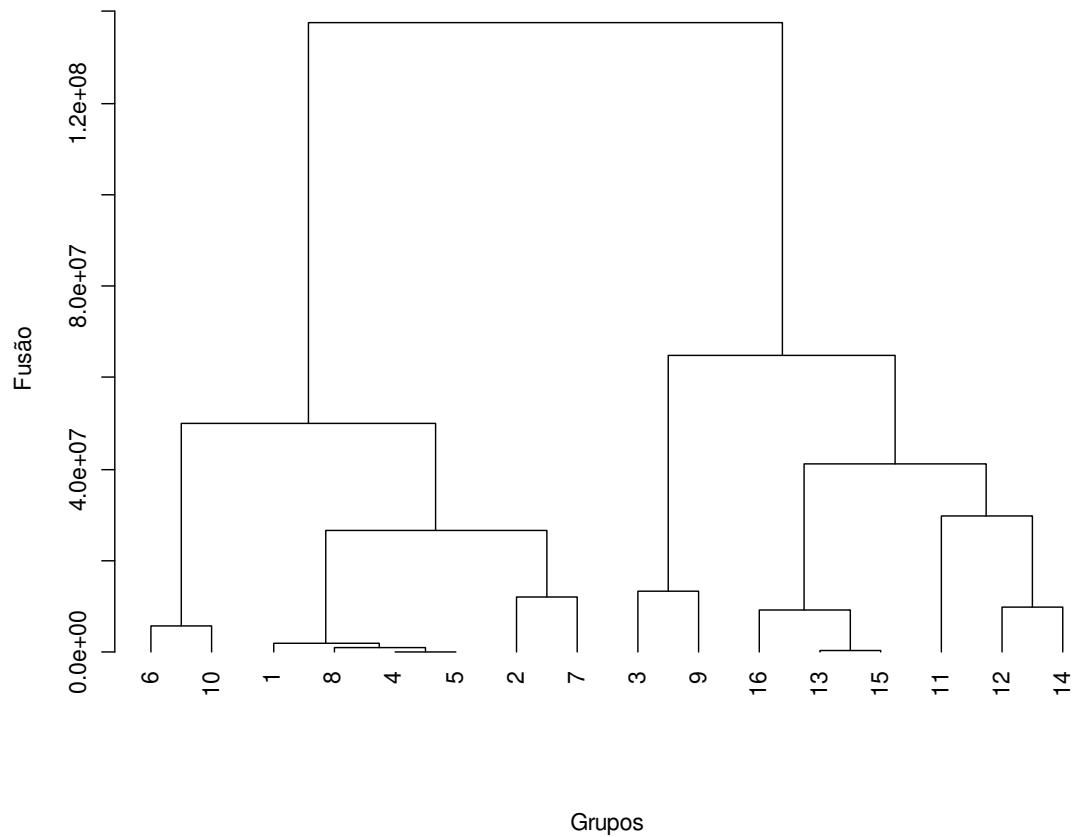
Perfis médios da metodologia de cultura dos 16 grupos ao longo das 7 coletas, considerando *C. albicans*. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)



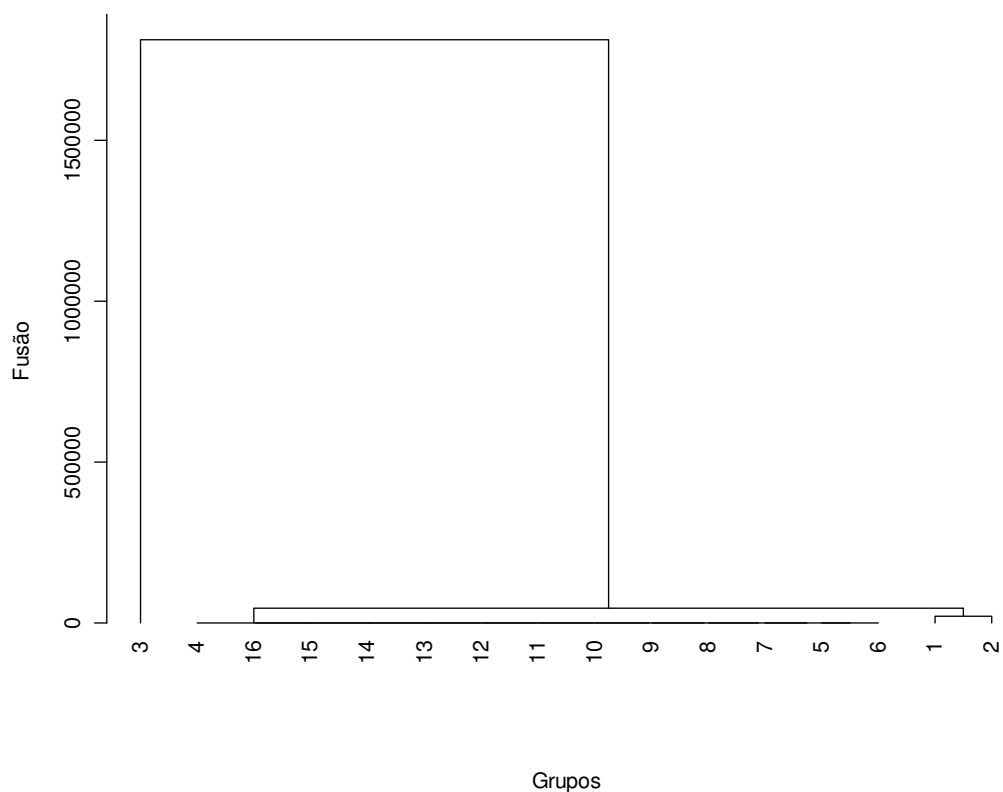
Perfis médios da metodologia de cultura dos 16 grupos ao longo das 7 coletas, considerando *E. coli*. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)



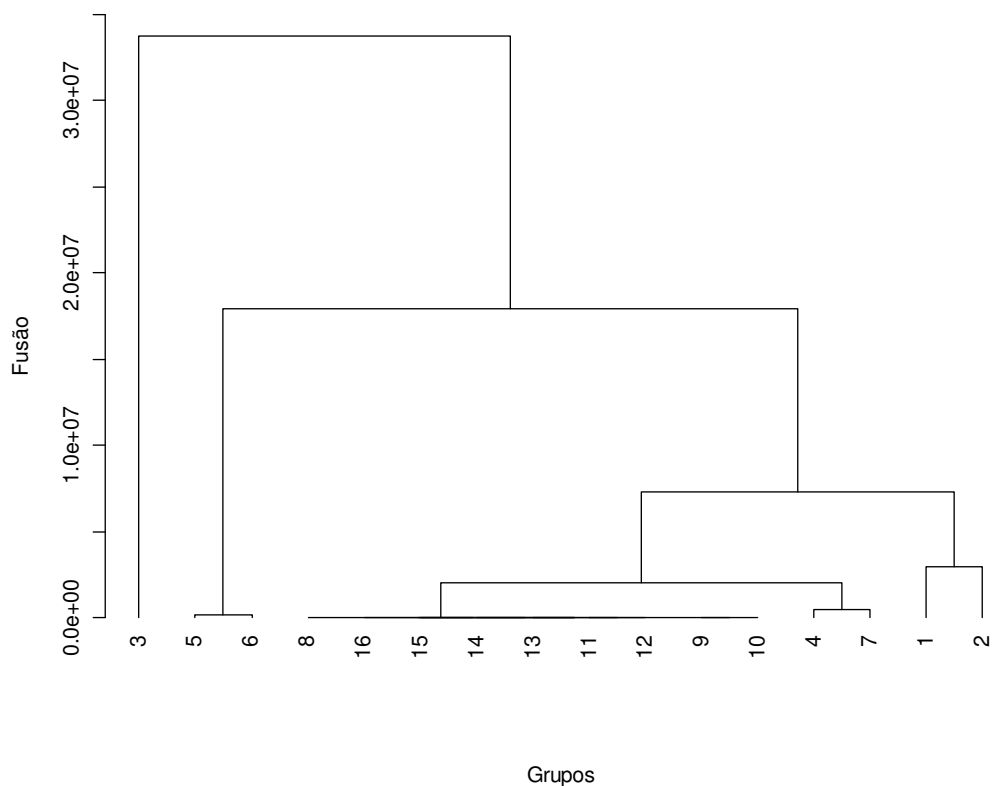
Perfis médios da metodologia de cultura dos 16 grupos ao longo das 7 coletas, considerando *E. faecalis*. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)



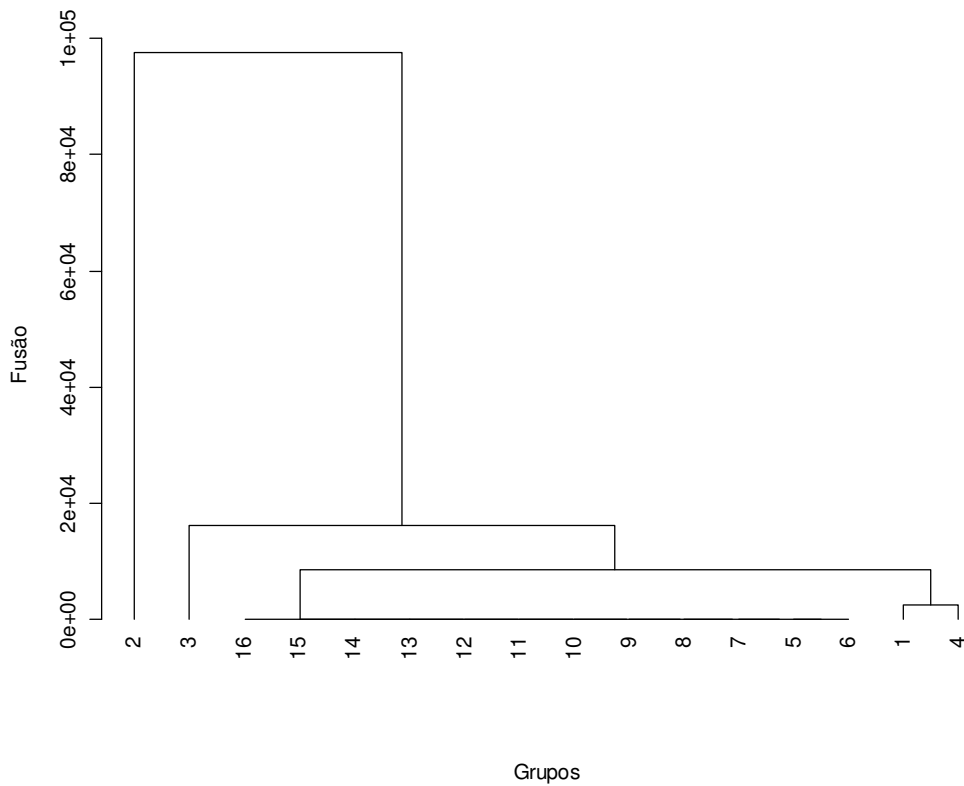
Dendrograma dos 16 grupos considerando coleta 1 da metodologia de cultura, utilizando a distância euclidiana e o método hierárquico das médias das distâncias. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)



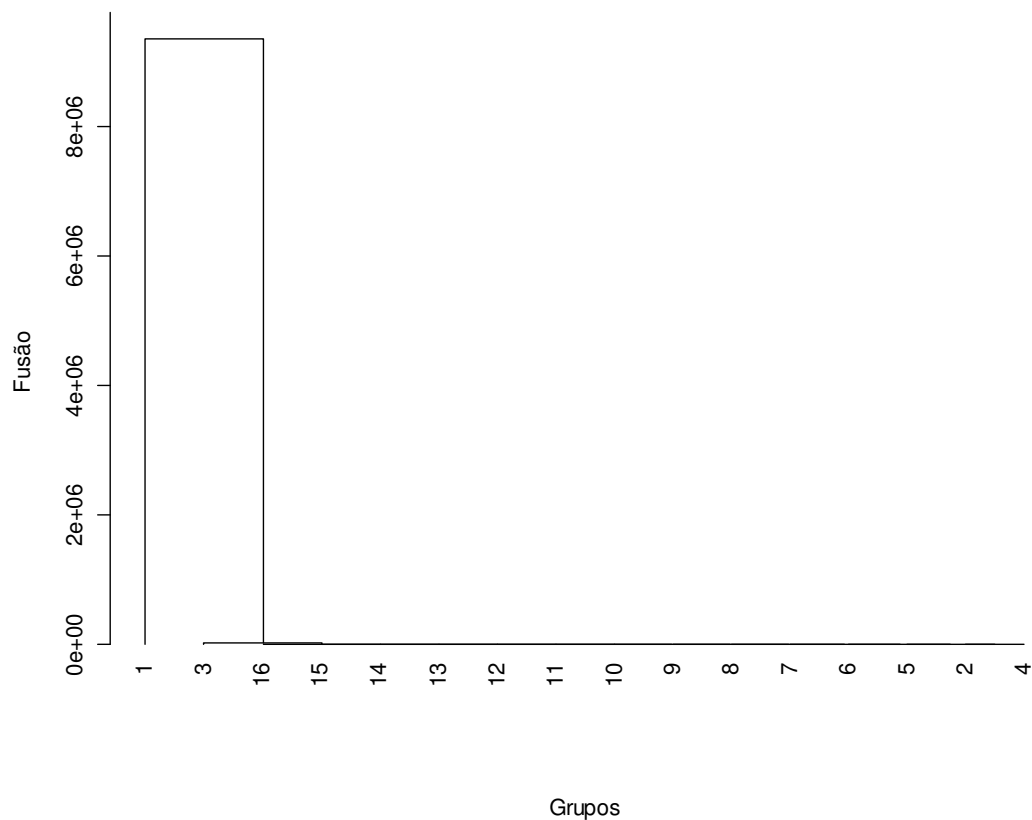
Dendrograma dos 16 grupos considerando coleta 2 da metodologia de cultura, utilizando a distância euclidiana e o método hierárquico das médias das distâncias. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)



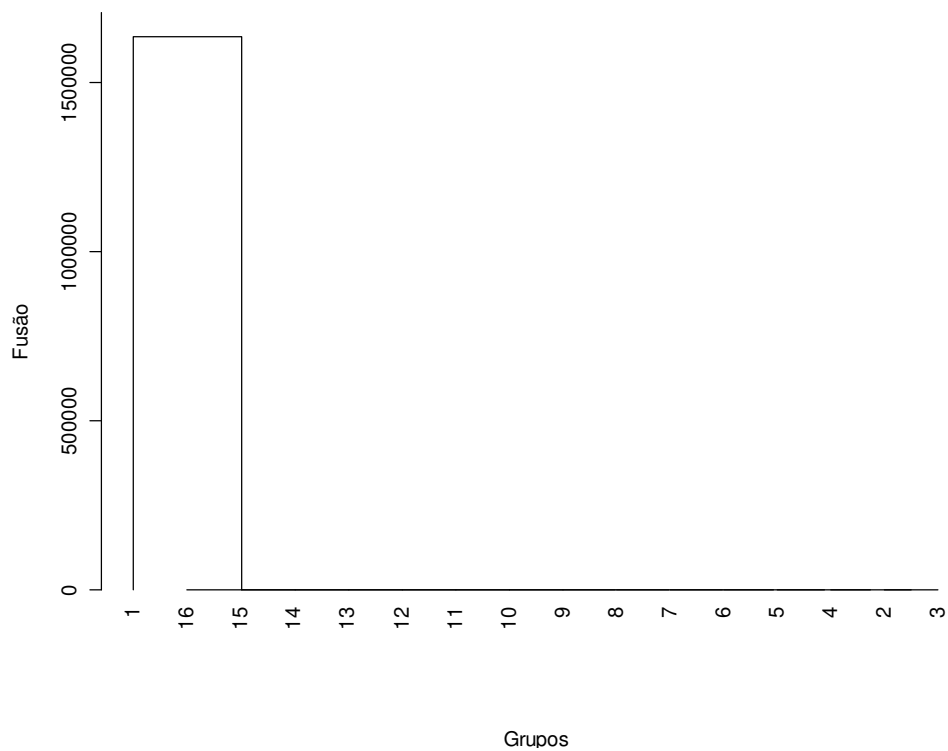
Dendrograma dos 16 grupos considerando coleta 3 da metodologia de cultura, utilizando a distância euclidiana e o método hierárquico das médias das distâncias. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)



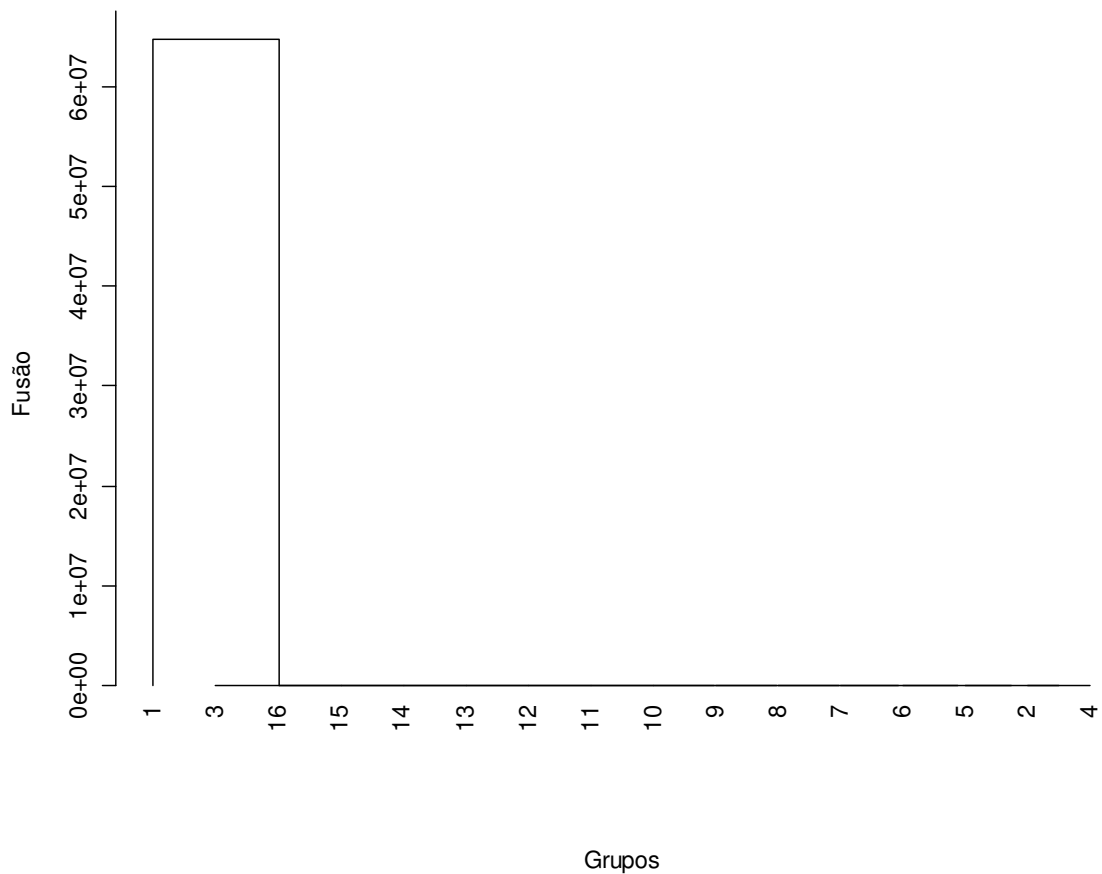
Dendrograma dos 16 grupos considerando coleta 4 da metodologia de cultura, utilizando a distância euclidiana e o método hierárquico das médias das distâncias. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)



Dendrograma dos 16 grupos considerando coleta 5 da metodologia de cultura, utilizando a distância euclidiana e o método hierárquico das médias das distâncias. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)

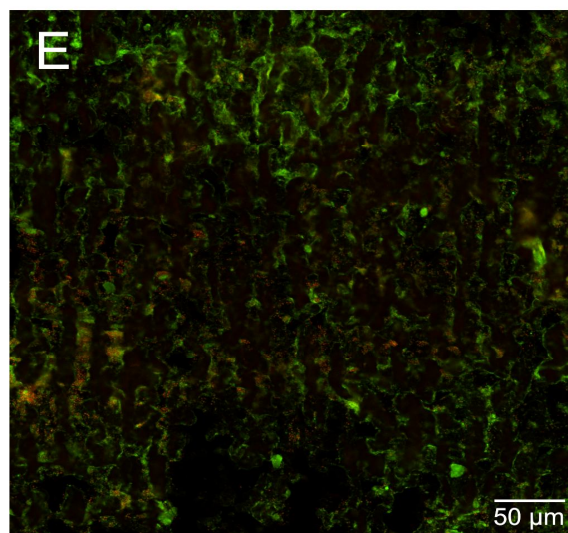
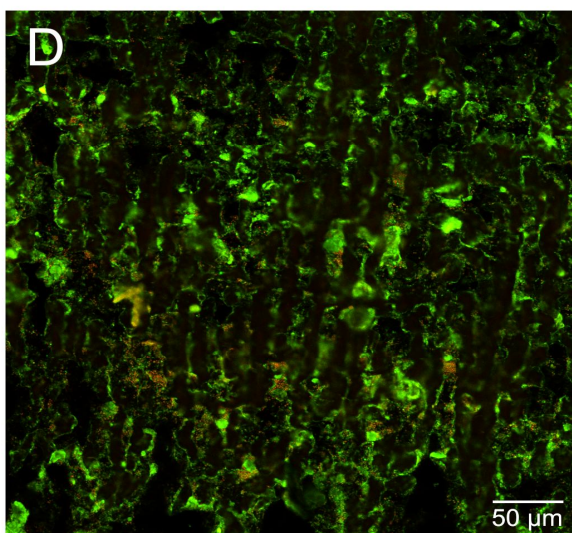
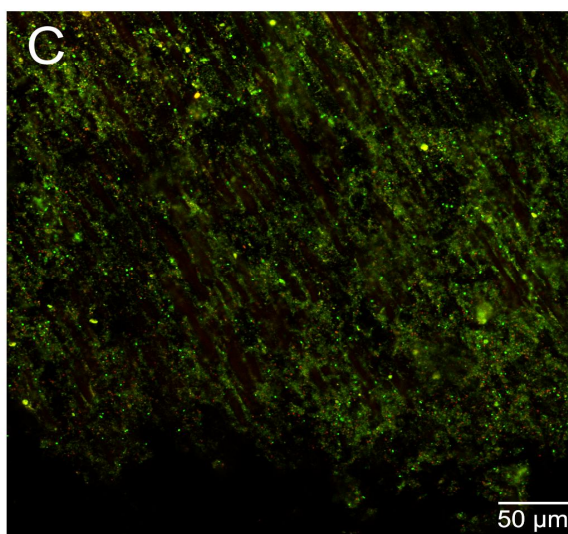
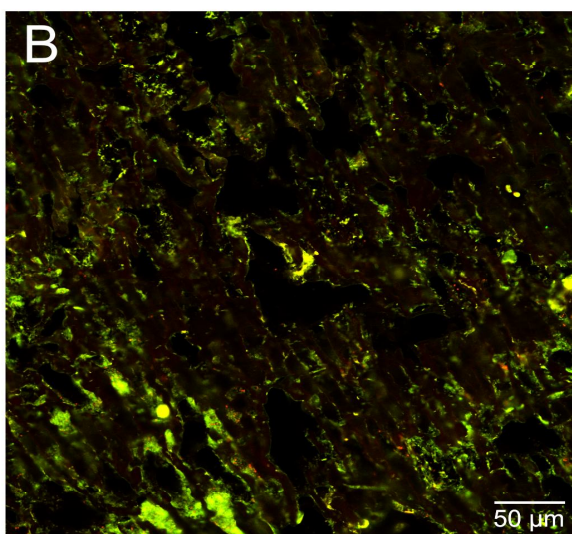
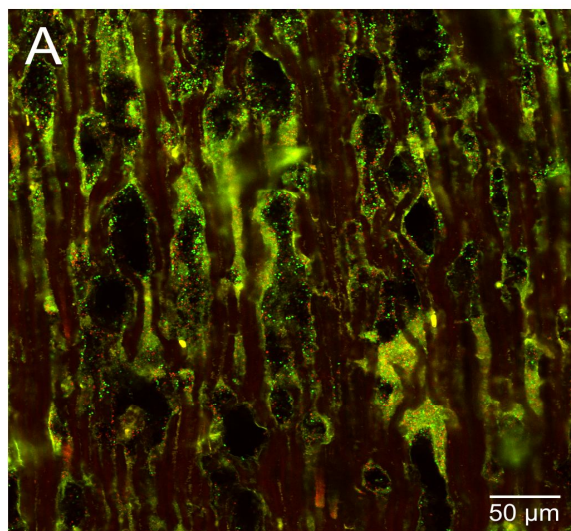


Dendrograma dos 16 grupos considerando coleta 6 da metodologia de cultura, utilizando a distância euclidiana e o método hierárquico das médias das distâncias. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)

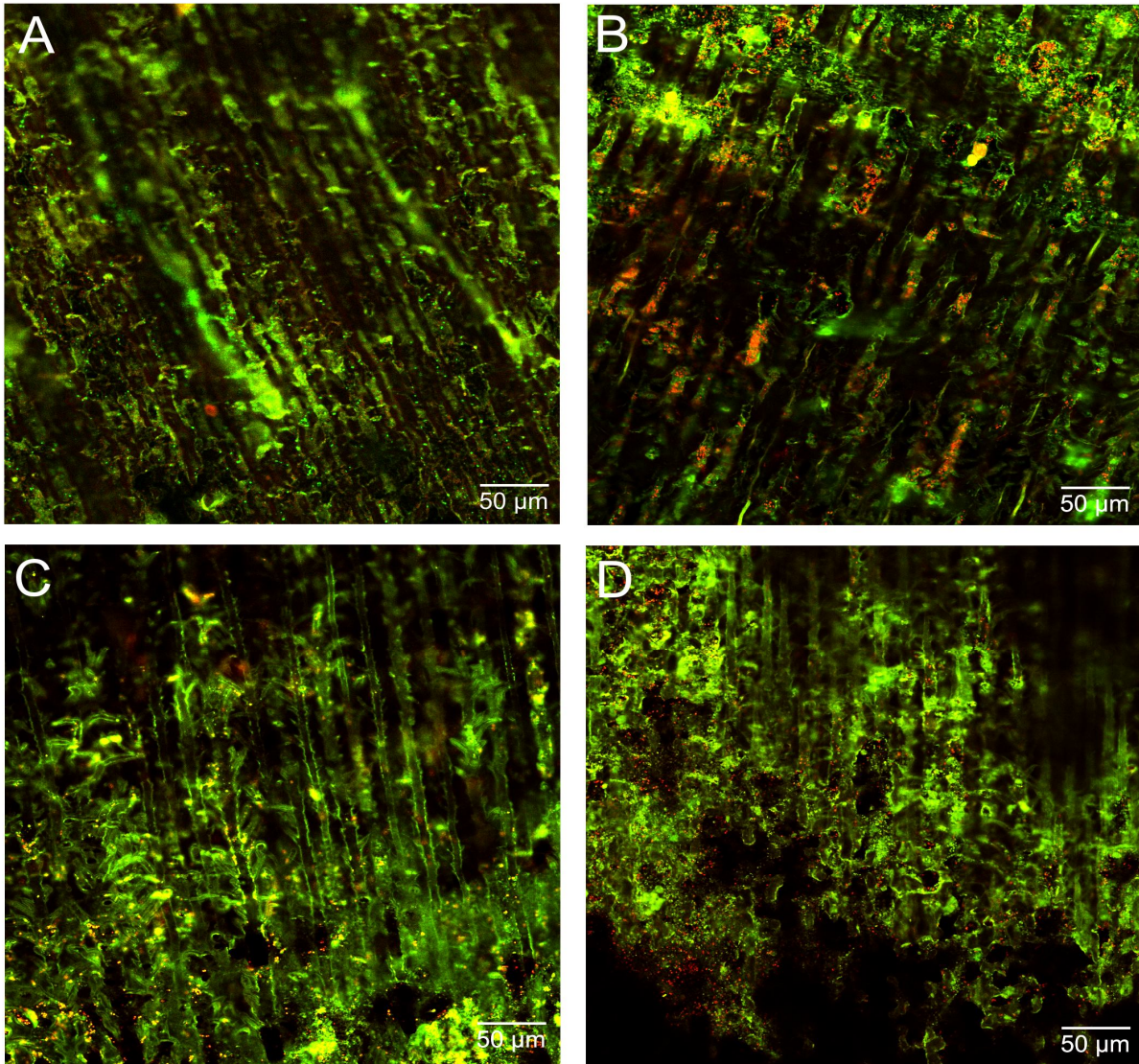


Dendrograma dos 16 grupos considerando coleta 7 da metodologia de cultura, utilizando a distância euclidiana e o método hierárquico das médias das distâncias. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)

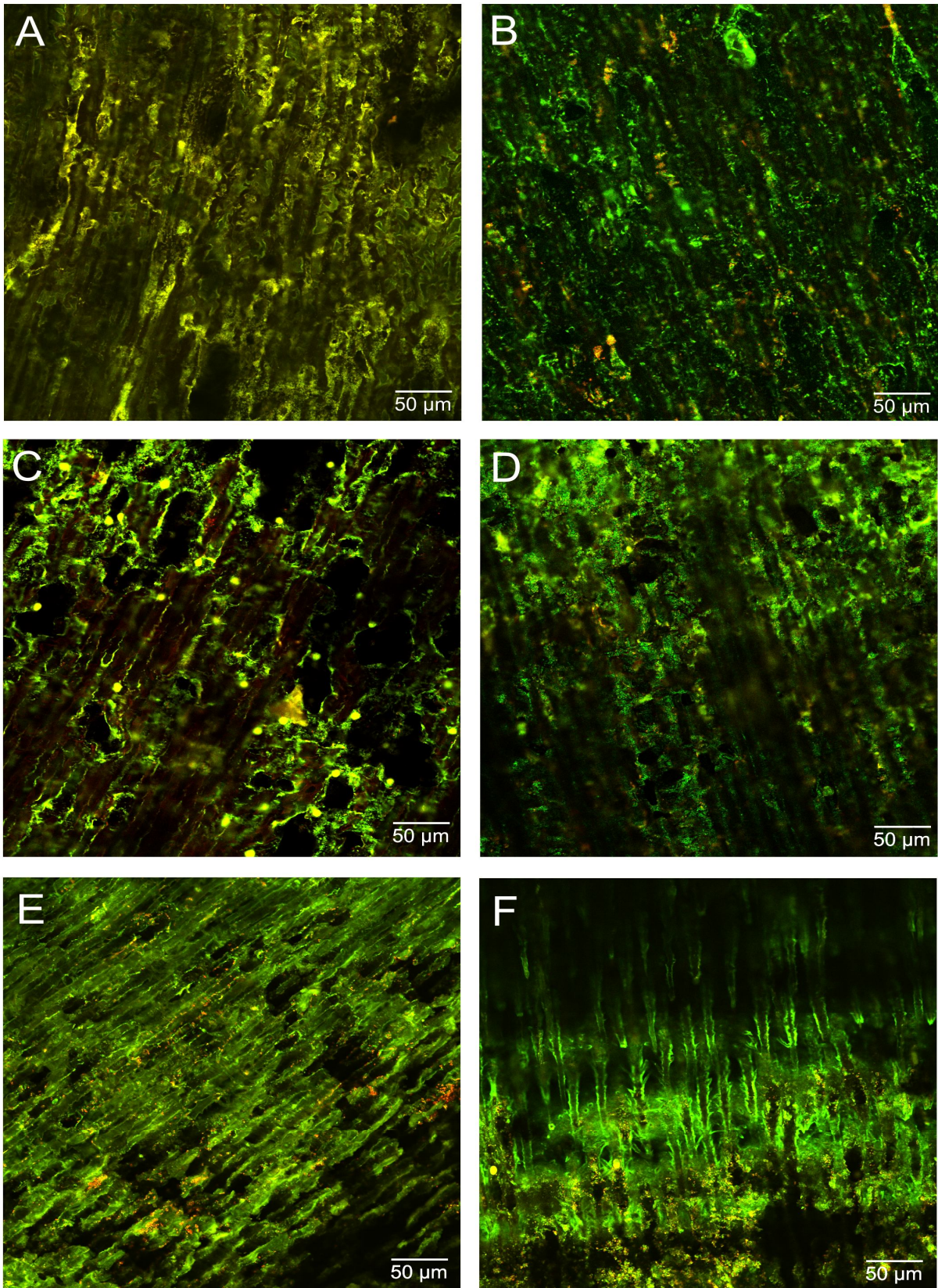
Apêndice II – Análise microbiológica por microscopia confocal



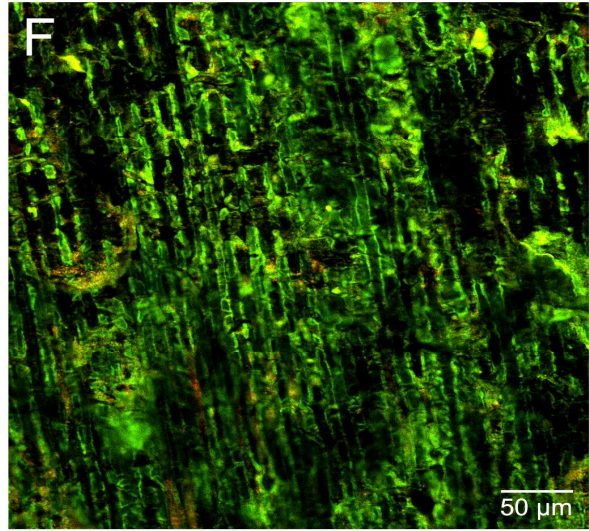
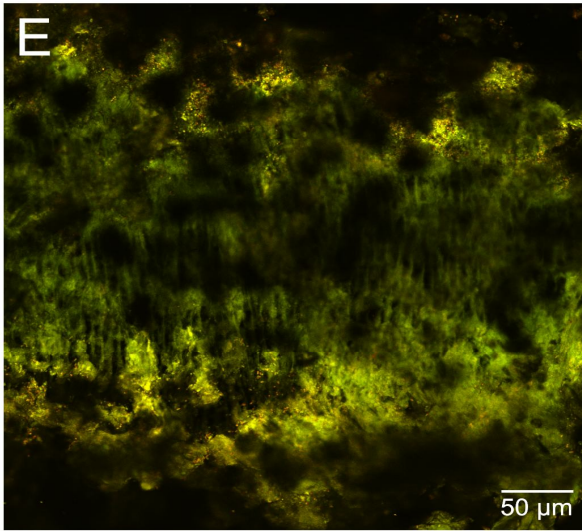
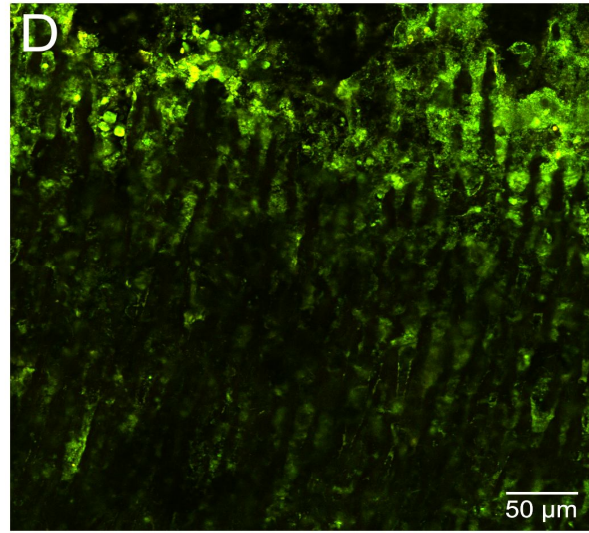
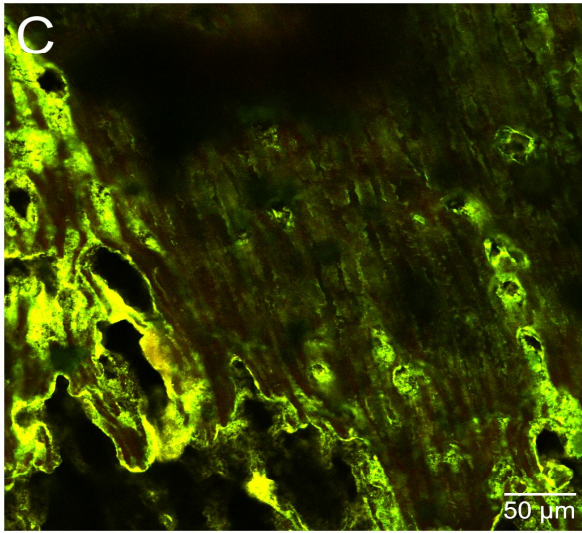
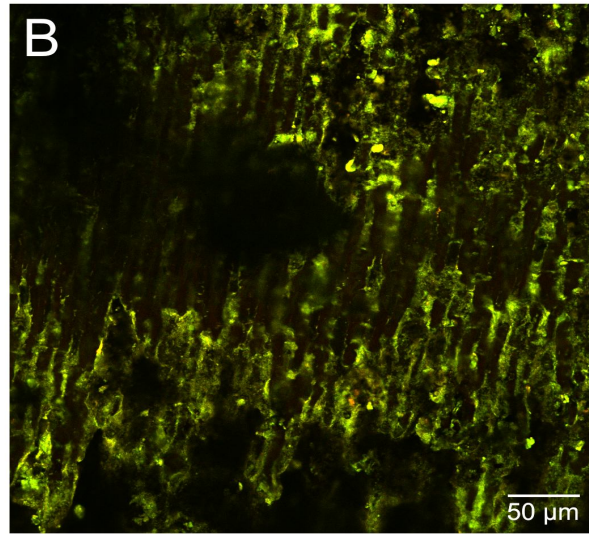
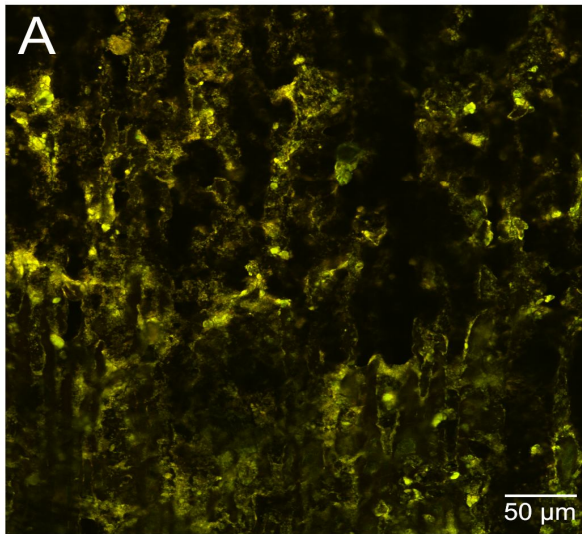
Fotomicrografias em MCVL representativas do grupo imediato. A) Controle positivo (ausência de tratamento); B) SF; C) SF, EDTA 17%; D) CLG 2%; E) CLG 2%, EDTA 17%



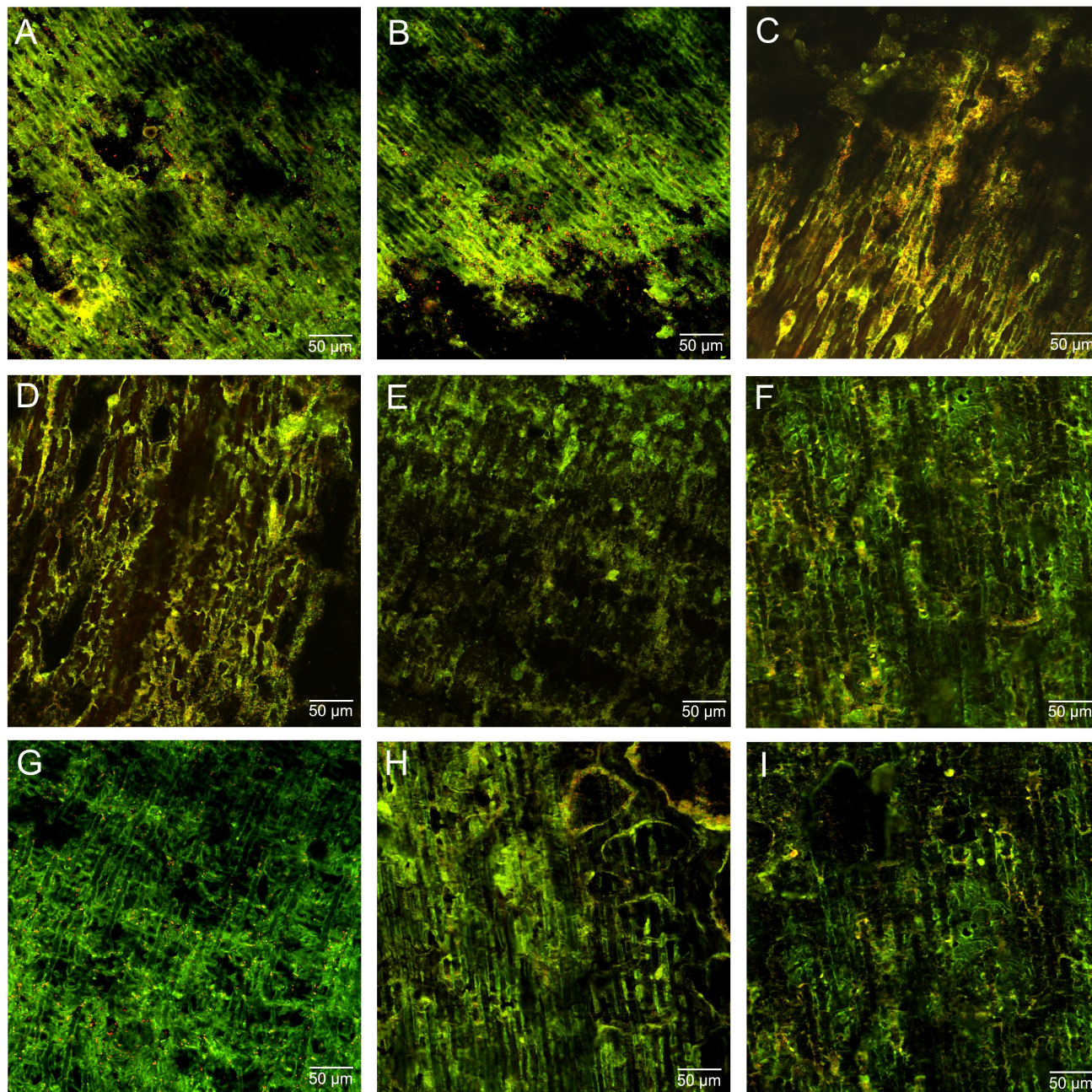
Fotomicrografias em MCVL representativas do grupo imediato. A) NaOCl 5,25%; B) NaOCl 5,25% + CLL 2%, EDTA 17%; C) NaOCl 5,25% + CLL 2%; D) NaOCl 5,25%, EDTA 17%



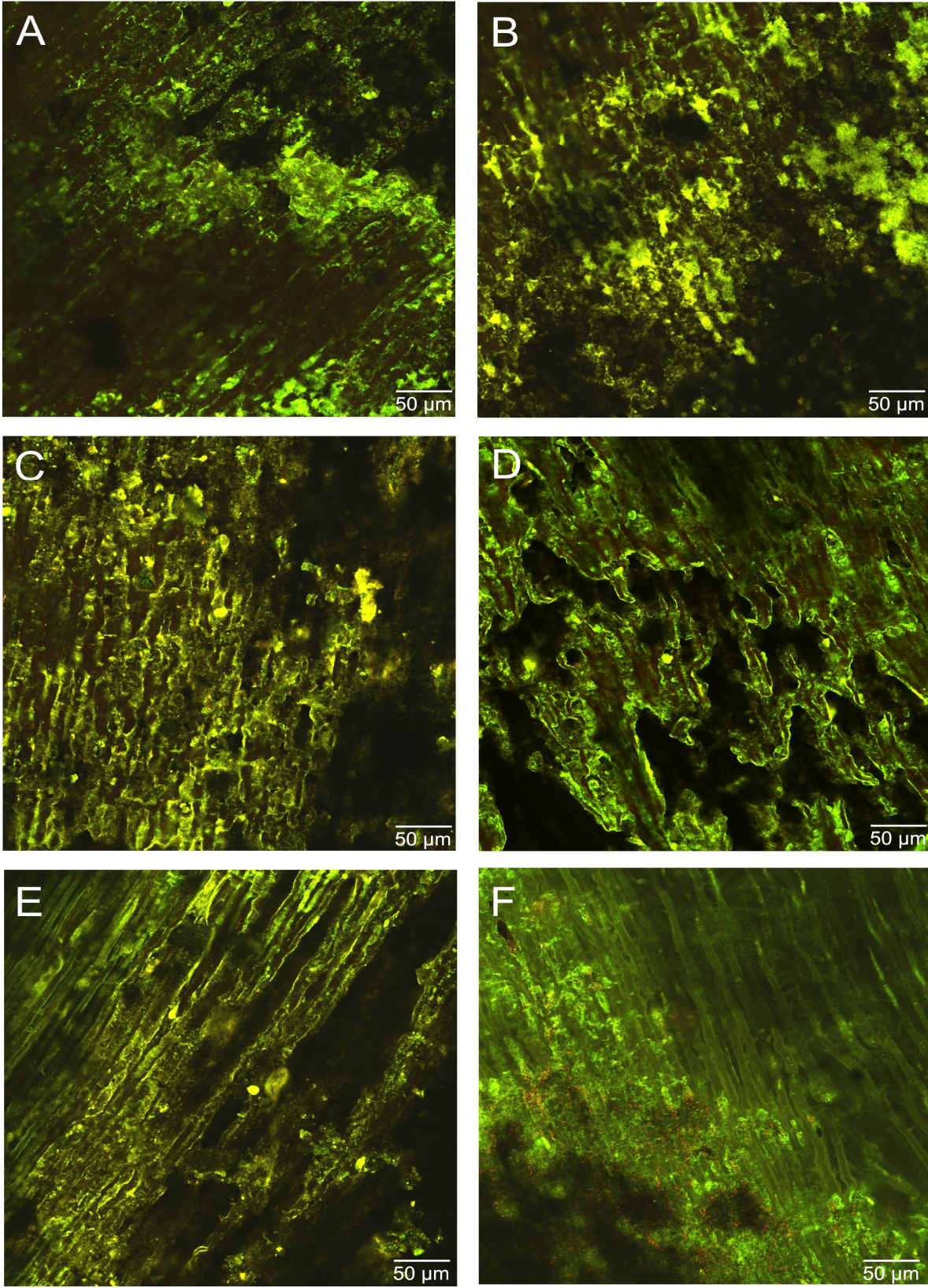
Fotomicrografias em MCVL representativas do grupo pós medicação (7 dias). A)SF, CLG 2%; B)SF, EDTA 17%, CLG 2%; C)SF, HC+SF; D)SF, EDTA 17%, HC+SF; E)SF, HC+CLG 2%; F)SF, EDTA 17%, HC + CLG 2%



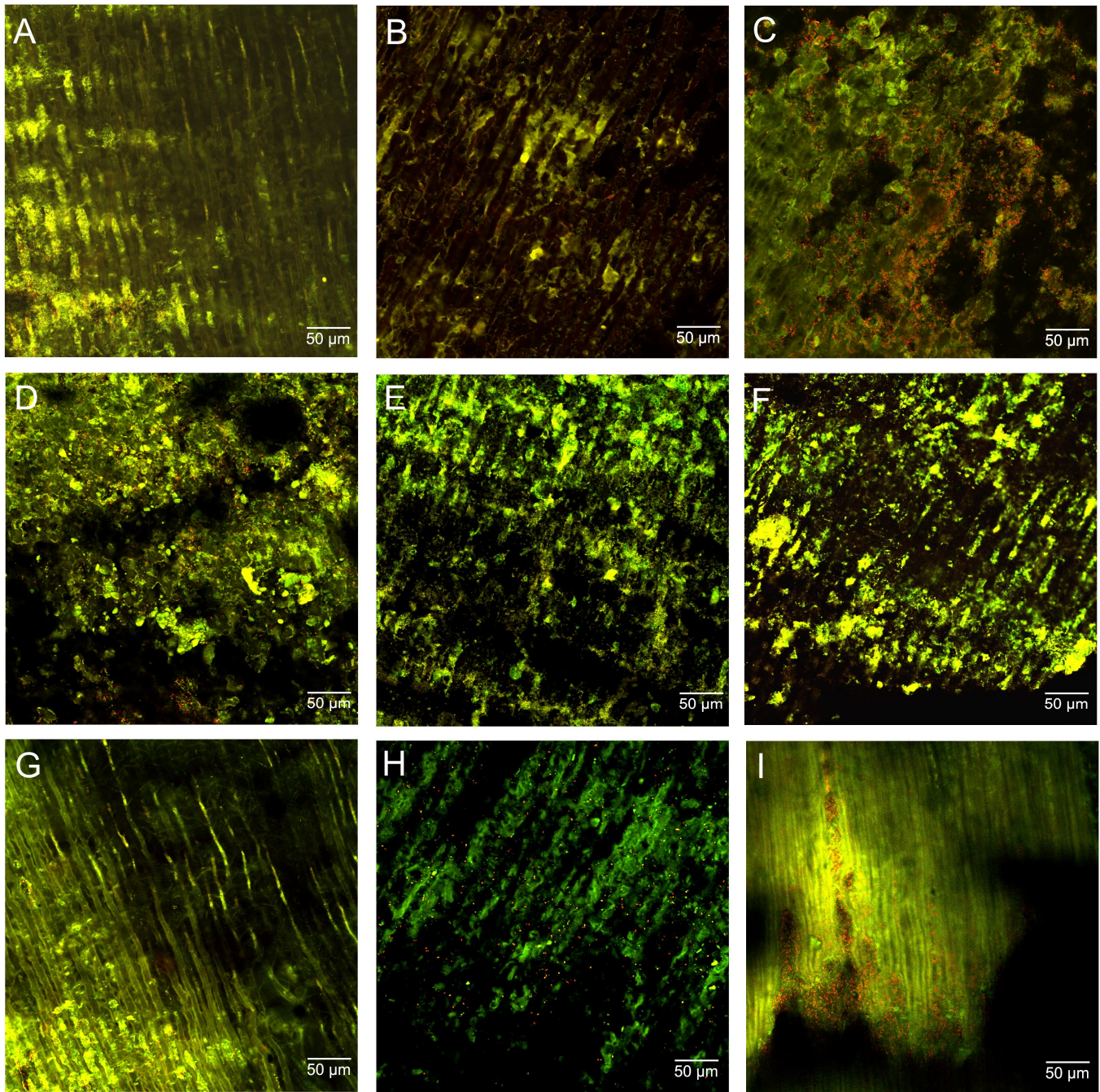
Fotomicrografias em MCVL representativas do grupo pós medicação (14 dias). A)SF, CLG 2%; B) SF, EDTA 17%, CLG 2%; C)SF, HC+SF; D)SF, EDTA 17%, HC+SF; E)SF, HC + CLG 2%; F) SF, EDTA 17%, HC + CLG 2%



Fotomicrografias em MCVL representativas do grupo pós medicação (14 dias). A) CLG 2%, EDTA 17%, CLG 2%; B) CLG 2%, EDTA 17%, HC+SF; C) CLG 2%, EDTA 17%, HC + CLG 2%; D) NaOCl 5,25%, EDTA 17%, CLG 2%; E) NaOCl 5,25%, EDTA 17%, HC+SF; F) NaOCl 5,25%, EDTA 17%, HC + CLG 2%; G) NaOCl 5,25%, CLL 2%, EDTA 17%, CLG 2%; H) NaOCl 5,25%, CLL 2%, EDTA 17%, HC+SF; I) NaOCl 5,25%, CLL 2%, EDTA 17%, HC + CLG 2%

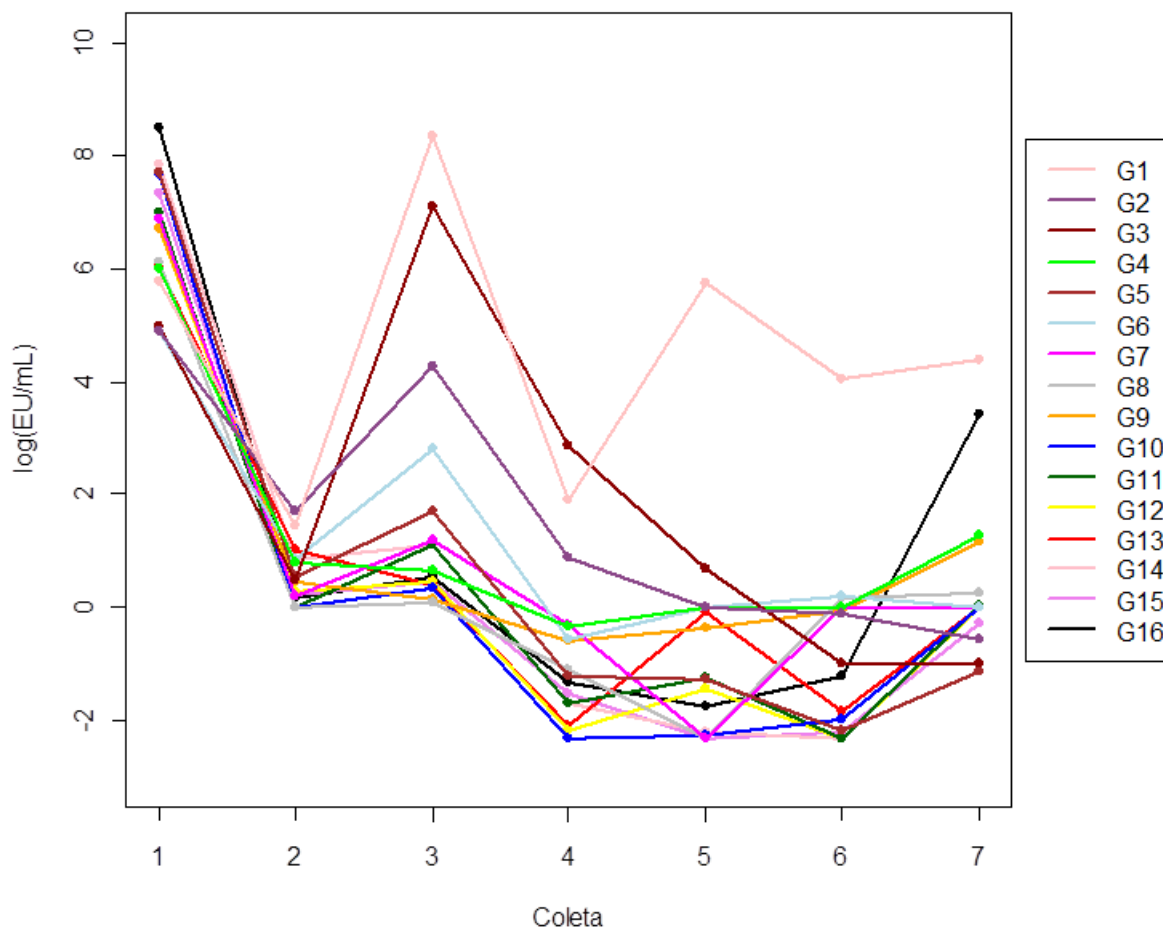


Fotomicrografias em MCVL representativas do grupo pós medicação (30 dias). A) SF, CLG 2%; B) SF, EDTA 17%, CLG 2%; C) SF, HC+SF; D) SF, EDTA 17%, HC+SF; E) SF, HC + CLG 2%; F) SF, EDTA 17%, HC + CLG 2%

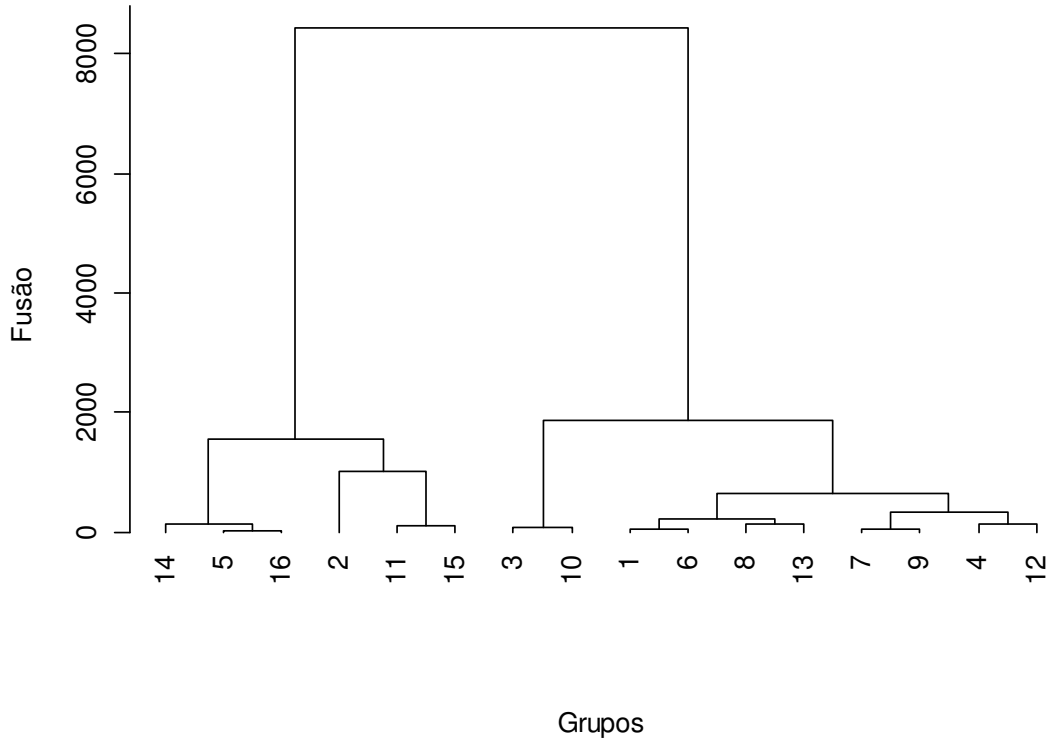


Fotomicrografias em MCVL representativas do grupo pós medicação (30 dias). A) CLG 2%, EDTA 17%, CLG 2%; B) CLG 2%, EDTA 17%, HC+SF; C) CLG 2%, EDTA 17%, HC + CLG 2%; D) NaOCl 5,25%, EDTA 17%, CLG 2%; E) NaOCl 5,25%, EDTA 17%, HC+SF; F) NaOCl 5,25%, EDTA 17%, HC + CLG 2%; G) NaOCl 5,25%, CLL 2%, EDTA 17%, CLG 2%; H) NaOCl 5,25%, CLL 2%, EDTA 17%, HC+SF; I) NaOCl 5,25%, CLL 2%, EDTA 17%, HC + CLG 2%

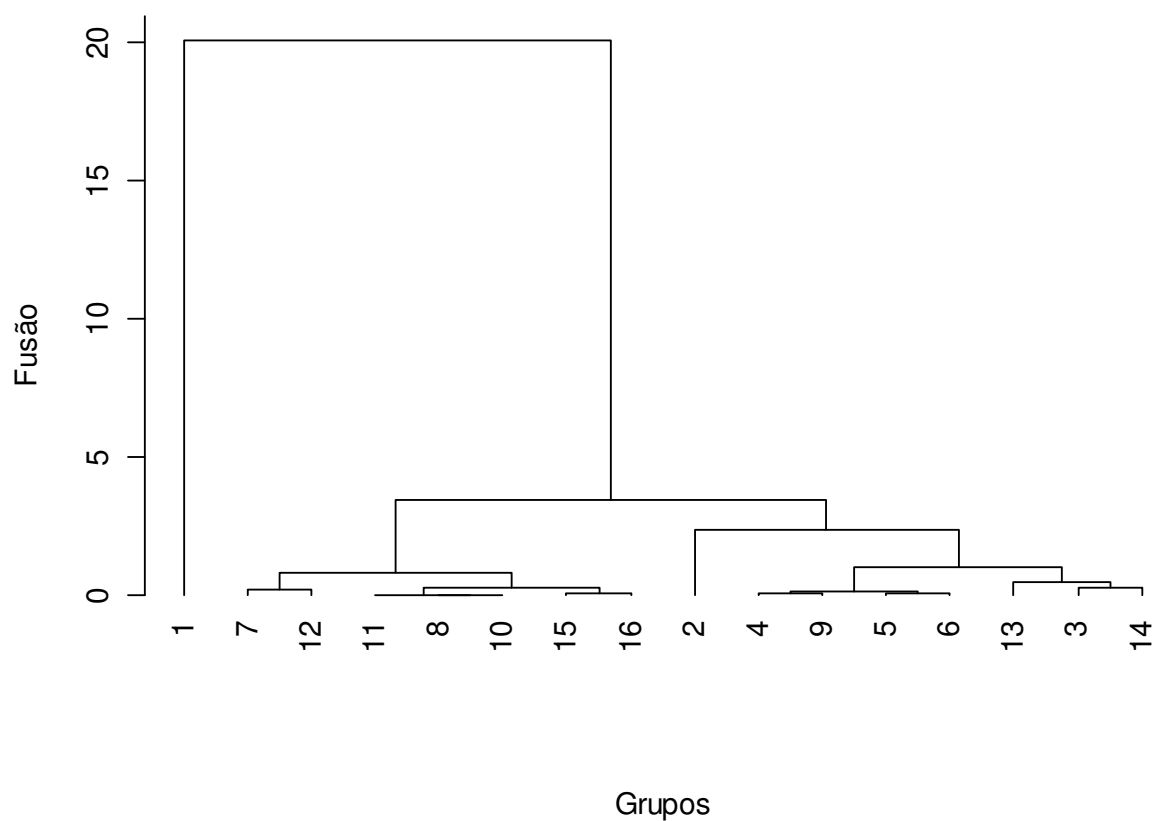
Apêndice III - Quantificação de endotoxina



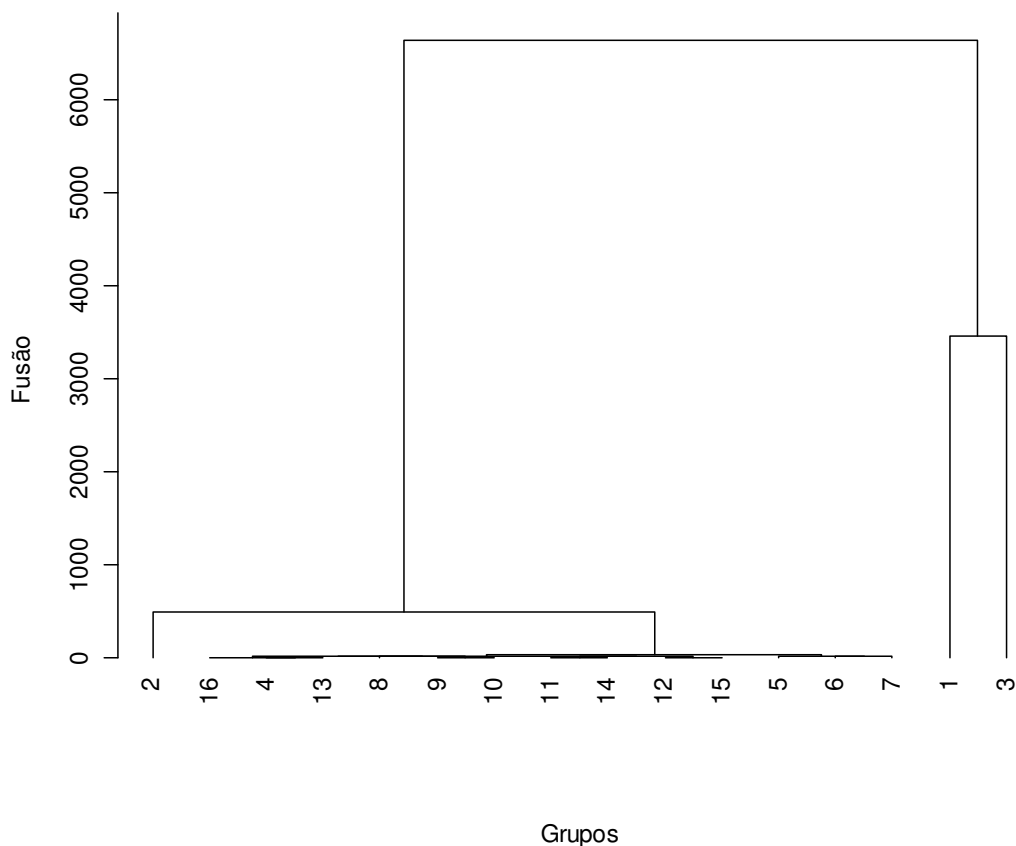
Perfis médios da metodologia de quantificação de endotoxina considerando os 16 grupos ao longo das 7 coletas. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)



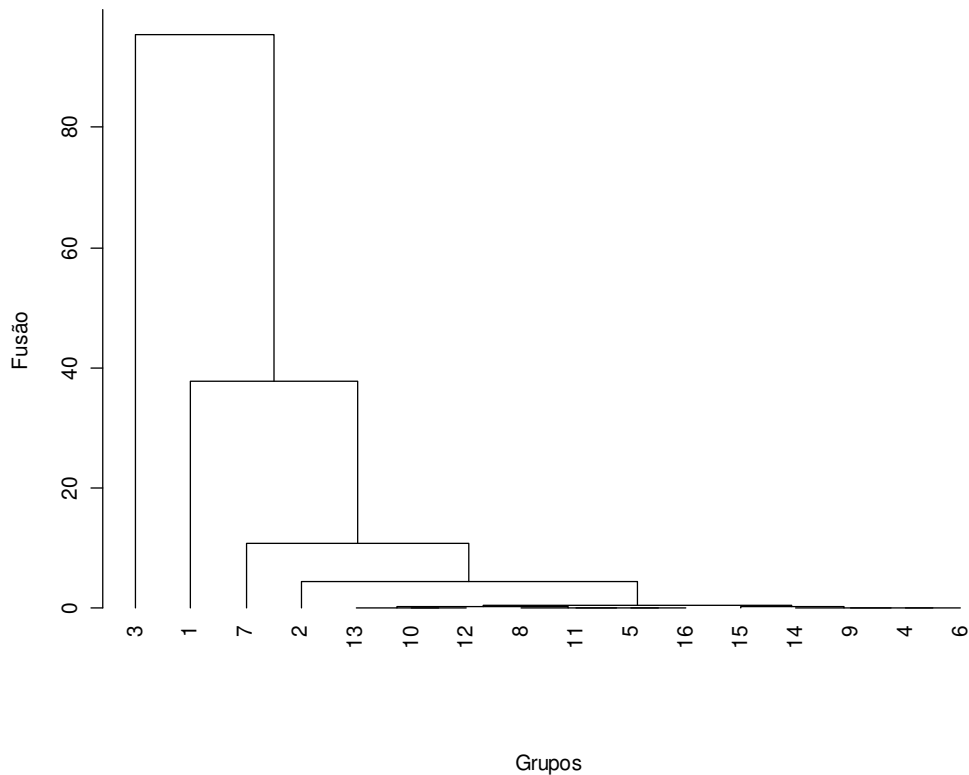
Dendrograma dos 16 grupos considerando coleta 1 da metodologia de quantificação de endotoxina, utilizando a distância euclidiana e o método hierárquico das médias das distâncias. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)



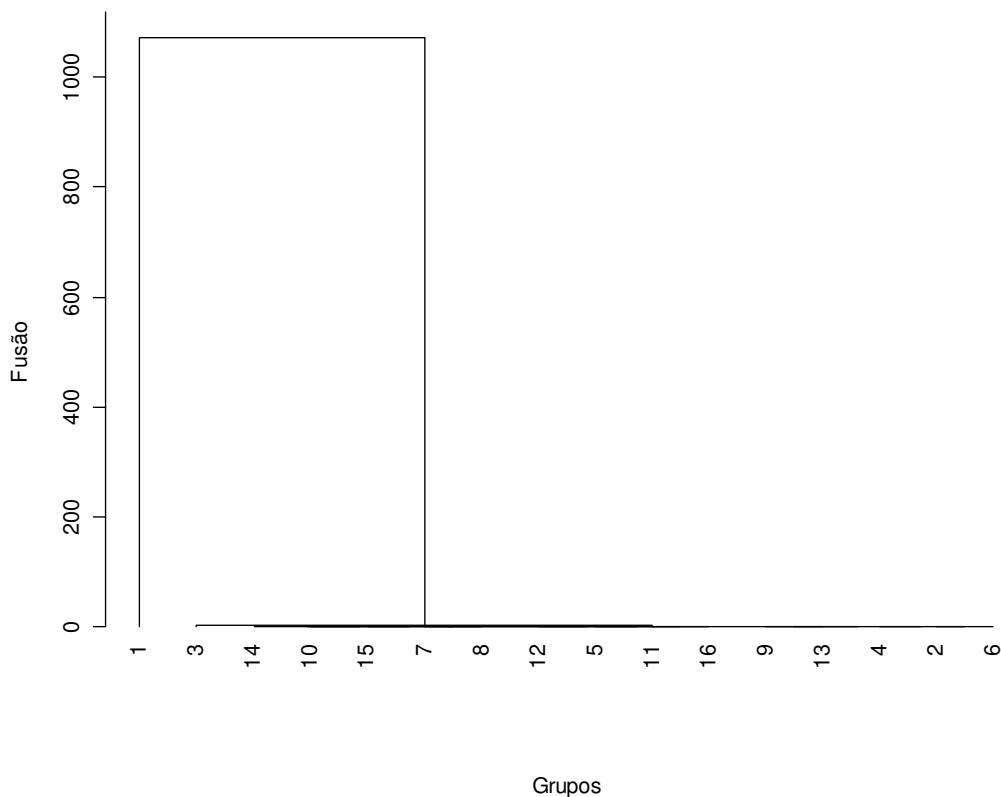
Dendrograma dos 16 grupos considerando coleta 2 da metodologia de quantificação de endotoxina, utilizando a distância euclidiana e o método hierárquico das médias das distâncias. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)



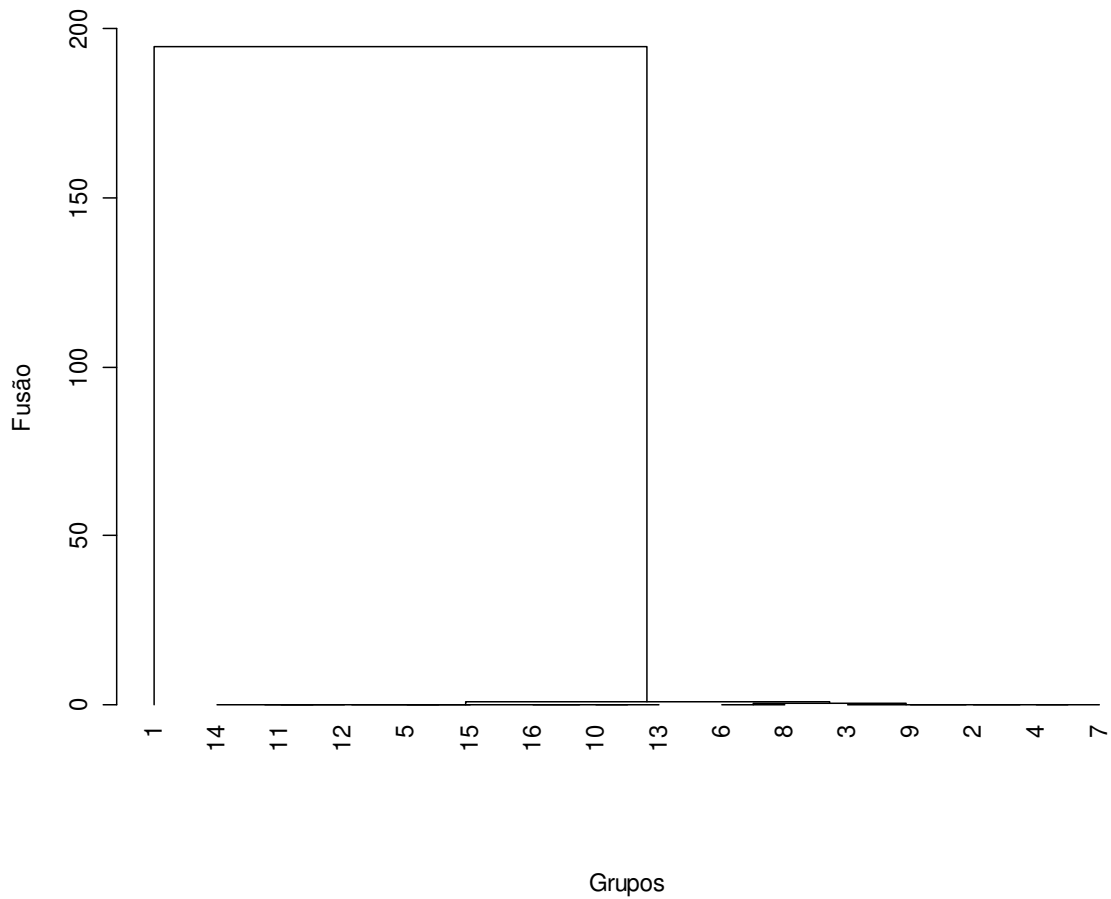
Dendrograma dos 16 grupos considerando coleta 3 da metodologia de quantificação de endotoxina, utilizando a distância euclidiana e o método hierárquico das médias das distâncias. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)



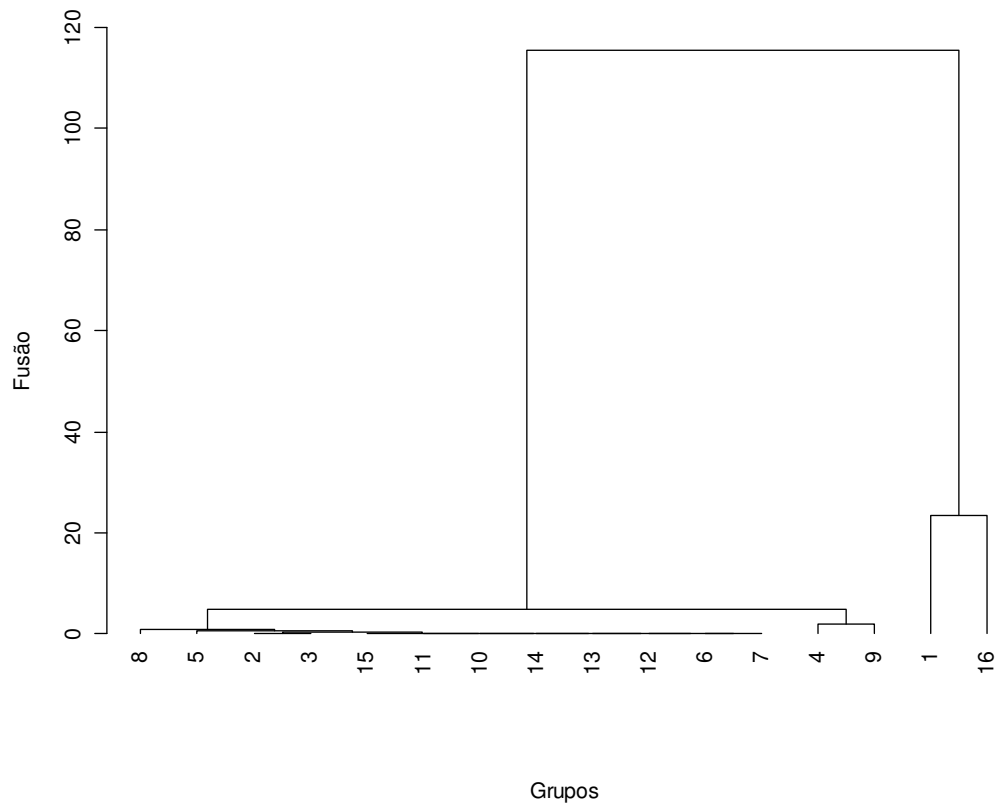
Dendrograma dos 16 grupos considerando coleta 4 da metodologia de quantificação de endotoxina, utilizando a distância euclidiana e o método hierárquico das médias das distâncias. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)



Dendrograma dos 16 grupos considerando coleta 5 da metodologia de quantificação de endotoxina, utilizando a distância euclidiana e o método hierárquico das médias das distâncias. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)



Dendrograma dos 16 grupos considerando coleta 6 da metodologia de quantificação de endotoxina, utilizando a distância euclidiana e o método hierárquico das médias das distâncias. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)



Dendrograma dos 16 grupos considerando coleta 7 da metodologia de quantificação de endotoxina, utilizando a distância euclidiana e o método hierárquico das médias das distâncias. **G1** (SF, sem EDTA, sem MIC), **G2** (SF, EDTA, CLG), **G3** (SF, EDTA, HC+CLG), **G4** (SF, EDTA, HC+SF), **G5** (NaOCl, EDTA, CLG), **G6** (NaOCl, EDTA, HC+CLG), **G7** (NaOCl, EDTA, HC+SF), **G8** (NaOCl, sem EDTA, sem MIC), **G9** (CLG, EDTA, CLG), **G10** (CLG, EDTA, HC+CLG), **G11** (CLG, EDTA, HC+SF), **G12** (CLG, sem EDTA, sem MIC), **G13** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, CLG), **G14** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+CLG), **G15** (NaOCl, CLL 2%, EDTA, HC+SF), **G16** (NaOCl, CLL 2%, sem EDTA, sem MIC)



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Avaliação in vitro da efetividade de soluções irrigadoras e medicações intracanaís sobre microorganismos e endotoxina em canais radiculares"**, protocolo nº 008/2010, dos pesquisadores Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e Ana Carolina Mascarenhas Oliveira, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 10/02/2010.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"In vitro evaluation of the effectiveness of irrigating solutions and intracanal medications on microorganisms and endotoxin in root canals"**, register number 008/2010, of Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes and Ana Carolina Mascarenhas Oliveira, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 02/10/2010.

Prof. Dr. Pablo Agustín Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.