

FRANCISCO MONTAGNER

AVALIAÇÃO *in vitro* DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES
MEDICAÇÕES INTRACANAL NA SUPERFÍCIE RADICULAR EXTERNA

Monografia apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, como requisito para a
obtenção do Título de Especialista em
Endodontia.

PIRACICABA

2007

00003



TCE/UNICAMP
M76a
FOP

1290005390

FRANCISCO MONTAGNER

Cirurgião-Dentista

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES
MEDICAÇÕES INTRACANAL NA SUPERFÍCIE RADICULAR EXTERNA**

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do Título de Especialista em Endodontia.

Orientadora: Prof^{fa} Dr^a Brenda P. F. A. Gomes

393

**UNICAMP / FOP
BIBLIOTECA**
PIRACICABA

2007

Unidade FOP/UNICAMP	
N. Chamada	M76a
Vol.	Ex.
Tombo BC/	

Unidade - FOP/UNICAMP
TCE/UNICAMP
M76a Ed.
Vol. Ex.
Tombo 5390
C ☐ D ☒
Proc. 16P-130/2011
Preço R\$ 10,00
Data 06/01/11
Registro 778388

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

M76a	Montagner, Francisco. Avaliação <i>in vitro</i> da ação antimicrobiana de diferentes medicações intracanal na superfície radicular externa. / Francisco Montagner. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007. 60f. Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes. Monografia (Especialização) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Endodontia. 2. Hidróxido de cálcio. 3. Clorexidina. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
------	--

Dedico este trabalho aos meus pais **Jorge** e **Vera** por apoiar e acreditar em meus objetivos, tornando-os seus sonhos.

Ao meu irmão, **Henrique** pelo companheirismo, compreensão e amizade que são sempre os estímulos do meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora de estágio no Departamento de Endodontia **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.**

Aos professores da equipe de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba **Prof Dr Alexandre Augusto Zaia, Professor Dr Caio Cezar Randi Ferraz e Prof Dr Francisco José de Souza-Filho.**

Aos Colegas de Especialização **Andréia, Chiara, Cláudia, Débora, Fábio, Janayna, Louise, Luciana, Renata, Ricardo e Vanessa.**

Aos funcionários do Departamento de Endodontia **Adaílton, Wanderly e Rubens.**

Aos amigos do Laboratório de Endodontia **Adriana, Ana Carolina, Danna, Fernanda, Frederico, Giselle, Geovania, Helena, José Flávio, Juliana, Luciano, Maraísa, Morgana, Neylla, Rogério, Tétis, Thaís e Vanessa.**

Aos professores de Endodontia da Universidade Federal de Santa Maria **Profa. Dra. Maria Gabriela Pereira de Carvalho, Profa. Márcia da Silva Schmitz, Profa. Cláudia Londero Pagliarin e Prof. Carlos Alexandre Souza Bier.**

À **Profa. Márcia da Silva Schmitz**, da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Santa Maria, e ao **Prof. Dr. Paulo Edelvar Correa Peres**, da Disciplina de Microbiologia Oral da Universidade Federal de Santa Maria.

A todas as pessoas que participaram, contribuindo para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente, meu agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 MICROBIOTA DOS CANAIS RADICULARES INFECTADOS	11
2.2 MICROBIOTA DAS DOENÇAS PERIODONTAIS	15
2.3 MICROBIOTA DAS LESÕES ENDO-PERIODONTAIS CONJUGADAS	17
2.4 INFECÇÃO EXTRA-RADICULAR	18
2.5. TECIDO DENTINÁRIO E PERMEABILIDADE	19
2.6 MEDICAÇÃO INTRACANAL EM ENDODONTIA	21
3 PROPOSIÇÃO	31
4 MATERIAIS E MÉTODO	32
4.1 MATERIAIS EMPREGADOS	32
4.2 MEIOS DE CULTURA	32
4.3 MEDICAMENTOS TESTADOS	33
4.4 PREPARO DOS DENTES	33
4.5 VERIFICAÇÃO DA AUSÊNCIA DE TRINCAS NAS RAÍZES DENTAIS	36
4.6 PREPARO DAS MEDICAÇÕES INTRACANAL	36
4.7 PREPARO E COLOCAÇÃO DA MEDICAÇÃO INTRACANAL	38
4.8 SELAMENTO DOS DENTES	39
4.9 PREPARAÇÃO DO INÓCULO	39
4.10 PREPARO DAS CAMADAS DE ÁGAR E DO INÓCULO	40
4.11 COLOCAÇÃO DOS DENTES SOBRE A SUPERFÍCIE DO ÁGAR	41

4.12 INCUBAÇÃO	41
4.13 LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO	41
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5 RESULTADOS	42
5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS MEDICAÇÕES INTRACANAIS	42
5.2 SUSCEPTIBILIDADE MICROBIANA ÀS DIFERENTES MEDICAÇÕES INTRACANAIS	43
5.3 INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DO CEMENTO RADICULAR NA DIFUSÃO DAS MEDICAÇÕES INTRACANAIS	44
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	49
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
9 APÊNDICE	60

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana de diferentes medicações intracanaís na superfície radicular externa. Duzentas e oitenta e oito raízes de caninos superiores extraídos foram divididas em dois grupos, com e sem cimento. Realizou-se o preparo químico-mecânico, remoção da *smear layer* e esterilização das amostras. Amostras com trincas radiculares foram excluídas do experimento. Após a colocação da medicação intracanal, procedeu-se o vedamento apical e coronário com cera utilidade. Os microrganismos empregados no experimento foram *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Actinomyces viscosus* e *Porphyromonas gingivalis*, isolados de amostras clínicas. As medicações intracanaís testadas foram: clorexidina gel 2% (CHX2%); clorexidina gel 2% + hidróxido de cálcio (1:1) (CHX2%+HC); clorexidina gel 2% + hidróxido de cálcio + óxido de zinco (1:1:1) (CHX 2%+HC+OZ); soro fisiológico + hidróxido de cálcio (SF+HC); e soro fisiológico (controle positivo). As zonas de inibição de crescimento bacteriano foram medidas após o período de incubação. O maior efeito antimicrobiano foi produzido pela CHX2%, seguido de CHX2%+HC, CHX2%+HC+OZ e SF+HC ($p<0,05$). Os microrganismos mais suscetíveis à ação dos medicamentos foram *A. viscosus* (0,95 mm) e *E. faecalis* (1,96 mm). Não houve diferença entre os grupos na presença ou ausência de cimento. Foi concluído que as medicações intracanaís que apresentavam CHX2% em sua composição foram capazes de se difundir pela dentina e atingir a superfície externa da raiz, exercendo ação antimicrobiana.

ABSTRACT

The aim of this work was to assess *in vitro* the antimicrobial action of different intra-canal medicaments in the external root surface. Two hundred and eighty eight extracted human upper canines roots were divided into two groups, with and without cementum. The root canal instrumentation was performed followed by smear layer removal and sterilization. Samples with root cracks were excluded. After the placement of the intracanal medicaments, the coronal and apical openings were sealed with dental wax. The microorganisms used in this experiment were *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Actinomyces viscosus* and *Porphyromonas gingivalis* (all isolated from clinical trials). Each microbial strain was evaluated against intracanal dressings: 2% chlorhexidine gel (2%CHX); 2% chlorhexidine gel + calcium hydroxide (1:1) (2%CHX+CH); 2% chlorhexidine gel + zinc oxide + calcium hydroxide (1:1:1) (2%CHX+ZnO+CH); sterile saline + calcium hydroxide (SS+CH); sterile saline (positive control group). Zones of inhibition of microbial growth were measured and recorded after the incubation period. The antimicrobial effects of the medicaments could be ranked from strongest to weakest as follows: 2%CHX, 2%CHX+CH, 2%CHX+ZnO+CH, SS+CH. *Actinomyces viscosus* (0,95mm) and *E. faecalis* (1,96mm) were the more susceptible microorganisms. No differences among groups were verified in the presence or absence of cementum. It was concluded that 2%CHX containing medicaments were able to diffuse into the dentin and reach the outer surface, exerting their antimicrobial action.

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos e seus produtos desempenham um papel importante no desenvolvimento das patologias pulpares e periapicais. O sucesso do tratamento endodôntico depende da sua redução ou eliminação do sistema de canais radiculares e da efetividade dos procedimentos de desinfecção (Gomes *et al* 1996). Embora o preparo químico-mecânico seja capaz de promover uma significativa redução da quantidade microbiana, o emprego de uma medicação intracanal pode contribuir para complementar a desinfecção do sistema de canais radiculares, especialmente em casos de dor e exsudação persistente.

O hidróxido de cálcio passou a ser empregado como curativo intracanal a partir de 1975, com os estudos de Heithersay e de Stuart em dentes com necrose pulpar. Vários estudos indicam que as propriedades do hidróxido de cálcio decorrem de sua capacidade em se dissociar promovendo a alteração do pH da dentina e dos tecidos adjacentes através de sua difusão. Das várias propriedades biológicas atribuídas ao hidróxido de cálcio, somente o seu efeito antimicrobiano por contato direto e seu efeito de estímulo à formação de barreira mineralizada são cientificamente comprovados. O hidróxido de cálcio não pode ser considerado uma medicação intracanal universal pois não é efetivo contra todos os microrganismos associados às patologias de origem endodôntica (Gomes *et al* 2002). Vários estudos demonstram que esta medicação é incapaz de eliminar enterococcus efetivamente uma vez que estas espécies toleram altos valores de pH (Pinheiro *et al* 2003). Com o objetivo de melhorar as propriedades antimicrobianas do hidróxido de cálcio, mas mantendo as suas características físicas e mecânicas, tem-se sugerido a sua associação com outras substâncias biologicamente ativas (Gomes *et al* 2003).

O digluconato de clorexidina tem sido empregado na Periodontia como um agente anti-placa e anti-cálculo e apresenta um espectro antibacteriano amplo. Em pH fisiológico, tem a capacidade de dissociar-se, liberando moléculas de carga positiva. Em baixas concentrações, exerce um efeito bacteriostático, ao passo que em altas concentrações, tem a capacidade de eliminar microrganismos. A interação com os tecidos dentais e com grupamentos aniônicos ácidos de glicoproteínas permite a sua lenta liberação ao meio, caracterizando a sua propriedade de substantividade. Quando usada como medicação intra-canal, mostrou-se eficaz na

redução da população microbiana de túbulos dentinários contaminados com *Enterococcus faecalis*.

O ambiente do canal radicular pode funcionar como um mecanismo de liberação lenta para difusão de drogas para o periodonto e as substâncias colocadas em seu interior, ao se difundir para a superfície radicular externa, poderiam exercer ação na massa dentinária radicular contaminada por bactérias alojadas no interior de túbulos e um efeito antimicrobiano complementar à terapêutica periodontal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.2 MICROBIOTA DOS CANAIS RADICULARES INFECTADOS

Com o estudo de Kakehashi *et al* (1965), foi confirmada a importância das bactérias no desenvolvimento das doenças pulpares e perirradiculares. Até meados da década de 70, a maioria dos estudos microbiológicos das infecções endodônticas indicava o predomínio de bactérias facultativas. No entanto, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas de isolamento e cultivo de anaeróbios estritos geraram um interesse maior para desvendar o papel desses microorganismos na patogênese das doenças endodônticas (Lopes e Siqueira Jr, 1999).

As infecções endodônticas são polimicrobianas e compostas por uma limitada combinação de bactérias anaeróbicas estritas em sinergismo, principalmente bacilos Gram-negativos, como os bastonetes produtores de pigmento preto e fusobactérias. Embora mais de 100 espécies diferentes tenham sido isoladas de canais radiculares, a microbiota do canal radicular com polpa necrótica é dominada por bactérias anaeróbicas (Gomes, 2002).

Ao investigar a microbiota de canais radiculares infectados e reinfectedados, Gomes *et al* 2004, relataram que 70% das espécies bacterianas eram anaeróbicas estritas ou microfilicas. Em canais radiculares que não haviam recebido tratamento endodôntico e apresentavam reação periapical, a microbiota demonstrou-se mista, com predominância de anaeróbios e geralmente havia mais que 3 espécies bacterianas em cada canal radicular. Nos casos onde se observava insucesso do tratamento, havia predomínio de bactérias anaeróbicas facultativas, gram-positivas, e geralmente apenas uma ou duas espécies estavam presentes. Os autores concluíram que há uma diferença no número e nos tipos espécies bacterianas em infecções primárias e nas infecções relacionadas ao insucesso quando se utiliza as técnicas de cultura para identificação de microorganismos.

Segundo Gomes (1995), os microorganismos mais freqüentemente isolados dos canais radiculares são os facultativos *Streptococcus* spp. e as espécies relacionadas tais como *Enterococcus* e *Gemella*; e os anaeróbios estritos como

Peptostreptococcus, *Bacteróides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Veillonella* e *Capnocytophaga* spp. Também são isolados com freqüência as espécies *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eikenella*, *Staphilococcus*, *Mitsuokella* e *Wolinella* spp. As espécies facultativas *Enterobacter*, *Bacillus*, *Tissierella*, *Campylobacter* e *Actinobacillus* são ocasionalmente isoladas. Mais raramente são isolados os facultativos *Hafnia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Aerobacter* e *Alcaligenes*; e os aeróbios *Mycoabacteria*, *Nocardia*, *Mima*, *Pseudomonas* e *Micrococcus*.

Atualmente estudos empregando técnicas de identificação molecular conseguem identificar bactérias em infecções endodônticas onde as técnicas convencionais de cultura demonstravam resultados negativos (Rolph, 2001). A introdução dessas novas técnicas suscitou dúvidas quanto à classificação de diversos microorganismos fazendo com que alterações na nomenclatura e reclassificações ocorressem, permitindo também identificação e individualização de novas espécies (Siqueira Jr, 2003). Da mesma forma, Munson *et al* (2002) ao avaliar a microbiota de canais radiculares infectados concluíram que estes novos métodos podem revelar maior quantidade de microorganismos que as técnicas anteriores.

Segundo Siren *et al* (1997) as bactérias entéricas não estão comumente presentes na microbiota de canais radiculares de dentes primariamente infectados, ao passo que, fazem parte da composição da microbiota de dentes com infecção resistente. Este fato poderia estar relacionado a sua maior resistência à terapia endodôntica ou também à contaminação secundária ou durante os procedimentos transoperatórios. Dentre esses, estaria incluído o isolamento inadequado do campo operatório.

Em 2001 Hancock *et al*, ao analisarem microbiologicamente 54 casos em que se verificou o fracasso do tratamento endodôntico, demonstraram que a microbiota associada a eles era constituída por 1 a 3 microorganismos e que em 30% dos canais radiculares estava presente a bactéria *Enterococcus faecalis*.

Pinheiro *et al* (2003) através de coletas microbiológicas de canais radiculares que necessitavam de retratamento verificaram que a espécie bacteriana mais freqüentemente isolada foi o *E. faecalis*, apresentando-se em 52,94% dos canais radiculares com crescimento microbiano.

Ao tentar identificar, por método molecular (PCR), os microorganismos mais prevalentes em 22 dentes com lesões periapicais persistentes e com indicação a retratamento endodôntico, Siqueira Jr & Rôças (2004) detectaram a presença de *E. faecalis* (77% dos casos), *Pseudoramibacter alactolyticus* (52% dos casos), *Propionibacterium propionicum* (52% dos casos), *Dialister pneumosintes* (48% dos casos), *Filifactor alocis* (48% dos casos) e *Candida albicans* (9% dos casos).

Segundo Love *et al* (2001), a capacidade do *E. faecalis* em causar patologia periapical e estar associado aos casos de insucesso do tratamento endodôntico provém de seu potencial de invadir os túbulos dentinários e permanecer viável em seu interior.

As bactérias anaeróbias gram-negativas produtoras de pigmento negro são relativamente comuns em canais radiculares infectados e em abscessos endodônticos (Gomes *et al*, 1994).

Estudando a presença de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas endodontalis* em canais radiculares, Gomes *et al* (2005) demonstraram que essas bactérias foram mais frequentemente encontradas em dentes que apresentavam infecção primária que em casos de retratamento.

Jacinto *et al* (2006) observaram a presença de *Porphyromonas gingivalis* em 20/70 canais radiculares infectados, estando relacionada com casos sintomáticos onde havia presença de exsudato purulento e dor à palpação.

O gênero *Actinomyces* é formado por bactérias anaeróbicas e bactérias microaerófilas que são gram-positivas e não formadoras de esporos. Das catorze espécies, apenas seis estão associadas com doenças em humanos. As bactérias anaeróbicas facultativas são *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A. viscosus*, *A. meyeri* e *A. gerencseriae* e o anaeróbio estrito *A. israelii*.

Xia & Baumgartner em 2003, demonstraram através de métodos moleculares a presença de *A. israelii*, *A. naeslundii* e *A. viscosus* em amostras coletadas em canais radiculares infectados e abscessos e celulites de origem endodôntica. Grande porcentagem dessas espécies foi observada em amostras originárias do canal radicular e o *A. viscosus* foi detectado em aproximadamente 32,1% dos casos, sugerindo a presença freqüente dessas espécies nas infecções de endodônticas.

Abou-Rass & Bogen (1998), observaram a presença de *Actinomyces* spp. em lesões periapicais de origem endodôntica e constataram que estes microrganismos são mais freqüentemente isolados na região próxima ao ápice radicular e no interior das lesões.

Sunde *et al* (2002), ao isolaram e identificaram bactérias de lesões endodônticas periapicais refratárias, observaram que no momento da remoção desse tecido, grânulos de coloração amarelada estavam presentes em 25% dos casos. Na presença de cultura positiva dessas estruturas, foram constatadas a ocorrência de *Actinomyces israelii*, *A. viscosus*, *A. meyeri* e *A. naeslundii*. Quando observados em microscópio eletrônico de transmissão, as bactérias presentes nos grânulos estavam envolvidas por uma cápsula, o que poderia dificultar a ação dos medicamentos, favorecendo a resistência bacteriana. Uma ampla variedade de microrganismos anaeróbios estritos, facultativos e fungos foi identificada nas lesões periapicais, sendo que 79,5% das cepas eram gram-positivas e em 75% dos casos observou-se a presença de *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Bacillus* e *Candida* spp.

Waltimo *et al* (2004) relataram que *Candida albicans* é a espécie de fungo mais comumente isolada em canais radiculares e freqüentemente está associada às bactérias gram-positivas. Segundo os mesmos autores, a dentina radicular e o tecido pulpar necrótico fornecem condições ideais para a infecção por fungos, o que dificulta a sua erradicação do sistema de canais radiculares. Assim o fungo *Candida albicans* tem capacidade de adaptar-se e tolerar as alterações ambientais e nutricionais que se estabelecem durante a terapia endodôntica.

Baumgartner *et al* (2000) constataram a presença de *Candida albicans* em 21% das amostras obtidas de canais radiculares infectados, enquanto que nenhuma das amostras coletadas de abscessos periapicais ou celulites de origem endodôntica apresentaram o fungo.

Egan *et al* (2002) verificaram que apenas 5,7% dos casos de dentes com infecção endodôntica primária associados à lesão periapical e em 16% dos casos onde houve fracasso da terapia endodôntica prévia havia a presença do fungo *Candida albicans*.

Pinheiro *et al* (2003) avaliaram a microbiota de canais radiculares de dentes onde houve insucesso no tratamento endodôntico e correlacionaram a presença de características clínicas com determinadas espécies bacterianas, constatando-se um predomínio de anaeróbios facultativos e microrganismos gram-positivos. *Enterococcus faecalis* foi a bactéria mais frequentemente isolada. Nos casos onde havia dor ou histórico, bactérias anaeróbias e infecções polimicrobianas foram observadas. *Prevotella intermedia* / *P. nigrescens* foram relacionadas aos casos que apresentavam dor à percussão, enquanto que várias espécies de *Actinomyces* estiveram presentes quando trajetos fistulosos foram constatados. Em dentes que não apresentavam selamento coronário, foi verificada uma alta incidência de *Candida albicans*.

2.2 MICROBIOTA DAS DOENÇAS PERIODONTAIS

O entendimento das doenças periodontais ocorreu no momento em que a microbiologia clínica foi empregada como uma ferramenta para o diagnóstico e planejamento do tratamento (Winkelhoff & Winkel, 2005).

As doenças periodontais são infecções multifatoriais onde estão envolvidos vários complexos bacterianos que interagem com as células do hospedeiro causando uma ampla liberação de mediadores inflamatórios que podem acarretar a destruição das estruturas periodontais. As características da progressão das alterações microbianas do estado de saúde para doença periodontal são vastas e complexas (Holt & Ebersole, 2005).

Socransky e Haffajee (1998) agruparam a microbiota das doenças periodontais em grupos ou complexos que representam as associações bacterianas na placa sub-gengival. O primeiro complexo, ou complexo vermelho, é formado por *Bacteróides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. O segundo complexo, ou complexo laranja, compreende *Fusobacterium nucleatum* spp., *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*. Dentre as espécies associadas a esse complexo, encontram-se *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus* e *Campylobacter gracilis*. As bactérias *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*,

Streptococcus mitis, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus intermedius* formam o terceiro complexo, de cor amarela. O quarto complexo ou complexo verde, é constituído por três espécies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* sorotipo a. O quinto complexo, ou complexo roxo, é formado por *Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*. *A. actinomycetemcomitans* serotipo b, *Selenomonas noxia* e *Actinomyces naeslundii* são espécies relacionadas com os demais complexos.

O complexo vermelho está presente em etapas mais tardias da formação do biofilme, representando uma comunidade clímax. As bactérias pertencentes a esse grupo são freqüentemente isoladas em casos onde há grandes profundidades de bolsa e sangramento à sondagem (Holt & Ebersole, 2005).

Winkelhoff & Winkel (2005) estabelecem três fases principais no tratamento periodontal: diagnóstico, controle da infecção e restauração do periodonto. A abordagem para controle da infecção emprega medidas com o objetivo de reduzir a carga microbiana total através de instrução de higiene oral, raspagem e alisamento radicular, extrações e cirurgias.

Slots *et al* (1985) avaliaram a presença de *A. actinomycetemcomitans*, "*B. gingivalis*" e "*B. intermedius*" em sítios que apresentavam doença periodontal. Nas lesões em progressão, a percentagem de ocorrência de *A. a.*, *B. gingivalis* e *B. intermedius* foi elevada. No entanto, nos sítios onde a doença periodontal estava estabilizada, menores incidências foram observadas. Dessa forma, constatou-se que esses patógenos estavam diretamente associados com doença periodontal ativa e profundidade de sondagem.

Chaves *et al* (2000) demonstraram que lesões periodontais que apresentavam *P. gingivalis* em 1, 3 e 6 meses após o tratamento inicial demonstraram perda adicional de tecido ósseo, enquanto que nos casos onde este patógeno estava ausente após o tratamento houve tendência a recuperação de estrutura óssea. A ausência de *P. gingivalis* no início do tratamento sugere que o sítio não apresentará perda óssea após a terapia periodontal.

Jaramillo *et al* (2005) ao avaliarem a microbiota de abscessos periodontais relatam que *Fusobacterium* spp, *P. intermedia/nigrescens* e *P.*

gingivalis foram freqüentemente isolados, demonstrando similaridade de composição com a microbiota de lesões periodontais crônicas e agressivas.

2.3 MICROBIOTA DAS LESÕES ENDO-PERIODONTAIS CONJUGADAS

Kipioti *et al* (1984) estudando a microflora periodontal e endodôntica de 6 dentes necrosados, com coroas intactas, sem lesões periapicais e com bolsas periodontais profundas, demonstraram que a microbiota de canais radiculares era similar àquela encontrada na adjacência das bolsas periodontais. Os organismos mais frequentemente isolados em ambos os locais foram *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Peptostreptococcus* spp, *Capnocytophaga* spp, *Actinomyces* spp e *Streptococcus* spp. Os autores enfatizaram que a bolsa periodontal era a possível fonte de infecção dos canais radiculares.

Kurihara *et al* (1995) estudaram a microbiota dos canais radiculares de dentes necrosados e sem cárie aparente e de bolsas periodontais de 5 pacientes. Os autores encontraram mais microrganismos nas bolsas periodontais que nos canais radiculares, sendo que a microbiota das bolsas periodontais consistia principalmente por bacilos e cocos. Espiroquetas foram encontradas apenas nas bolsas periodontais. As espécies bacterianas mais encontradas nos canais radiculares foram *Peptostreptococcus* e *Streptococcus* (cocos Gram-positivos) e *Actinomyces* e *Rothia* (bacilos Gram-positivos). As bactérias mais encontradas nas bolsas periodontais foram bastonetes anaeróbios facultativos e obrigatórios (Gram-negativos e positivos), *Campylobacter* spp, *Fusobacterium* spp, *Peptostreptococcus products* e *Peptostreptococcus* spp, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans* e spp.

De acordo com Dahlén (2002), não houve ainda uma caracterização específica da microbiota da lesão endo-periodontal. As bactérias associadas a ela são similares às encontradas nas lesões endodônticas e periodontais isoladas. O autor sugere que o padrão bacteriano possivelmente seja único, uma vez que há similaridade na microbiota das lesões endodônticas e periodontais.

2.4 INFECÇÃO EXTRA-RADICULAR

Os tecidos periapicais tem a capacidade de deter a disseminação da infecção proveniente do canal radicular com a formação de tecido granulomatoso que contém elementos de defesa, anticorpos e moléculas do sistema complemento (Siqueira Jr 2001).

Sunde *et al* (2002) demonstraram a presença de bactérias na superfície externa radicular e em lesões periapicais tais como os facultativos *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Candida* e *Actinomyces*.

O biofilme perirradicular é um mecanismo bacteriano de evasão às defesas do hospedeiro, sendo caracterizado por uma população de microrganismos aderidos ao cimento e/ou à dentina na porção apical da raiz, que estão envolvidos por seus produtos extracelulares, os quais formam uma matriz intermicrobiana (Gomes, 2002).

Lomçali *et al* (1996) observaram a presença de cadeias densas de bactérias em múltiplas camadas envolvidas em material extracelular quando avaliaram, em microscópio eletrônico de varredura, ápices de dentes assintomáticos e portadores de lesões periapicais. Os autores sugeriram que nessas condições, as defesas do organismo seriam incapazes de atuar sobre os microrganismos, contendo sua proliferação.

Ao avaliar em microscópio eletrônico de varredura ápices radiculares associados a dentes com lesões periapicais, Siqueira Jr & Lopes (2001) observaram a presença de bactérias na região extra-radicular em 4% dos casos. Com base nesses achados, conclui-se que a infecção extra-radicular relacionada à formação de biofilme não é um achado comum em casos de dentes com infecção endodôntica primária.

A frequência e as condições em que o estabelecimento de biofilmes apicais ocorre ainda não é bem compreendida, mas a sua formação é dependente da infecção intra-radicular e pode estar relacionada a tratamentos endodônticos inadequados, trajetos fistulosos, exposição do canal radicular à cavidade oral por períodos prolongados de tempo (Sensäter & Bergenholtz, 2004). A agregação bacteriana em biofilmes pode fazer com que os microrganismos desenvolvam

medidas eficazes para resistir à ação dos procedimentos endodônticos (Lomçali *et al* 1996).

2.5. TECIDO DENTINÁRIO E PERMEABILIDADE

Além de serem uma das principais vias de contaminação pulpar quando expostos, os túbulos dentinários constituem reservatórios bacterianos, importantes para a manutenção das patologias periapicais.

Embora ainda pouco exploradas, diversos trabalhos demonstram diferenças estruturais entre a dentina radicular e a coronária, o que pode influenciar a difusão de microrganismos e substâncias neste tecido.

Diferente do que ocorre na região coronária, a trajetória dos túbulos dentinários no maciço radicular é mais retilínea, uma vez que a área superficial ocupada pelo odontoblasto na sua posição inicial de formação não difere da posição final (Ten Cate, 2001).

Os túbulos dentinários percorrem toda a extensão da dentina e ocupam de 20 a 30% do volume total. Apresentam uma conformação cônica, com diâmetro maior próximo a polpa (2,5 μm), diminuindo à medida que se aproxima das regiões amelo-dentinária ou cemento-dentinária (em média 0,9 μm) (Garberoglio & Brannström, 1976).

Na junção dentino-pulpar a concentração de túbulos dentinários é de aproximadamente 45000 unidades/ mm^2 , correspondendo a 22% da área superficial total. No entanto, à medida que se aproxima da periferia, a sua concentração se reduz a 15000 unidades/ mm^2 , ocupando uma área de 1% do total (Lopes & Siqueira Jr, 1999). O número médio de túbulos dentinários por unidade de área em dentina radicular é de 44.243 túbulos/ mm^2 na região cervical, 42.360 túbulos/ mm^2 no terço médio e 8.190 túbulos/ mm^2 na região apical (Carrigan *et al*, 1984).

O tecido dentinário não é estático. Carrigan *et al* (1984) ao estudar a concentração de túbulos dentinários em dentes de indivíduos de diferentes faixas etárias, concluíram que houve uma redução no número de túbulos dentinários por unidade de área à medida que aumentava a idade e se aproximava da área apical.

Mjör & Nordahl (1996) demonstraram que há uma rede de canalículos na matriz intertubular estabelecendo conexões entre os túbulos dentinários, sendo encontrados em maior quantidade na dentina radicular, principalmente nas áreas onde a densidade de túbulos dentinários é menor. Esse sistema complexo de interconexões pode afetar diretamente a permeabilidade tecidual, que está relacionada à sensibilidade dentinária, progressão das lesões de cárie e difusão de substâncias bacterianas tóxicas.

Nakabayashi & Pashley relacionam permeabilidade à facilidade em que uma substância tem em se difundir através de uma barreira, ou seja, um substrato. Segundo estes autores, a permeabilidade dentinária pode ser tanto intra-tubular quanto inter-tubular.

Seltzer (1988) descreve que a dentina produzida pelos odontoblastos na região apical é amorfa e irregular, não seguindo os padrões verificados na dentina dos terços radiculares cervical e médio. Essas características reduziram sua permeabilidade, dificultando o acesso de microorganismos ou outros irritantes ao interior dos túbulos dentinários.

Nagaoka *et al* (1995) relataram que os túbulos dentinários associados a uma polpa vital dificultam a entrada bacteriana, retardando essa invasão. Outros fatores que influenciam essa progressão são presença de prolongamento odontoblástico, fluido dentinário e fibras colágenas. No entanto, nos dentes que apresentam polpa necrótica, a invasão dos túbulos dentinários é facilitada. O mesmo acontece para os dentes tratados endodonticamente.

Da mesma forma, Puapichartdumrong *et al* (2005) demonstraram que a presença de componentes pulparets retardou a difusão de substâncias químicas em discos de dentina. Esses autores acreditam que o prolongamento odontoblástico, ao ocupar um espaço considerável da luz do túbulo dentinário, torna-se uma barreira física importante e capaz de dificultar a invasão bacteriana em dentes com polpa vital.

A permeabilidade da dentina é determinada principalmente pela anatomia dos túbulos dentinários (densidade, diâmetro e profundidade dos túbulos) e pelas características da substância a se difundir (tamanho da molécula e carga) (Pashley, 1990). A difusão de íons com carga negativa como a hidroxila pode ser barrada pela

capacidade tampão, pela adsorção e pela carga da dentina. A capacidade tampão da dentina ocorre quando doadores de prótons da camada hidratada da hidroxiapatita, tais como H_2PO_4^- , H_2CO_3 e HCO_3^- , fornecem prótons adicionais com o objetivo de manter o pH da dentina inalterado (Jenkins, 1978).

2.6 MEDICAÇÃO INTRACANAL EM ENDODONTIA

As medicações intracanaís são empregadas com o objetivo de exercer ação antimicrobiana nos tecidos pulpar e periapical, neutralizar e tornar inertes os remanescentes teciduais bem como prevenir e controlar a dor pós-operatória (Walton & Torabinejad, 1989).

Os objetivos do emprego de medicações intracanaís são: promover a eliminação de bactérias que sobreviveram ao preparo químico-mecânico, atuar como barreira físico-química contra a infecção ou reinfecção por microrganismos da saliva, reduzir a inflamação perirradicular, solubilizar a matéria orgânica, neutralizar produtos tóxicos, controlar a exsudação persistente, controlar reabsorção inflamatória externa e estimular a reparação por tecido mineralizado (Leonardo, 2004).

O uso das medicações intracanaís tem se tornado cada vez mais limitado (De Deus, 1992), uma vez que a redução bacteriana é atingida em níveis satisfatórios após a conclusão de um preparo químico-mecânico com instrumentação e irrigação cuidadosas (Walton & Torabinejad, 1989).

Embora as medicações intracanaís não possam substituir o preparo químico-mecânico, seu emprego como coadjuvante em situações específicas é indicado (Siqueira Jr, 2004).

Duas abordagens podem ser consideradas quando se discute a utilização de medicações intracanal. A primeira seria que as bactérias remanescentes ao preparo químico-mecânico poderiam ser eliminadas e seus produtos tóxicos neutralizados com o emprego de tais substâncias. A segunda abordagem visa impedir a influência das bactérias remanescentes na perpetuação das lesões periapicais através do seu enclausuramento no interior do tecido dentinário através de uma obturação adequada do sistema de canais radiculares, imediatamente após

o preparo do canal radicular. Assim, a realização de tratamento endodôntico em uma sessão ou em múltiplas sessões deve ser considerada como parte de uma abordagem integral, determinada pelas peculiaridades de cada caso. (Vivacqua-Gomes *et al*, 2005)

Em estudo prospectivo, Peters & Wessellink (2001) avaliaram os índices de cicatrização de lesões periapicais em dentes com culturas microbianas negativas e positivas no momento da obturação quando o tratamento foi concluído em única sessão ou se empregou medicação intracanal de hidróxido de cálcio por 4 semanas. Decorridos quatro anos e meio após o término do tratamento, os autores observaram que nos casos de dentes tratados em sessão única, 81% apresentava regressão total da lesão enquanto que 19% demonstraram redução no tamanho da lesão. Quando o curativo de hidróxido de cálcio foi empregado, 71% dos casos apresentavam sem sinais radiográficos de alteração periapical, 23% apresentaram diminuição no tamanho da lesão enquanto que 1 caso apresentou insucesso. Não houve diferença significativa nos padrões de reparo quando os testes microbianos demonstraram cultura positiva no momento da obturação. Assim, os autores demonstraram que a presença de cultura positiva imediatamente antes da obturação, em tratamentos realizados em sessão única ou múltipla com o emprego de medicação intracanal, não influenciou no reparo de lesões periapicais.

2.6.1 Hidróxido de Cálcio

O hidróxido de cálcio é uma base forte, com pH 12,6, pouco solúvel em água e obtida a partir da calcinação do carbonato de cálcio, até sua transformação em óxido de cal. Com a hidratação do óxido de cálcio chega-se ao hidróxido de cálcio. (Estrela, 2004)

Dentre os vários empregos, merecem destaque àqueles relacionados à Endodontia: capeamento pulpar direto e indireto, pulpotomia, medicação intra-canal, prevenção de reabsorções radiculares, reparo de perfurações iatrogênicas e tratamento de fraturas radiculares horizontais.

Foreman e Barnes em 1990 relacionaram as diversas propriedades do hidróxido de cálcio tais como: capacidade de iniciação e indução de mineralização,

indução da formação de dentina, destruição de bactérias, dissolução de material necrótico.

O hidróxido de cálcio deve ser associado a uma outra substância que permita a sua veiculação para o interior do sistema de canais radiculares. Essas substâncias são conhecidas como veículos e devem permitir a dissociação iônica do hidróxido de cálcio em íons cálcio e hidroxila, uma vez que suas propriedades são dependentes dessa ionização.

Os veículos podem ser classificados de acordo com suas características físico-químicas em veículos hidrossolúveis ou oleosos. Do ponto de vista da atividade antimicrobiana, podemos classificar os veículos como inertes ou biologicamente ativos. Os veículos inertes são biocompatíveis, mas não influenciam as propriedades antimicrobianas do hidróxido de cálcio. Dentre eles, destacam-se o soro fisiológico, a glicerina, o propilenoglicol e soluções anestésicas. A clorexidina, o PMCC e o tricresolformalina funcionam como veículos biologicamente ativos pois conferem às pastas de hidróxido de cálcio propriedades adicionais. (Lopes & Siqueira Jr 2004)

Estrela & Pesce (1996), analisando quimicamente a liberação de íons hidroxila do hidróxido de cálcio, verificaram que quando se coloca hidróxido de cálcio no canal radicular, 45,89% e 54,11% se dissociam respectivamente em íons hidroxila e íons cálcio.

O mecanismo de ação do hidróxido de cálcio ainda não está totalmente esclarecido. Segundo Estrela (2002) as propriedades do hidróxido de cálcio derivam da sua dissociação iônica em íons cálcio e íons hidroxila, sendo que, a ação destes íons sobre os tecidos e as bactérias, explicam as propriedades biológicas e antimicrobianas desta substância.

Para Lopes & Siqueira (2004) a ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio se dá por meio da perda da integridade da membrana citoplasmática bacteriana, por inativação enzimática e por dano ao DNA. A variação do pH influencia o crescimento bacteriano, uma vez que exerce ação sobre a atividade enzimática. Da mesma forma, pode afetar o metabolismo celular, alterando o crescimento e a proliferação celular. (Estrela 2002)

Estrela *et al* (1994) demonstraram que há uma inativação enzimática bacteriana irreversível em condições extremas de pH, em longos períodos de tempo.

No entanto, quando o valor de pH retornar aos níveis ideais para a ação enzimática, a sua atividade volta ao normal.

Durante a evolução da infecção endodôntica podem ocorrer inter-relações entre as espécies microbianas que são provavelmente baseadas em relações nutricionais e conseqüente estabelecimento de um ambiente favorável à colonização bacteriana (Gomes *et al* 1994, 1996). Outro mecanismo que explicaria a ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio seria a sua capacidade em absorver dióxido de carbono nos canais radiculares (Kontakiotis *et al* 1995). Dessa forma, espécies CO₂-dependentes terão seu crescimento inibido.

Safavi & Nichols (1993) avaliaram *in vitro* o efeito do hidróxido de cálcio sobre o LPS bacteriano através da quantificação de íons hidroxila livres de ácidos graxos após a exposição à medicação. A liberação de íons hidroxila está relacionada à alteração na conformação do ácido graxo, componente característico do LPS bacteriano, o que sugere a perda da toxicidade desse elemento. Após o tratamento com hidróxido de cálcio e análise em cromatografia de gás, elevados níveis de íons hidroxila foram constatados, demonstrando a sua alta capacidade de inativação do LPS. Dessa forma, pode-se concluir que o hidróxido de cálcio tem a capacidade de alterar as propriedades biológicas do LPS bacteriano.

Para que o hidróxido de cálcio seja eficaz contra bactérias localizadas no interior dos túbulos dentinários, os íons hidroxila devem se difundir pela dentina em uma concentração iônica suficiente para exercer ação antimicrobiana. A permeabilidade dentinária e a sua capacidade tampão podem afetar a difusibilidade dos íons no maciço radicular (Nerwich *et al* 1993, Nakabayashi & Pashley 1998). A maioria das espécies bacterianas que coloniza os canais radiculares consegue manter sua viabilidade até pH 9. No entanto o *Enterococcus faecalis* pode sobreviver em níveis de pH superiores através do desenvolvimento de mecanismos adaptativos em seu metabolismo (Evans *et al* 2002).

A tensão superficial de uma substância pode influenciar a sua capacidade de difusão. Estrela *et al* (2002) demonstraram que a tensão superficial de pastas a base de hidróxido de cálcio foi alterada de acordo com o veículo empregado. Menores valores foram obtidos quando o hidróxido de cálcio foi empregado com PMCC, ao passo que altos valores foram obtidos com o emprego de água destilada e digluconato de clorexidina 2%.

Tronstad *et al* (1981) analisaram a difusão de íons hidroxila do hidróxido de cálcio através dos túbulos dentinários e o possível aumento do pH nos tecidos em período de quatro semanas. Os valores de pH na dentina próxima à polpa foram de 12,2; a dentina adjacente ao canal radicular e em contato com a pasta de hidróxido de cálcio apresentou pH variando de 8,0 a 12,2. Na dentina mais periférica os valores de pH variaram entre 7,0 e 10,0 enquanto que nenhuma alteração de pH foi observada no cimento radicular.

Nerwich *et al* (1993) estudando as alterações no pH na dentina radicular decorrentes da aplicação de hidróxido de cálcio, observaram que a substância requer de 1 a 7 dias para alcançar a dentina radicular externa. O pH da superfície dentinária que não recebeu nenhum tratamento variou entre 7,6 e 8,3 no período de experimento. O pH da dentina cervical externa começou a alterar após 3 a 7 dias, estabilizando-se em pH 9,0 após duas semanas e atingindo nível máximo de 9,3. No terço apical, a superfície radicular externa teve seu pH alterado para 9,0 após duas semanas, no entanto as alterações iniciaram-se após 24 horas.

Minãna, Carnes e Walker III, em 2001, avaliaram *in vitro* a difusão de íons hidroxila através da aferição de alterações de pH nos terços radiculares cervical e apical na superfície radicular externa, empregando-se pastas de hidróxido de cálcio e óxido de cálcio como medicações intra-canal em período de 1 a 70 dias. Observou-se uma alteração dinâmica dos valores de pH após a colocação das pastas no interior do canal radicular em ambas as regiões, sendo mais expressivo na região cervical do que na região apical. Dessa maneira, no período de 1 a 3 dias ocorreu um pico de pH que variou entre 10,3 a 10,6. No entanto, entre 4 e 18 dias, um decréscimo significativo foi observado com posterior manutenção de estabilidade até os 48 dias para ambos os medicamentos. Após os 48 dias, as amostras foram expostas a uma alta concentração de gás carbônico, o que promoveu uma queda brusca nos níveis de pH, evidenciando a redução na disponibilidade de íons hidroxila. O comportamento do óxido de cálcio foi similar ao do hidróxido de cálcio em todos os tempos de avaliação do experimento.

Solak & Öztan, em 2003, avaliaram *in vitro* as alterações de pH de pastas de hidróxido de cálcio quando anestésicos locais foram empregados como veículos, em períodos de tempo de 3 minutos a 7 dias após o preparo dos medicamentos. Os veículos testados foram solução salina, Citanest com Octapressin 3% e Ultracaína. Os resultados desse estudo mostraram que para os quatro veículos aquosos as

variações de pH ocorreram entre os valores de 11,0 e 12,0 sugerindo que os anestésicos locais podem ser uma alternativa no preparo de pastas de hidróxido de cálcio.

Pacios *et al* (2003) constataram que as alterações de pH que ocorrem na dentina radicular decorrentes do emprego de pastas de hidróxido de cálcio não foram capazes de modificar a estrutura química da dentina em períodos inferiores a 35 dias. Todos os veículos empregados foram capazes de manter a alcalinidade da dentina, necessária para que ocorra ação antimicrobiana de forma a não determinar que um veículo específico seja preferível em relação a um outro.

Teixeira, Levin e Trope, em 2005 avaliaram as alterações de pH nas paredes da dentina do canal radicular e a 1 milímetro dentro da dentina do lúmen do canal no período compreendido entre 2 e 28 dias quando a medicação foi inserida empregando-se cones de papel ou espiral de Lentullo. As maiores alterações de pH foram observadas quando o medicamento foi colocado com espiral de lentullo, no entanto os valores foram semelhantes após 7 dias. Menores alterações foram constatadas no interior da dentina. Neste estudo, observou-se que o pH das superfícies dentinárias é alterado pelo contato direto com o hidróxido de cálcio.

Haapasalo *et al* (2000) avaliaram o efeito tampão promovido pelo contato da dentina em pó com substâncias químicas comumente empregadas na terapia endodôntica e a alteração das propriedades antimicrobianas desses medicamentos. O hidróxido de cálcio teve sua ação antimicrobiana frente ao *Enterococcus faecalis* anulada quando misturado com pó de dentina, o que demonstrou o efeito neutralizador promovido pela capacidade tampão da dentina.

Estrela *et al* (1999) avaliaram a influência de diferentes veículos na ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio frente a culturas puras e mistas de microrganismos. Os veículos empregados foram solução salina, paramonoclorofenol canforado, solução de clorexidina a 1%, lauril sulfato de sódio e Otosporin®. Foi verificada ação antimicrobiana após 48 horas em culturas puras de *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans* e sobre a cultura mista independente da substância empregada como veículos.

2.6.2 Digluconato de Clorexidina como Medicação Intra-canal

Em 1983, Fardal e Turnbull realizaram uma extensa revisão de literatura demonstrando o emprego da clorexidina na Odontologia. A clorexidina foi desenvolvida na década de 40, como resultado de uma pesquisa para a obtenção de um agente antiviral, no entanto observou-se um notável efeito antibacteriano. Caracterizada como uma base forte, comumente é preparada na forma de um sal de digluconato o que lhe confere uma maior estabilidade e hidrossolubilidade. A clorexidina é empregada em várias áreas da Odontologia, tais como Cariologia, Periodontia e Prótese.

Hennessey, em 1973 descreveu o mecanismo de ação da clorexidina. Segundo esse autor, a sua ação é resultante da adsorção da clorexidina na parede celular dos microrganismos. Em baixas concentrações, substâncias de baixo peso molecular tais como potássio e fósforo difundem-se para o meio externo, exercendo um efeito bacteriostático. O efeito bactericida da clorexidina é observado quando empregada em altas concentrações e resulta da coagulação do citoplasma bacteriano.

Fardal & Turnbull, em 1983 relatam que o manchamento de superfícies dentais e restaurações é o efeito adverso mais comum relacionado ao uso prolongado de clorexidina, mesmo quando empregada em baixas concentrações. Schaupp e Wohnaut demonstraram que podem ocorrer alterações no tato tais como hipogeusia e disgeusia para percepção de sensações como o doce, seguido de salgado e ácido.

A clorexidina na forma de gel pode ser empregado como substância química auxiliar durante o preparo químico-mecânico dos canais radiculares (Ferraz *et al* 2001), pois apresenta amplo espectro antimicrobiano (Vianna *et al* 2004), capacidade de lubrificação (Ferraz *et al* 2001) e principalmente capacidade antimicrobiana residual (Tonamaru Filho *et al* 2002).

Basrani *et al* (2002) demonstraram *in vitro* que a clorexidina gel 2% quando empregado como medicação intracanal por um período de sete dias apresentou ação antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* presente em dentina bovina infectada.

2.6.3 Associação do hidróxido de cálcio e clorexidina como medicação intra-canal

O emprego da associação de hidróxido de cálcio com a clorexidina tem como objetivo aumentar as propriedades antimicrobianas do hidróxido de cálcio, mantendo as suas características biológicas e mecânicas de barreira física (Gomes *et al*, *in press*)

Basrani *et al* (2004) avaliaram algumas propriedades das medicações intra-canal que poderiam afetar a liberação de hidróxido de cálcio e clorexidina quando associados. As medicações testadas foram clorexidina 0,2% e 2%, hidróxido de cálcio associado à água na proporção de 40g/100mL, e associação de hidróxido de cálcio e clorexidina 0,2%. O pH inicial para as associações de hidróxido de cálcio à clorexidina ou à água foi igual à 12,4 e não se alterou nas primeiras 24 horas. Dessa forma, a clorexidina não alterou o pH do hidróxido de cálcio, mantendo assim a ação antimicrobiana associada à liberação de íons hidroxila. O ângulo de contato do hidróxido de cálcio associado à clorexidina foi inferior àquele observado quando o hidróxido de cálcio foi associado à água, aumentando a capacidade de molhamento da medicação, o que pode explicar o acréscimo na atividade antimicrobiana da primeira associação.

Evans *et al* (2003) avaliaram o efeito antimicrobiano da associação de clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio quando comparado ao efeito da associação entre hidróxido de cálcio e água destilada em discos de dentina bovina previamente contaminada com *Enterococcus faecalis*. Após permanecerem 7 dias no interior do canal radicular, nenhum dos medicamentos associados foi capaz de eliminar completamente as bactérias do interior dos túbulos dentinários. No entanto, os resultados demonstraram que a associação entre clorexidina 2% na forma de gel e hidróxido de cálcio foi mais efetiva na eliminação das bactérias.

Gomes *et al* (2003) avaliaram a efetividade do gel de digluconato de clorexidina 2% na forma de gel e hidróxido de cálcio como medicação intra-canal em diferentes períodos de tempo (1, 2, 7, 15 e 30 dias). Para o estudo, foram empregadas raízes de dentes bovinos previamente infectadas com *Enterococcus faecalis*. As medicações testadas clorexidina gel 2%; hidróxido de cálcio com polietileno glicol 400; e, clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio. Observou-se que o

gel de clorexidina 2% inibiu o crescimento bacteriano proveniente das amostras de dentina infectada em todos os períodos de tempo. A associação de hidróxido de cálcio e polietilenoglicol 400 foi ineficiente na eliminação bacteriana em todos os períodos de teste. Observou-se ausência de contaminação da dentina nos períodos de 1 e 2 dias nas amostras onde a associação de clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio foi empregada. Nos períodos subseqüentes de 7 e 15 dias houve um decréscimo da atividade antimicrobiana e em 30 dias, todas as amostras desse grupo apresentaram-se contaminadas. Dessa forma, concluiu-se que a clorexidina 2% na forma de gel tem uma ampla ação antimicrobiana frente ao *Enterococcus faecalis*, no entanto, quando associado ao hidróxido de cálcio, tem sua ação reduzida se empregado por longos períodos de tempo.

2.6.4 Óxido de Zinco e associações como Medicação Intra-canal

Além dos veículos, algumas substâncias químicas podem ser adicionadas ao hidróxido de cálcio, no intuito de melhorar as suas propriedades físico-químicas para utilização clínica (Siqueira Jr, 2004).

O óxido de zinco é um pó branco amarelado, inodoro, amorfo, insolúvel na água e no álcool, radiopaco e ligeiramente anti-séptico (Siqueira Jr, 2004) que pode estar presente na composição de cimentos endodônticos para obturação dos canais radiculares (Pizzo *et al* 2006) e em cones de guta-percha (Spangberg *et al* 1998).

Jonck *et al* (1979) constataram a presença de zinco em dentina radicular quando cimentos obturadores a base de óxido de zinco foram empregados na obturação de canais radiculares *in vitro*.

Leonardo *et al* (2000) verificaram que o óxido de zinco associado à água destilada inibiu crescimento de *Enterococcus faecalis* após 24 horas, no entanto, os halos de inibição foram inferiores aos demais medicamentos.

Siqueira Jr *et al* (2003) avaliaram a capacidade de algumas medicações intra-canal em eliminar *Candida albicans* em dentina radicular bovina infectada. Quatro associações de medicamentos foram testadas em diferentes períodos de permanência. Observou-se que após o período de 1 hora os espécimes tratados com a associação de hidróxido de cálcio/paramonoclorofenol canforado/glicerina e

com solução de digluconato de clorexidina 0,12%/óxido de zinco não apresentavam contaminação bacteriana. Quando o hidróxido de cálcio foi associado com glicerina, somente após 7 dias havia completa eliminação de células de *C. albicans* da dentina radicular. Todas as amostras que continham a associação de hidróxido de cálcio e solução de digluconato de clorexidina 0,12% apresentavam contaminação mesmo após uma semana de exposição.

Moorer & Genet (1982), ao avaliarem a contribuição do óxido de zinco nas propriedades antimicrobianas de cones de guta-percha, constataram que este composto apresenta propriedades biológicas que necessitam estudos adicionais, desconsiderando a hipótese que este seja um composto inerte.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

1. Avaliar o efeito de diferentes medicações intra-canal na superfície radicular externa frente a patógenos endodônticos e periodontais.
2. Verificar o efeito da remoção do cimento radicular na atividade antimicrobiana de diferentes medicações intra-canal na superfície radicular externa.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 MATERIAIS EMPREGADOS

4.1.1 Microrganismos

4.1.1.1 Aeróbio

- *Candida albicans*

4.1.1.2 Anaeróbios facultativos

- *Enterococcus faecalis*
- *Actinomyces viscosus*

4.1.1.3 Anaeróbio estrito

- *Porphyromonas gingivalis*

4.1.2 MEIOS DE CULTURA

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

4.1.3 MEDICAMENTOS TESTADOS

- Soro fisiológico
- Clorexidina gel 2%
- Hidróxido de cálcio PA
- Óxido de zinco
- Hipoclorito de sódio 5,25%
- Ácido dietilaminotetracético (EDTA) 17%

4.2 PREPARO DOS DENTES

Foram selecionados 300 caninos superiores que apresentavam raízes retas, ápices com formação completa e canais únicos. Os dentes foram coletados e armazenados em solução fisiológica após a exodontia.

As coroas dentais foram seccionadas com disco de carburundum (KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri, SP) ao nível da junção amelo-cementária. As raízes foram padronizadas no comprimento de 15 milímetros, utilizando-se um paquímetro digital para a mensuração. Procedeu-se então a verificação da patência do canal radicular com lima tipo K número 15.

4.2.1 Padronização do diâmetro do forame apical

Os canais foram instrumentados progressivamente até a lima tipo K #25 na altura do forame apical. Durante este preparo, 1,0 mL de soro fisiológico foi utilizado a cada troca de lima. A fim de se evitar a desidratação, os dentes foram mantidos em gaze umedecida durante toda a instrumentação.

4.2.2 Técnica de Instrumentação

A Técnica de Roane Modificada pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP) é constituída de duas fases, sendo a primeira destinada ao preparo do corpo do canal (terços cervical e médio) e a segunda destinada ao preparo do terço apical. Durante o preparo, a cada início de uma nova lima ou broca, 5 mL de soro fisiológico foi levado ao canal com auxílio de uma seringa descartável BD de 10mL e agulha 20 x 5,5.

4.2.2.1 Primeira Fase – Fase Acionada a Motor

A seqüência empregada foi:

- acesso cervical com Limas HERO tip 20, taper 0,6, penetrando no máximo 5mm aquém no ápice, em direção às paredes do canal radicular;
- preparo crown-down com broca Gates-Glidden #5 em profundidade de 4mm;
- preparo crown-down com broca Gates-Glidden #4 em profundidade de 6mm;
- preparo crown-down com broca Gates-Glidden #3 em profundidade de 8mm;
- preparo crown-down com broca Gates-Glidden #2 em profundidade de 10mm.

4.2.2.2 Segunda Fase – Fase Manual

Consiste no preparo do terço apical e confecção do ombro apical. Essa fase foi iniciada com a penetração da lima tipo K #25 em 15 mm objetivando debridar o forame apical. Entre instrumentos sucessivos, o canal radicular foi irrigado com 5,0 mL de solução fisiológica.

- Lima K #25, em um comprimento de trabalho de 15 mm;
- Lima K #30, em um comprimento de trabalho de 14 mm;

- Lima K #35, em um comprimento de trabalho de 14 mm;
- Lima K #40, em um comprimento de trabalho de 13 mm;
- Lima K #45, em um comprimento de trabalho de 12 mm;
- Lima K #50, em um comprimento de trabalho de 11 mm;
- Lima K #55, em um comprimento de trabalho de 10 mm; e,
- Lima K #60, em um comprimento de trabalho de 9 mm.

4.2.3 Tratamento da Superfície Radicular Externa

Os dentes foram divididos em dois grupos, de acordo com o tratamento da superfície radicular externa. Em um dos grupos realizou-se a remoção do cimento radicular, empregando-se ponta diamantada cilíndrica longa (ref. 3101, KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) em alta rotação e sob refrigeração, com o objetivo de expor a dentina radicular. Outro grupo recebeu apenas remoção do cálculo visível.

4.2.4 Remoção da Smear Layer

A *smear layer* formada durante as fases de preparo químico-mecânico e raspagem radicular foi removida lavando-se os dentes em EDTA 17% por 10 minutos, em NaOCl 5,25% por mais 10 minutos sob agitação constante (Agitador-Aquecedor FANEM, São Paulo, Brasil). Submeteu-se as amostras a uma lavagem com água corrente por 1 hora para a remoção dos possíveis resíduos de EDTA e NaOCl (Perez *et al.* 1993, Ferraz *et al.* 2001).

4.2.5 Armazenamento das amostras

Os dentes foram autoclavados por 30 minutos a 121°C e 1 atm, em grupos de 5 unidades cada, dispostos em frascos de vidro com tampas rosqueáveis contendo 5 mL de água destilada.

4.3 VERIFICAÇÃO DA AUSÊNCIA DE TRINCAS NAS RAÍZES DENTAIS

Empregando-se gaze estéril embebida em solução fisiológica e sob utilização de microscópio óptico para uso odontológico, em aumento de 40x, verificou-se a presença de trincas e traços de fratura na superfície radicular. Os dentes que apresentaram trincas ou traços de fratura foram excluídos do estudo.

4.4 PREPARO DAS MEDICAÇÕES INTRACANAL

Sobre culturas puras de microrganismos *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces viscosus* e *Candida albicans* foram empregados quatro tipos de medicação intra-canal e dois tipos de tratamento para a superfície radicular externa, o que determinará a divisão das amostras em 16 grupos de teste e 4 grupos controle, conforme esquematizado na tabela abaixo.

Tabela 1

Distribuição das amostras em grupos considerando o microrganismo, a medicação intra-canal e a execução da raspagem radicular

Grupo	Microrganismo	Medicação intra-canal	Raspagem
C1	<i>E. faecalis</i>	Soro fisiológico	Não
C2	<i>E. faecalis</i>	Soro fisiológico	Sim
C3	<i>P. gingivalis</i>	Soro fisiológico	Não
C4	<i>P. gingivalis</i>	Soro fisiológico	Sim
G1	<i>E. faecalis</i>	Ca(OH) ₂ + Soro fisiológico	Não
G2	<i>E. faecalis</i>	Ca(OH) ₂ + Soro fisiológico	Sim
G3	<i>E. faecalis</i>	Clorexidina gel 2%	Não
G4	<i>E. faecalis</i>	Clorexidina gel 2%	Sim
G5	<i>E. faecalis</i>	Ca(OH) ₂ + Clorexidina gel 2%	Não
G6	<i>E. faecalis</i>	Ca(OH) ₂ + Clorexidina gel 2%	Sim

G7	<i>E. faecalis</i>	Ca(OH) ₂ + Clorexidina gel 2% + Óxido de Zinco	Não
G8	<i>E. faecalis</i>	Ca(OH) ₂ + Clorexidina Gel 2% + Óxido de Zinco	Sim
G9	<i>P. gingivalis</i>	Ca(OH) ₂ + Soro fisiológico	Não
G10	<i>P. gingivalis</i>	Ca(OH) ₂ + Soro fisiológico	Sim
G11	<i>P. gingivalis</i>	Clorexidina gel 2%	Não
G12	<i>P. gingivalis</i>	Clorexidina gel 2%	Sim
G13	<i>P. gingivalis</i>	Ca(OH) ₂ + Clorexidina gel 2%	Não
G14	<i>P. gingivalis</i>	Ca(OH) ₂ + Clorexidina gel 2%	Sim
G15	<i>P. gingivalis</i>	Ca(OH) ₂ + Clorexidina gel 2% + Óxido de Zinco	Não
G16	<i>P. gingivalis</i>	Ca(OH) ₂ + Clorexidina gel 2% + Óxido de Zinco	Sim
G17	<i>A. viscosus</i>	Ca(OH) ₂ + Soro fisiológico	Não
G18	<i>A. viscosus</i>	Ca(OH) ₂ + Soro fisiológico	Sim
G19	<i>A. viscosus</i>	Clorexidina gel 2%	Não
G20	<i>A. viscosus</i>	Clorexidina gel 2%	Sim
G21	<i>A. viscosus</i>	Ca(OH) ₂ + Clorexidina gel 2%	Não
G22	<i>A. viscosus</i>	Ca(OH) ₂ + Clorexidina gel 2%	Sim
G23	<i>A. viscosus</i>	Ca(OH) ₂ + Clorexidina gel 2% + Óxido de Zinco	Não
G24	<i>A. viscosus</i>	Ca(OH) ₂ + Clorexidina gel 2% + Óxido de Zinco	Sim
G25	<i>C. albicans</i>	Ca(OH) ₂ + Soro fisiológico	Não
G26	<i>C. albicans</i>	Ca(OH) ₂ + Soro fisiológico	Sim
G27	<i>C. albicans</i>	Clorexidina gel 2%	Não
G28	<i>C. albicans</i>	Clorexidina gel 2%	Sim
G29	<i>C. albicans</i>	Ca(OH) ₂ + Clorexidina gel 2%	Não
G30	<i>C. albicans</i>	Ca(OH) ₂ + Clorexidina gel 2%	Sim
G31	<i>C. albicans</i>	Ca(OH) ₂ + Clorexidina gel 2% + Óxido de Zinco	Não
G32	<i>C. albicans</i>	Ca(OH) ₂ + Clorexidina gel 2% + Óxido de Zinco	Sim

4.5 PREPARO E COLOCAÇÃO DA MEDICAÇÃO INTRA-CANAL

4.5.1 Soro Fisiológico

O soro fisiológico foi injetado no canal com seringa BD plástica de 5,0 mL e agulha descartáveis 25x7 (Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda, Curitiba, PR), preenchendo-o totalmente.

4.5.2 Clorexidina gel 2%

A clorexidina gel 2% foi injetada no canal com seringa BD plástica de 3,0 mL e agulha descartáveis 25x7 (Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda, Curitiba, PR), preenchendo-o totalmente.

4.5.3 Clorexidina gel 2% e Hidróxido de Cálcio PA

A associação de clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio PA foi realizada na proporção 1:1 em volume, misturando-se então homogeneamente, com espátula número 36 em placa de Petri estéril. A inserção no interior do canal radicular foi feita utilizando-se espiral de Lentullo e limas tipo K #30.

4.5.4 Clorexidina gel 2%, Hidróxido de Cálcio PA e Óxido de Zinco

A associação de clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio PA e óxido de zinco foi realizada na proporção 1:1:1 em volume, misturando-se então homogeneamente, com espátula número 36 em placa de Petri estéril. A inserção no interior do canal radicular foi feita utilizando-se condensadores de Paiva e cones de guta percha desinfetados e calibrados com diâmetro equivalente a uma Lima tipo K #60.

4.6 SELAMENTO DOS DENTES

As raízes foram seladas inicialmente na porção apical fazendo-se um botão de cera previamente aquecida. Após a inserção das medicações, a abertura cervical foi limpa com mechas de algodão estéril e selada com um tampão de cera rosa aquecida, nos limites laterais até o selamento total.

4.7 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

A ação antimicrobiana das medicações foi avaliada pelo método de difusão em ágar, com algumas modificações, e posterior leitura dos halos de inibição de crescimento microbiano.

O microrganismo anaeróbio facultativo foi subcultivado em placas de BHIA e incubado por 18-24 h a 37°C (em atmosfera de 10% CO₂). O microrganismo anaeróbio estrito foi subcultivado em placas de FAA + 5% sangue de carneiro desfibrinado (EBEFARMA, Araras, SP) e incubado em câmara de anaerobiose (Bom Whitley Scientific, Bradford, UK) em atmosfera anaeróbia de 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂ por 48 horas.

Após o crescimento em meio sólido, colônias isoladas de anaeróbios facultativos foram suspensas em tubos contendo 5 mL de solução estéril de NaCl 0,85%. Após agitação mecânica, a suspensão era ajustada em espectrofotômetro com absorbância de 800 nm, até atingir a concentração equivalente a 0.5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ bactérias/mL).

Para as bactérias estritamente anaeróbias, colônias suspensas em solução estéril de NaCl a 0,85% até atingir uma concentração equivalente a 1 da escala de MacFarland foram obtidas. Tais inóculos foram utilizados pois promovem crescimento semi-confluyente de todos os microrganismos testados.

4.8 PREPARO DAS CAMADAS DE ÁGAR E DO INÓCULO

Para avaliar a atividade antimicrobiana das substâncias testadas frente às bactérias anaeróbias facultativa e estrita foram utilizadas placas de 140 mm de diâmetro. Os testes foram realizados em triplicata e em tempos diferentes.

4.8.1 Bactérias Aeróbias e Anaeróbias Facultativas

Utilizou-se o método da camada dupla.

Inicialmente foram preparadas placas contendo 40 mL de Muller Hinton Agar (MHA) que serviram de base para a camada de inóculo, que era preparada a seguir.

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

4.8.2 Bactérias Anaeróbias Estritas

Para as bactérias anaeróbias estritas foi utilizada somente uma camada de meio de cultura, a qual o inóculo bacteriano foi plaqueado diretamente.

Placas foram preparadas com 80 mL de FAA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Após a solidificação do agar, as placas foram colocadas em atmosfera de anaerobiose por 24 horas para serem pré-reduzidas. A seguir, 300 µL do inóculo bacteriano foi plaqueado, de forma uniforme, diretamente sobre o meio de cultura utilizando-se uma alça de vidro estéril.

4.9 COLOCAÇÃO DOS DENTES SOBRE A SUPERFÍCIE DO ÁGAR

No interior da câmara de fluxo laminar, após a solidificação dos meios de cultura, as amostras foram colocadas sobre a superfície do agar utilizando-se pinças estéreis. A manipulação das placas contendo culturas anaeróbias foi feita sob o fluxo contínuo de nitrogênio para reduzir o tempo de exposição de tais bactérias à atmosfera ambiente.

4.10 INCUBAÇÃO

As placas foram incubadas a 37°C em condições gasosas apropriadas.

4.11 LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO

A leitura para os organismos anaeróbios facultativos foi feita após 48 horas de incubação a 10% de CO₂. Finalmente, a primeira leitura para as bactérias anaeróbias estritas foi feita após 7 dias de incubação em atmosfera de 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂.

Os raios das zonas de inibição microbiana corresponderam à distância entre a superfície externa da raiz e o início da região de crescimento microbiano, os quais foram medidos com auxílio de paquímetro digital (DIGIMESS Instrumentos de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa BioEstat 3.0 (CNPq, 2003, Belém, Pará, Brasil) utilizando os Testes de Kruskal-Wallis e Teste ANOVA – um critério. A significância foi estabelecida em nível de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS MEDICAÇÕES INTRACANAIS

As medicações intracanais que apresentaram efeito antimicrobiano, do mais intenso ao mais brando foram clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio + óxido de zinco + clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio + solução fisiológica.

O hidróxido de cálcio associado ao soro fisiológico não demonstrou ação antimicrobiana frente ao *Actinomyces viscosus*, a *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Porphyromonas gingivalis*.

Os maiores halos de inibição promovidos pela ação da associação entre hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% foram frente ao *A. viscosus*.

A capacidade da clorexidina gel 2% em inibir o crescimento de *P. gingivalis*, *E. faecalis* e *C. albicans* foi semelhante estatisticamente ($p \leq 0,05$).

A associação hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2% + óxido de zinco foi mais efetiva contra *Enterococcus faecalis* quando comparada aos demais microrganismos testados.

Tabela 2

Mediana dos diâmetros dos halos de inibição (mm) proporcionados por medicações intracanaís, não considerando a remoção ou não do cimento radicular.

Medicamentos	Microrganismos			
	<i>E. faecalis</i> (n=18)	<i>P. gingivalis</i> (n=18)	<i>A. viscosus</i> (n=18)	<i>C. albicans</i> (n=18)
Ca(OH) ₂ + soro fisiológico	0,00 a B	0,00 a B	0,00 a B	0,00 a B
Ca(OH) ₂ + CHX gel 2%	2,16 a A	0,79 ab AB	2,85 a B	0,00 b B
CHX gel 2%	2,86 b A	1,94 b A	7,42 a A	3,05 b A
Ca(OH) ₂ + ZnO + CHX gel 2%	2,73 a A	0,00 b B	0,00 b B	0,00 b B

n = número de amostras; as letras indicam diferença estatística significativa; os valores dos halos de inibição para grupos com as mesmas letras (a, b ou c) na mesma linha não diferem estatisticamente entre si; os valores de halos de inibição para grupos com as mesmas letras (A, B ou C) em uma mesma coluna não diferem estatisticamente entre si.

5.2 SUSCEPTIBILIDADE MICROBIANA ÀS DIFERENTES MEDICAÇÕES INTRACANAIS

Todos os microrganismos testados sofreram inibição de crescimento pela difusão dos medicamentos intracanaís na superfície externa da raiz, exceto quando expostos à associação de hidróxido de cálcio e solução fisiológica.

A susceptibilidade dos microrganismos aos medicamentos foi variável. Os microrganismos que apresentaram maiores halos de inibição foram *Actinomyces viscosus* (0,95 mm) e *E. faecalis* (1,96 mm). O anaeróbio estrito *P. gingivalis* e o

fungo *Candida albicans* foram menos suscetíveis à ação antimicrobiana dos medicamentos.

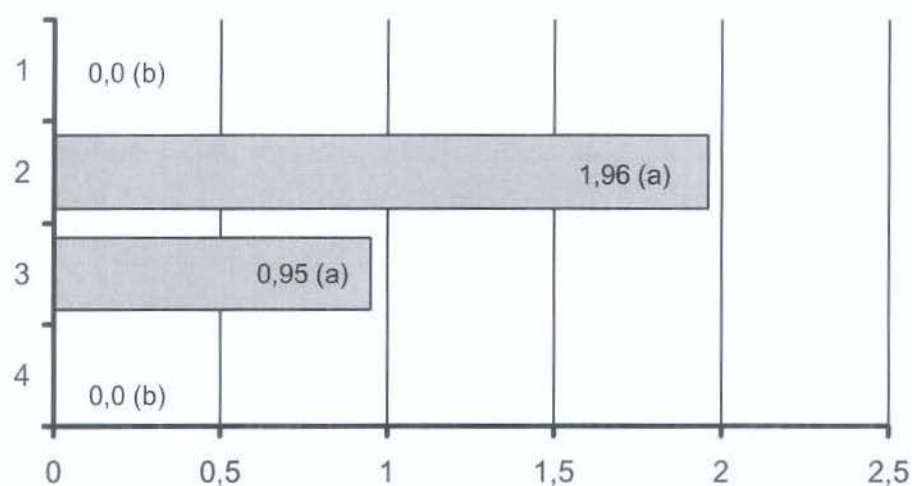


Figura 1 – Susceptibilidade dos microrganismos a ação das diferentes medicações, considerando a mediana dos halos de inibição (mm).

Onde: 1 – *C. albicans*; 2 – *E. faecalis*; 3 – *A. viscosus*; 4 – *P. gingivalis*; as letras indicam diferença estatística; os grupos com a mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância.

5.4 INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DO CEMENTO RADICULAR NA DIFUSÃO DAS MEDICAÇÕES INTRACANAIS

A presença ou não de cimento radicular não modificou a capacidade das substâncias em atingir a superfície radicular externa e exercer a sua ação antimicrobiana.

Tabela 3

Mediana (mm) dos halos de inibição de crescimento microbiano quando o cimento da superfície radicular foi removido ou não (n=36).

Microrganismos	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>A. viscosus</i>	<i>P. gingivalis</i>
Com cimento	0,00 (1,68) a	2,41(1,69) a	0,45 (3,60) a	0,79 (0,99) a
Sem cimento	0,00 (1,73) a	2,12 (1,60) a	2,40 (3,35) a	0,00 (1,54)a
Medicações	Ca(OH) ₂ + soro	Ca(OH) ₂ + CHX gel 2%	CHX gel 2%	Ca(OH) ₂ + ZnO + CHX gel 2%
Com cimento	0,00 a	1,25 (1,95) a	3,65 (3,31) a	0,00 a
Sem cimento	0,00 a	1,09 (1,59) a	2,26 (2,48) a	0,00 a

n = número de amostras; as letras representam diferença estatística significativa; os grupos na mesma linha com as mesmas letras (a, b ou c) não diferem estatisticamente entre si.

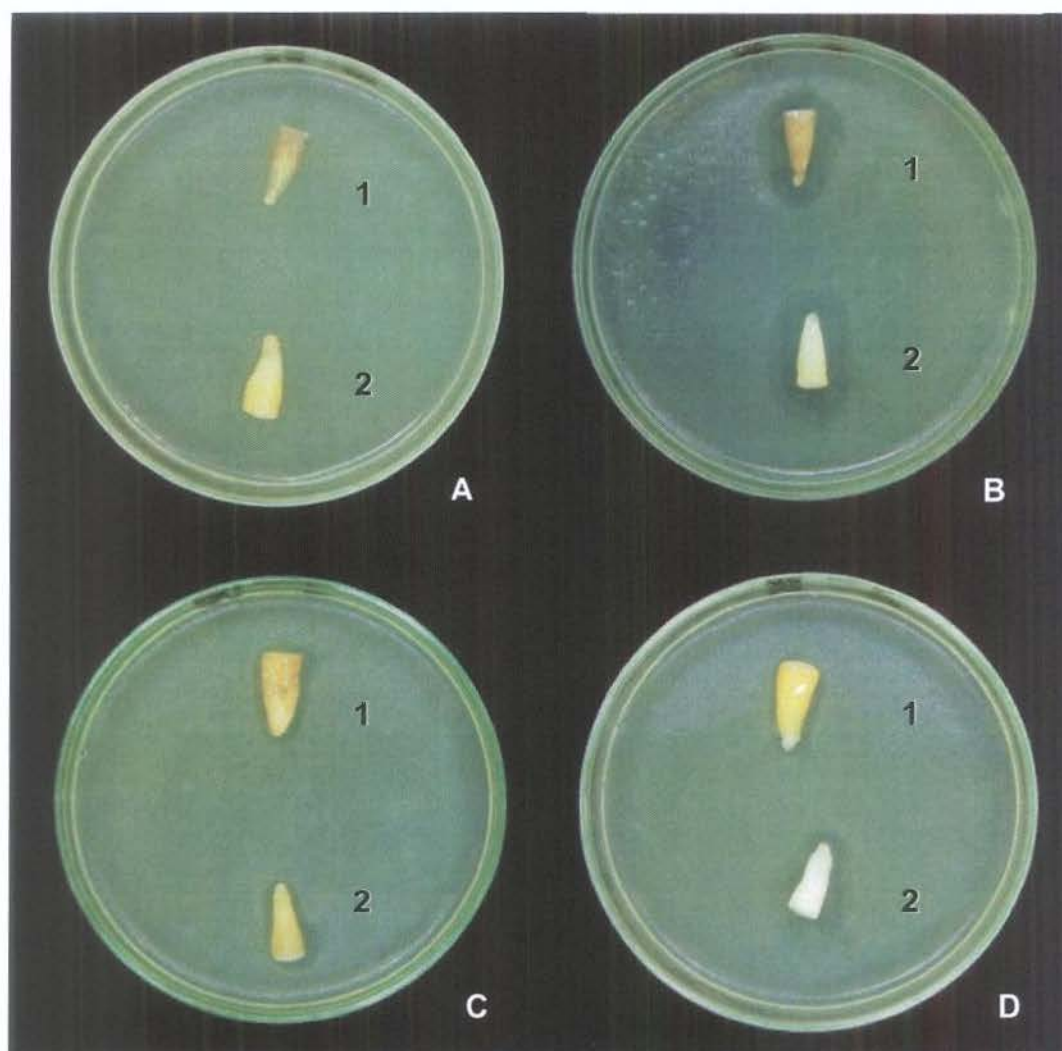


Figura 2 – Halos de inibição de crescimento para *Enterococcus faecalis* produzidos pelas diferentes medicações intracanaais, quando o cimento radicular foi removido ou não. A) Hidróxido de cálcio + soro fisiológico: 1 – sem raspagem, 2 – com raspagem; B) Hidróxido de cálcio + Clorexidina gel 2%: 1 – com raspagem, 2 – sem raspagem; C) Clorexidina gel 2%: 1 – sem raspagem, 2 – com raspagem; e, D) Hidróxido de cálcio + óxido de zinco + clorexidina gel 2%: 1 – sem raspagem, 2 – com raspagem.

6 DISCUSSÃO

Vários modelos de estudo *in vitro* têm sido propostos na literatura para estudar a difusão de substâncias químicas auxiliares (Berber *et al* 2006) e medicamentos intra-canal (Tronstad *et al* 1981, Gomes *et al* 2003) na dentina e também as alterações no pH que elas podem ocasionar (Nerwich *et al* 1993, Minana *et al* 2001, Teixeira *et al* 2005). Contudo o efeito antimicrobiano de medicações intra-canais na superfície radicular externa através de sua difusão no maciço dentinário sobre microrganismos encontrados em lesões endodônticas e periodontais não foi ainda avaliado.

A ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio está relacionada ao seu pH alcalino. A alteração no pH dentinário causada por íons hidroxila é lento e depende de vários fatores que podem alterar as taxas de difusão e dissociação, como o nível de hidrossolubilidade do veículo empregado, diferença na viscosidade, características ácido-básicas, permeabilidade dentinária e possíveis áreas de calcificação. Em nosso estudo, a pasta de hidróxido de cálcio e soro não apresentou ação antimicrobiana pela difusão na dentina e nem pelo contato direto. Isso sugere que não houve difusão de íons suficiente no maciço dentinário e nem alteração de pH suficiente para causar inibição do crescimento dos microrganismos testados.

Gomes *et al* (2003) avaliaram a efetividade da associação de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% e separadamente como medicação intra-canal contra o *Enterococcus faecalis*. Foi demonstrado que a clorexidina gel 2% apresentou melhor ação antimicrobiana do que quando associada ao hidróxido de cálcio, no entanto perde suas propriedades se empregada por longos períodos de tempo. Entretanto, a combinação de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% inibiu o crescimento de *E. faecalis* após 1 e 2 dias de contato. No presente estudo, os resultados demonstraram que a CHX gel 2% produziu os maiores halos de inibição de crescimento microbiano para todas as espécies testadas, seguida de sua associação com o pó de hidróxido de cálcio.

Moorer *et al* (1982), Leonardo *et al* (2000) e Siqueira *et al* (2003) observaram que o óxido de zinco apresenta propriedades antimicrobianas. Em nosso estudo, a associação de óxido de zinco + clorexidina gel 2% + hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio inibiu o crescimento do *Enterococcus faecalis*.

As espécies pertencentes ao gênero *Actinomyces* estão freqüentemente associadas a infecções extra-radulares (Xia *et al* 2003). Sunde *et al* (2002) ao avaliarem amostras de lesões periapicais encontraram grânulos de enxofre os quais são frequentemente associados à presença *Actinomyces* spp. Apesar destas características, *Actinomyces viscosus* foi bastante suscetível à ação dos medicamentos intracanal na superfície radicular externa. Os microrganismos mais resistentes foram *P. gingivalis* e *C. albicans* obtidos de amostra clínica.

Estudos anteriores demonstraram que sítios que apresentavam bolsas periodontais profundas com contínua perda óssea após a raspagem periodontal apresentavam o microrganismo *Porphyromonas gingivalis* (Socransky *et al* 1998, Chaves *et al* 2000). Grenier *et al* (1995) constatou que a membrana celular externa da *P. gingivalis* é capaz de produzir e liberar vesículas que neutralizam o efeito antimicrobiano da clorexidina, permitindo a proteção desta bactéria e de outras bactérias associadas. A diminuição da susceptibilidade desses microrganismos aos agentes antimicrobianos pode ser explicada por determinantes ambientais que podem favorecer o aparecimento de vários fatores de virulência.

O cimento radicular forma uma barreira protetora aos tecidos radulares, no entanto, ele pode ser alterado por agentes fisiológicos, bacterianos ou ambientais (Love *et al* 2002) como ácidos orgânicos da bolsa periodontal (Selvig 1969). Além disso, sabe-se que os procedimentos de raspagem radicular podem causar exposição dos túbulos dentinários, favorecendo um aumento na permeabilidade dentinária e a invasão dos túbulos por bactérias. No presente estudo, zonas de inibição de crescimento microbiano similares foram observadas nas raízes em que o cimento foi removido e nas raízes onde foi mantido. No entanto, deve-se considerar que o cimento pode interferir na difusão das substâncias em um nível que não afeta a susceptibilidade das bactérias à ação da medicação ou que não pode ser verificada no teste de difusão em ágar.

7 CONCLUSÕES

Diante do exposto, nas condições experimentais para o presente estudo, podemos concluir que:

- 1 – a associação de hidróxido de cálcio e soro fisiológico não mostrou atividade antimicrobiana na superfície radicular externa no período de 72 horas;
- 2 – a clorexidina gel 2% e suas associações com hidróxido de cálcio e óxido de zinco demonstraram rápida capacidade de difusão na dentina radicular, ocasionando inibição de crescimento bacteriano;
- 3 – a remoção do cimento radicular não modificou a atividade antimicrobiana das diferentes medicações testadas na superfície radicular externa.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int End J*. 1998; 31:39-47.

Basrani B, Santos JM, Tjäderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, Lawrence HP, Friedman S. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human dentine. *Oral Surg Oral Med Oral Pat Oral Rad Endod*. 2002; 94: 240-245.

Basrani B, Ghanem A, Tjäderhane L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. *J Endod*. 2004; 30(6):413-417.

Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *J Endod*. 2000; 26(12):695-698.

Carrigan PJ, Morse DR, Furst ML, Sinai I. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. *J Endod*. 1984; 10(8): 359-363.

Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC, Snyder B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Period*. 2000; 27: 897-903.

Dahlén G. Microbiology and treatment of dental abscesses and periodontal-endodontic lesions. *Periodontol 2000*. 2002; 28: 206-239.

UNICAMP / FOP
BIBLIOTECA

De Deus QD. *Endodontia*. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSCI; 1992.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Egan MW, Spratt DA, Ng I-L, Lam JM, Moles DR, Gubilavala K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int Endod J*. 2002; 35:321-329.

Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Fellipe Jr O. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. *Rev Fac Odont Bauru*. 1994; 2:29-36.

Estrela C, Pesce HF. Chemical analysis of the formation of calcium hydroxyl ions of calcium hydroxide pastes in the presence of connective tissue of the dog. Part I. *Braz Dent J*. 1996; 7:41-46.

Estrela C, Bamman LL, Pimenta FC, Pécora JD. Control of microorganisms *in vitro* by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J*. 2001; 34: 341-345.

Estrela C, Estrela CRA. O hidróxido de cálcio é a única medicação intra-canal para combater a infecção endodôntica? *In*: Cardoso RJA, Gonçalves EAN, organizadores. *Endodontia & Trauma*. 1 ed.; 2002.

Estrela C, Estrela CRA, Guimarães LF, Silva RS, Pécora JD. Surface tension of calcium hydroxide associated with different substances. *J Appl Oral Sci* 2005; 13:152-6.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002; 35:221-8.

Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul S-U. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod*. 2003; 29(5): 338-339.

Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. **JADA**. 1986; 112:863-869.

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 and endodontic irrigant. **J Endod**. 2001; 27:452-455.

Foreman PC, Barnes IE. A review of calcium hydroxide. **Int Endod J**. 1990; 23:283-297.

Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. **Archs oral Biol**. 1976; 21(6): 355-362.

Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. **Int Endod J**. 1994; 27:291-294.

Gomes BPFA. **An investigation into the root canal microflora** [thesis] Manchester – UK:UDHM; 1995.

Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Clinical significance of dental root canal microflora. **J Dent**. 1996; 29: 47-55.

Gomes BPFA. Microorganismos: quais são, onde estão e que danos causam? In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN, organizadores. **Endodontia & Trauma**. 1 ed.; 2002.

Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. **Int Endod J**. 2003; 36: 267-275.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol Immunol.** 2004; 19: 71-76.

Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TMT, Orstavik D, Haapasalo MPP. Inactivation of local root canal medicaments by dentin: an *in vitro* study. **Int Endod J** 2000; 33:126-131.

Hancock III HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacterial isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2001; 91:579-586.

Hennessey TS. Some antibacterial properties of chlorhexidine. **J Period Res.** 1973; 8(suppl 12):61-67.

Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. **Periodontol 2000.** 2005; 38:72-122.

Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Incidence and antimicrobial suscepibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated form mixed endodontic infections. **Int End J.** 2006; 39:62-70.

Jaramillo A, Arce RM, Herrera D, Batancourth M, Botero JE, Contreras A. Clinical and microbiological characterization of periodontal abscesses. **J Clin Period.** 2005; 32: 1213-1218.

Jenkins GN. The physiology and biochemistry of the mouth. 4ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1978.

Jonck LM, Eriksson C, Comins NR. An EDX analysis of the root dentin in teeth treated endodontically with zinc oxide and eugenol. **J Endod.** 1979; 48:561-563.

Kakehashi S, Sanlay HR, Fitzberald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1965; 20: 340-343.

Kipioti A, Nakou M, Lekajis N, Mitsis F. Microbiological findings of infected root canals and adjacent periodontal pockets in teeth with advanced periodontitis. **Oral Med Oral Surg Oral Pathol.** 1984; 58:213-220.

Kontakiotis E, Nakou M, Georgopoulou M. In vitro study of indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. **Int End Jour** 1995;28:285-95.

Kurihara H, Kobayashi Y, Francisco AI, Isoshima O, Nagai A, Murayama Y. A microbiological and immunological study of endodontic-periodontic lesions. **J End.** 1995; 21:617-621.

Leonardo MR, Silva LAB, Tonamaru Filho M, Bonifácio KC, Ito IY. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in Endodontics. **J End.** 2000; 26(7): 391-394.

Lomçali G, Sen BH, Çankaya H. Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. **End Dent Traumat.** 1996; 12: 70-76.

Lopes HP & Siqueira Jr JF. **Endodontia: Biologia e Técnica.** Rio de Janeiro: MEDSI (1999).

Love RM. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. **Int End J.** 2001; 34: 399-405.

Miñana M, Carnes DL, Walker III WA. pH changes at the surface of root dentin after intracanal dressing with calcium oxide and calcium hydroxide. **J Endod.** 2001; 27(1):43-45.

Mjör IA, Nordahl I. The density and branching of dentinal tubules in human teeth. **Archs oral Biol.** 1996; 41(5): 401-412.

Moorer WR, Genet JM. Antibacterial activity of gutta-percha cones attributed to the zinc oxide component. **Oral Surg.** 1982, 53(5):508-517.

Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. **J Dent Res.** 2002; 81: 761-766.

Nagaoka S, Miyasaki FJ, Liu HJ, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. **J Endod.** 1995; 21: 70-73.

Nakabayashi N, Pashley D. **Hybridization of Dental Hard Tissues.** Quintessence Publishing:Tokyo; 1998.

Nerwich A, Figdor D, Meser HH. pH changes in root dentine over a 4 week period following root canal dressing with calcium hydroxide. **J Endod.** 1993; 19: 302-306.

Pacios MG, De la Casa ML, Bulacio MA, López ME. Calcium hydroxide's association with different vehicles: *in vitro* action on some dentinal components. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*** 2003; 96:-101.

Pashley DH. Dentin permeability: theory and practice. In: Spangberg LSW. ***Experimental Endodontics.*** Boca Raton: CRC Press, 1990.

Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. ***Int End J.*** 1995; 28: 95-99.

Peters LB, Wesselink PR. Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. ***Int Endod J.*** 2001; 35: 660-667.

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. ***Int Endod J.*** 2003; 36:1-11.

Pizzo G, Giammanco GM, Cumbo E, Nicolosi G, Gallina G. *In vitro* antibacterial activity of endodontic sealers. ***J Dent.*** 2006; 34(1):35-40.

Puapichartdumrong P, Ikeda H, Suda H. Influence of the pulpal components on human dentin permeability *in vitro*. ***Int Endod J.*** 2005; 38: 152-159.

Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, Bagg J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. ***J Clin Microb*** 2001; 39: 3282-3289.

Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. **J Endod**. 1993. 19(2):76-78.

Schaupp H, Wohnaut H. Disturbances of taste from oral disinfectants. **HNO** 1978. 26(10):335-341.

Seltzer S. **The dental pulp: biologic considerations in dental procedures**. Philadelphia: JB Lippincott; 1988.

Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. **Int Endod J**. 2001; 34:1-10.

Siqueira JF Jr, Lopes HP. Bacteria on the apical root surface of untreated teeth with periradicular lesions: a scanning electron microscopy study. **Int Endod J**. 2001; 34(3): 216-220.

Siqueira Jr JF. Medicação intracanal: por que e quando usar? *In*: Cardoso RJA, Gonçalves EAN, organizadores. **Endodontia & Trauma**. 1 ed., 2002, v. 2, p. 217-238.

Siqueira Jr JF, Rôças IN, Lopes HP, Magalhães FAC, Uzeda M. Elimination of *Candida albicans* infection of the radicular dentin by intracanal medications. **J Endod**. 2003. 29(8):501-504.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2004; 97:85-94.

Siren EK, Haapsalo MPP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J*. 1997; 30:91-95.

Slots J, Bragd L, Wikström M, Dahlén G. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* e *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol*. 1986; 13: 570-577.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25:134-144.

Solak H, Öztan MD. The pH changes of four different calcium hydroxide mixtures used for intracanal medication. *J Oral Rehab*. 2003; 30:436-439.

Spangberg LSW. Instruments, materials and devices. In: Cohen S, Burns RC, eds. **Pathways of the Pulp**. 7 ed, p. 508-510. St Louis: CV Mosby. 1998.

Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod*. 2002; 28(4):304-310.

Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endod Topics*. 2004; 9: 27-36.

Teixeira FB, Levin LG, Trope M. Investigation of pH at different dentinal sites after placement of calcium hydroxide dressing by two methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005. 99:511-516.

Ten Cate AR. **Oral Histology: development, structure and function**. 5. ed. St. Louis: Mosby; 2001.

Tonamaru Filho M, Leonardo MR, Silva LAB, Aníbal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different irrigating solutions. *Int Endod J*. 2002; 35:735-739.

Tronstad L, Andreassen JO, Asselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod*. 1981; 7: 17-21.

Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 97:79-84.

Vivacqua-Gomes N, Gurgel-Filho ED, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth *ex vivo*. *Int Endod J*. 2005; 38:697-704.

Waltimo TMT, Haapasalo M, Zehnder M, Meyer J. Clinical aspects related to endodontic yeast infections. *Endod Topics*. 2004; 9:66-78.

Walton RE, Torabinejad M. Principles and practice of Endodontics. 2ed, Saunders: Pennsylvania. 1989. 588p.

Winkelhoff AJ, Winkel EG. Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontol 2000*, 2005; 39:40-52.

Xia T, Baumgartner C. Occurrence of *Actinomyces* in infections of endodontic origin. *J Endod*. 2003; 29(9):549-552.



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



UNICAMP / FOP
BIBLIOTECA

CERTIFICADO-2ª VIA

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Avaliação in vitro da ação antimicrobiana de diferentes medicações intracanal", protocolo nº **074/2006**, dos pesquisadores **BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES, FRANCISCO MONTAGNER e VANESSA BELLOCCHIO BERBER**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 05/07/2006.

Piracicaba, 07 de março de 2007

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "Antimicrobial action of different intracanal medicaments", register number **074/2006**, of **BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES, FRANCISCO MONTAGNER and VANESSA BELLOCCHIO BERBER**, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 05/07/2006.

Piracicaba, SP, Brazil, March 07 2007

Cynthia Pereira Machado Tabchoury
 Profa. Cintia Pereira Machado Tabchoury

Secretária
 CER/FOP/UNICAMP

Jacks Jorge Júnior
 Prof. Jacks Jorge Júnior

Coordenador
 CER/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.