



DECLARAÇÃO

Declaro que a aluna ESTELA CRISTINA BIAZOTTO DA SILVA, R.A. 083479, esteve sob minha orientação no ano 2011 para a realização de um trabalho de iniciação científica intitulado "ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EDTA E ÁCIDO CÍTRICO CONTRA PATÓGENOS ENDODONTICOS". Este trabalho foi desenvolvido dentro do Programa de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC-CNPq e teve parecer favorável na apresentação do relatório parcial (projeto em andamento). Assim, neste momento, concordo com o texto apresentado pela aluna junto à Comissão de Graduação da FOP-UNICAMP, como requisito para seu Trabalho de Conclusão de Curso (TCC).

Piracicaba, 23 de setembro de 2011.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Brenda Paula F. de A. Gomes".

Profa^a Dr^a Brenda Paula F. de A. Gomes - orientadora
Área de Endodontia
F.O.P. – UNICAMP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MONOGRAFIA DE FINAL DE CURSO

Aluno(a): Estela Cristina Biazotto da Silva

Orientador(a): Profa^a Dr^a Brenda Paula F. de A. Gomes

Ano de Conclusão de Curso: 2011

Estela Cristina Biazotto da Silva

**“ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EDTA E ÁCIDO CÍTRICO
CONTRA PATÓGENOS ENDODÔNTICOS”**

**Monografia apresentada ao
Curso de Odontologia da
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba – UNICAMP, para
obtenção do Diploma de
Cirurgião – Dentista.**

Orientador(a): Profa^a Dr^a Brenda Paula F. de A. Gomes

Piracicaba

2011

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Si38a Silva, Estela Cristina Biazotto da, 1989-
Atividade antimicrobiana do EDTA e ácido cítrico
contra patógenos endodônticos / Estela Cristina
Biazotto da Silva. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida
Gomes.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo
de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Dedicatória

Com muito amor e, sem dúvida alguma, dedico este trabalho aos meus heróis e, também pais, **Paulo César e Irma**. Através de vocês, encontrei força e coragem para a conclusão de todo o meu curso de Odontologia e pela realização deste trabalho.

Dedico, também, à minha amada avó **Victalina**, que me enche de saudades e que sempre acreditou em mim.

Agradecimentos

Aos meus pais, **Paulo Cesar e Irma**, que me apoiaram em todas as etapas da minha vida. Amo muito vocês!

À minha irmã, **Ana Paula**, pela amizade e companheirismo. Te amo!

Aos meus avós, **Jayr, Jandira, Honório e Victalina**, por suas orações e credibilidade nas minhas decisões. Vocês são o início de tudo. Amo vocês!

À minha orientadora, **Profa^a Dr^a Brenda Paula F. de A. Gomes**, pelo carinho, pela confiança e oportunidade de realizar um grande trabalho, com o qual aprendi muito. Muito obrigada pela confiança. Serei eternamente grata!

À **Geovania de Caldas Almeida**, que iniciou a pesquisa comigo, pela paciência, disponibilidade, dedicação e por seus ensinamentos, nos quais se baseou a minha pesquisa. Meus sinceros agradecimentos!

À pós-graduanda **Letícia Maria Menezes Nóbrega**, que me acompanhou durante a pesquisa, por sua competência, dedicação e por todas às vezes em que me ajudou. Muito obrigada por tudo!

Às meninas da minha república, **Aline, Larissa, Mayra e Natália**, que nos momentos difíceis me acolheram e ficaram ao meu lado. Sentirei saudades de tudo que passamos e desejo que tenham muito sucesso nessa longa etapa. Adoro vocês!

A toda **Turma 52**, que dividiu comigo, durante quatro anos, momentos inexplicáveis que ficarão na memória.

Ao pessoal do Laboratório de Endodontia da FOP-UNICAMP: **Ana Godoy, Ana Carolina Mascarenhas, Ariane Cássia Marinho, Daniel Rodrigo Herrera Morante, Emmanuel João Nogueira Leal da Silva, Ezilmara Leonor Rolim de Sousa, Fernanda Graziela Corrêa Signoretti, Geovania Caldas Almeida, Giselle Priscilla Cruz Abi Rached, Letícia Maria Nóbrega, Marcos Sergio Endo, Thaís Mageste Duque, Thiago Lima, Tiago Pereira da Rosa**, por terem me acolhido por todos esse anos. Aprendi muito com vocês

Ao **CNPq/PIBIC**, pelo apoio financeiro durante toda pesquisa.

RESUMO

Durante o tratamento endodôntico são utilizadas substâncias químicas auxiliares associadas à instrumentação das paredes dos canais. Tanto o EDTA como o ácido cítrico podem ser empregados na remoção da smear layer criada pela instrumentação. Entretanto, apesar de sua ação química ser bastante conhecida, poucos trabalhos na literatura avaliaram a atividade antimicrobiana destas substâncias. O objetivo deste trabalho foi avaliar in vitro a atividade antimicrobiana do EDTA 17% e do ácido cítrico a 1%, 10%, 30% e 50% contra determinados patógenos endodônticos: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Gemella morbillorum*. A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método clássico de difusão radial em ágar e posterior leitura dos halos de inibição de crescimento microbiano. Analisando os resultados obtidos, verificou-se que o EDTA 17% e o ácido cítrico 50% foram as substâncias químicas que obtiveram uma maior média dos halos de inibição do crescimento microbiano contra *Candida albicans*, *Porphyromonas gingivalis* selvagem, *Gemella morbillorum* (EDTA) e *Porphyromonas gingivalis* ATCC, *Fusobacterium nucleatum* ATCC, *Fusobacterium nucleatum* selvagem (ácido cítrico 50%). Concluiu-se que o EDTA 17% e o ácido cítrico 50% possuem ação antibacteriana satisfatória contra patógenos endodônticos.

Palavras-chave: EDTA 17%, irrigantes endodônticos, ácido cítrico, patógenos endodônticos

ABSTRACT

Auxiliary chemical substances associated with the instrumentation of the canal walls are used during the endodontic treatment. Both EDTA and citric acid can be used in the removal of the smear layer created by the instrumentation. However, despite their well known chemical action, few studies have evaluated the antimicrobial activity of these substances. The aim of this study was to assess the in vitro antimicrobial activity of 17% EDTA and 1%, 10%, 30% and 50% citric acid against some endodontic pathogens such as: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* and *Gemella morbillorum*. Antimicrobial activity was carried out by the classical method of radial diffusion in agar and subsequent reading of the inhibition zones of the microbial growth. Analyzing the results, it was found that 17% EDTA and 50% citric acid were the substances that had a higher average of the microbial growth inhibition, especially against *Candida albicans*, wild *Porphyromonas gingivalis*, *Gemella morbillorum* (EDTA), and against *Porphyromonas gingivalis* ATCC *Fusobacterium nucleatum* ATCC and wild *Fusobacterium nucleatum* (50% citric acid). It was concluded that 17% EDTA and 50% citric acid have satisfactory antibacterial action against endodontic pathogens.

Key-words: 17% EDTA, endodontic irrigating, citric acid, endodontic pathogens.

Sumário

| | | |
|----|---|-----------|
| 1. | Introdução | 1 |
| 2. | Revisão de Literatura | 4 |
| | 2.1 Infecções endodônticas e o preparo químico-mecânico | 4 |
| | 2.2 Remoção da smear layer | 6 |
| | 2.3 EDTA | 7 |
| | 2.4 Ácido cítrico | 8 |
| 3. | Proposição | 9 |
| 4. | Materiais e Métodos | 10 |
| | 4.1 Microrganismos testados | 10 |
| | 4.2 Substâncias testadas | 10 |
| | 4.3 Método para testar a atividade antimicrobiana - método de difusão em ágar | 11 |
| | 4.4 Colocação dos tubos de inox sobre a superfície do ágar ... | 13 |
| | 4.5 Incubação | 13 |
| | 4.6 Leitura dos halos de inibição | 13 |
| | 4.7 Análise estatística | 14 |
| 5. | Resultados | 15 |
| 6. | Conclusão | 24 |
| 7. | Referências | 25 |

1. INTRODUÇÃO

Em relação ao sucesso do tratamento endodôntico já é bem sedimentada na literatura a afirmação feita por Byström & Sundqvist (1981) de que este visa eliminar as bactérias e prevenir a re-infecção do sistema de canais radiculares. Entre as principais bactérias causadoras da doença endodôntica encontra-se os anaeróbios estritos, tais como bactérias do gênero *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Prevotella* e *Porphyromonas*, os anaeróbios facultativos do gênero *Streptococcus* e espécies associadas, como *Enterococcus*. Ainda assim, pode haver a presença de bactérias que não são membros da microbiota oral, como bactérias do gênero *Staphylococcus* e até a presença de fungos, que é o caso de *Candida* (Lopes & Siqueira, 2010).

Além da desinfecção, o sucesso do tratamento endodôntico está diretamente ligado ao correto preparo do canal radicular (Souza *et al.*, 2005), que representa uma das fases mais importantes da terapêutica endodôntica (Mccomb & Smith, 1976).

O preparo químico-mecânico tem por objetivo a modelagem e a limpeza do sistema de canais radiculares. A modelagem é obtida exclusivamente pelo desgaste de suas paredes dentinárias mediante a ação mecânica de instrumentos endodônticos. A limpeza consegue-se pela somatória de diferentes eventos: ação mecânica dos instrumentos endodônticos junto às paredes internas do canal radicular; ação das substâncias químicas auxiliares sobre os componentes (tecidos orgânicos, inorgânicos e microrganismos) presentes no interior dos sistemas de canais radiculares, e pela irrigação-aspiração que, à expensa da energia cinética do jato, da turbulência criada e do refluxo da corrente líquida (solução irrigadora), arrasta para fora do canal radicular os resíduos oriundos destes eventos (Lopes & Siqueira, 2010).

Tanto as substâncias químicas auxiliares quanto os agentes irrigantes desempenham papéis fundamentais na terapêutica endodôntica, sendo estes utilizados de forma e em momentos distintos.

As substâncias químicas auxiliares (SQA) desempenham ações químicas, físicas e biológicas concomitantemente com a ação mecânica dos instrumentos endodônticos. Podem ser empregadas na forma líquida, gel ou creme.

Já os irrigantes apresentam-se apenas na forma de soluções, uma vez que a irrigação é representada por uma corrente líquida no interior da cavidade pulpar (Lopes & Siqueira, 2010), com o objetivo de manter em suspensão os remanescentes necróticos, restos pulpares e debris de dentina, facilitando sua remoção por meio de aspiração.

Tanto as substâncias químicas auxiliares como os agentes irrigantes são utilizados para agir não somente nas paredes dentinárias, mas, sim, em todo o sistema de canais radiculares, em regiões onde os instrumentos endodônticos não têm acesso, promovendo assim a lubrificação, desinfecção, limpeza e remoção de debris e restos pulpares ou necróticos.

O hipoclorito de sódio pode ser considerado como uma das soluções mais utilizadas no preparo químico-mecânico dos canais radiculares (Clarkson & Moulet, 1998). Isto pode ser justificado por apresentar-se como uma solução bastante eficiente, devido as suas propriedades como solvente de tecido orgânico, desodorizante e bactericida (Grossman & Maiman, 1941; Shih *et al.*, 1970; Baumgartner & Cuenin, 1992). Sua ação antimicrobiana (Gomes *et al.*, 2001; Ferraz *et al.*, 2001; 2007; Vianna *et al.*, 2004; Berber *et al.*, 2006; Sena *et al.*, 2006; Vianna & Gomes, 2009) e dissolução tecidual (Beltz *et al.*, 2003; Naenni *et al.*, 2004) têm sido demonstradas em vários estudos.

A clorexidina vem sendo utilizada desde 1957, apresentando biocompatibilidade tecidual em concentrações clínicas que variam de 0,2% a 2% (Hampson & Atkinson, 1964; Foulkes, 1973; Santos *et al.*, 2000; Kalil *et al.*, 2000). Diversos autores comprovaram a excelente capacidade antimicrobiana desta substância, o que motiva o seu uso rotineiro (Delany *et al.*, 1982; Cervone *et al.*, 1990; Heling *et al.*, 1992; Jeansone & White, 1994; Siqueira Jr. & Uzeda, 1997; Kuruvilla & Kamath, 1998; Ferraz *et al.*, 2001; 2007; Gomes *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2004; Vianna & Gomes, 2009). Além disso, a clorexidina é dotada de uma propriedade significativa no tratamento de canais radiculares: a substantividade (Rola & Melsen, 1975; Denton, 1991; White *et*

al., 1997; Leonardo *et al.*, 1999; Basrani *et al.*, 2002; Rosenthal *et al.*, 2004; Kademi *et al.*, 2006; Mohamedi *et al.*, 2008).

O EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético) é 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).

O ácido cítrico é um ácido orgânico (ácido 2-hidroxi propano tricarbóxico), sólido e cristalino, quando à temperatura ambiente, muito solúvel na água (133 g/100ml de água em temperatura ambiente), que atua sobre os tecidos desmineralizados do dente, promovendo a sua desmineralização, podendo ser empregado na remoção de *smear layer*, após o preparo químico-mecânico do canal radicular.

Quanto à concentração do ácido cítrico a ser usada em Endodontia, não há consenso entre os autores, os quais indicam concentração entre 1% (Brancini *et al.* 1983), 6% (Shorelin *et al.*, 1982; Smith & Wayman, 1986), 10% (Scelza *et al.*, 1986; Garberoglio & Becce, 1994); 25% e 50% (Loel, 1975; Wayman *et al.*, 1979). A eficiência da limpeza da parede do canal varia diretamente com a concentração da solução do ácido cítrico empregada (Wayman *et al.*, 1979).

A atividade antimicrobiana do ácido cítrico está relacionada com o seu baixo pH, o qual promove a desnaturação das proteínas, inclusive de enzimas, interferindo no metabolismo bacteriano (Siqueira, 1997).

Esse estudo tem como objetivo testar a atividade antimicrobiana do ácido cítrico e EDTA 17% contra os microrganismos frequentemente envolvidos na infecção endodôntica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFECÇÕES ENDODONTICAS E O PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO

A infecção endodôntica é causada por microorganismos que são capazes de invadir o tecido pulpar ou quando estes conseguem sobreviver no canal radicular após o tratamento endodôntico (Dahlen, 2009). A anatomia complexa dos canais radiculares, a capacidade de difusão dos microorganismos por todo sistema de canais e a relativa resistência aos antimicrobianos utilizados durante a terapia endodôntica dificultam a completa eliminação de microorganismos (Nair, Henry, Cano, Vera, 2005; Nerwich, Figdor, Messer, 1993; Soares, Pires, 2006). Para isso, a limpeza e desinfecção desses canais é um dos principais objetivos desse tratamento.

O preparo químico-mecânico tem por objetivo a modelagem e a limpeza do sistema de canais radiculares. A modelagem é obtida exclusivamente pelo desgaste de suas paredes dentinárias mediante a ação mecânica de instrumentos endodônticos. A limpeza consegue-se pela somatória de diferentes eventos: ação mecânica dos instrumentos endodônticos junto às paredes internas do canal radicular; ação das substâncias químicas auxiliares sobre os componentes (tecidos orgânicos, inorgânicos e microorganismos) presentes no interior dos sistemas de canais radiculares, NaOCl (remoção da parte orgânica) alternado com um agente quelante, o EDTA ou ácido cítrico (remoção da porção inorgânica), e pela irrigação-aspiração que à expensa da energia cinética do jato, da turbulência criada e do refluxo da corrente líquida (solução irrigadora), arrasta para fora do canal radicular os resíduos oriundos destes eventos (Lopes & Siqueira, 2010), conhecidos como *smear layer*.

Vários ácidos orgânicos, instrumentos ultrassônicos e lasers estão sendo usados a fim de remover a *smear layer* da superfície dos canais instrumentados (Torabinejad & Khademi, 2003), livrando esses canais de possíveis re-infecções, devido à grande microbiota ali presente. De acordo com Davis *et al.* (1972), a morfologia dos canais radiculares é muito complexa,

apresentando áreas de difícil acesso mecânico, o que leva à permanência das bactérias nos túbulos dentinários.

A contaminação da polpa não ocorre, necessariamente, por sua exposição direta, como em casos de cárie ou trauma. Hoshino *et al.* (1992) examinaram a microbiota anaeróbica da polpa de 19 dentes recém-extraídos com lesões de cárie profunda. Foram feitos exames clínicos que indicaram que em 9 dentes, a polpa não estava exposta. Em 6 destes dentes foram encontrados microrganismos similares aos da microbiota da cárie dentária, destacando as bactérias anaeróbias do gênero *Eubacterium*, *Propionibacterium* e *Actinomyces*, concluindo-se, então, que as mesmas penetraram pelos túbulos dentinários.

A disponibilidade de nutrientes, baixa oxigenação em canais radiculares com polpas necróticas e interações bacterianas facilitam a contaminação da polpa dentária por microrganismos do trato gastrointestinal, cavidade oral ou nasofaringe (Sundqvist; 1992).

A microbiota de uma polpa contaminada é rica em bactérias gram-negativas, gram-positivas facultativas e anaeróbias estritas (Munson *et al*, 2002; Gomes *et al*, 2004; Tomazinho; Avila-Campos, 2007; Sassone *et al*, 2008).

Dentre as principais causadoras da doença endodôntica, encontram-se as anaeróbias estritas, tais como bactérias do gênero *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Prevotella* e *Porphyromonas*, anaeróbios facultativos do gênero *Streptococcus* e espécies associadas, como *Enterococcus*. Ainda assim, pode haver a presença de bactérias que não são membros da microbiota oral, como bactérias do gênero *Staphylococcus* e até a presença de fungos, como é o caso de *Candida* (Lopes & Siqueira, 2010).

2.2 REMOÇÃO DE SMEAR LAYER

A *smear layer* é composta por uma porção orgânica e outra inorgânica e possui aproximadamente 1 a 2 μm de espessura (Torabinejad & Khademi, 2003). Apesar da polêmica sobre a manutenção ou retirada da *smear layer*, a lama dentinária pode estar infectada, protegendo as bactérias dentro dos túbulos dentinários (Torabinejad; Handysides; Khademi; Bakland, 2002), além de interferir na adaptação de cimentos endodônticos às paredes dentinárias (Kokkas, Boutsoukis, Vassiliadis, Stavrianos, 2004; Örstavik, Haapasalo, 1990). As vantagens de se remover a camada de *smear layer* após a instrumentação endodôntica são:

a) Facilitar a ação da medicação intracanal (melhorando a desinfecção) e possibilitar um selamento hermético do sistema de canais radiculares após a obturação (Yoshida *et al*, 1995; Yamashita, 2000; Barroso; Habitante; Silva, 2002; Vasconcelos *et al*, 2007).

b) Facilitar a penetração dos cimentos obturadores nos túbulos dentinários e melhorar a adaptação do cone de guta-percha às paredes do canal, aumentando a eficiência seladora da obturação (Lopes & Siqueira, 2010)

c) Quando a *smear layer* não é removida, ela pode ser degradada por enzimas proteolíticas produzidas por certas espécies bacterianas, criando falhas entre o material obturador e a parede do canal radicular, permitindo assim a infiltração de outros microrganismos, e seus subprodutos, pelo canal radicular até os túbulos dentinários e região periapical. A degradação da *smear layer* pode estar relacionada, também, com falhas em obturações retrógradas (Pitt Ford & Roberts, 1990).

Portanto é necessário o uso de meios físicos, mecânicos e químicos que possam agir sobre a *smear layer*, neutralizando e dissolvendo os produtos tóxicos, bem como os microrganismos e seus subprodutos (Pierro; Scelza; Pereira, 2004).

Tanto as substâncias químicas auxiliares quanto os agentes irrigantes desempenham papéis fundamentais na terapêutica endodôntica, sendo estes utilizados de forma e em momentos distintos.

As substâncias químicas auxiliares (SQA) desempenham ações químicas, físicas e biológicas concomitantemente com a ação mecânica dos instrumentos endodônticos. Podem ser empregadas na forma líquida, gel ou creme.

Já os irrigantes apresentam-se apenas na forma de soluções, uma vez que a irrigação é representada por uma corrente líquida no interior da cavidade pulpar, com o objetivo de manter em suspensão os remanescentes necróticos, restos pulpares e debris de dentina, facilitando sua remoção por meio de aspiração.

Tanto as substâncias químicas auxiliares como os agentes irrigantes são utilizados para agir não somente nas paredes dentinárias, mas, sim, em todo o sistema de canais radiculares, em regiões onde os instrumentos endodônticos não têm acesso, promovendo assim a lubrificação, desinfecção, limpeza e remoção de debris e restos pulpares ou necróticos.

2.3 EDTA

OSTBY, em 1957, foi quem introduziu o uso do EDTA em Endodontia verificando sua eficiência desmineralizante fugaz sobre as paredes dos canais radiculares, o que vinha a facilitar as manobras da instrumentação. A ação desmineralizante do sal dissódico do EDTA foi posteriormente comprovada por diversos autores. Sua inocuidade aos tecidos vivos também foi investigada (Patterson, 1963).

É aconselhável empregar o EDTA trissódico que possui um maior poder descalcificante e um pH em torno de 7,2 o que lhe garante uma maior compatibilidade tecidual. Alguns autores aconselham a sua preparação pelo próprio profissional segundo a fórmula proposta por Sand (1961), tendo-se, ao final, uma solução de EDTA a 20%, com pH 7,2. Goldman *et al.* (1982) e Yamada *et al.* (1983) recomendam irrigação final com 10 ml de EDTA 17% seguido de 10 ml de NaOCl 5,25%, a fim de remover não somente a parte inorgânica, como também a parte orgânica da *smear layer*.

A atividade antimicrobiana do EDTA resulta de sua ação quelante sobre íons cálcio e magnésio, importantes na estabilização das membranas bacterianas. A remoção desses íons rompe a integridade da membrana. Em 2004, Scelza *et al.* avaliaram a remoção de *smear layer* variando o tempo de permanência do agente quelante no interior do canal, através da MEV. Concluíram que 3 minutos é o tempo de ação ideal da substância no interior do canal, não havendo maior limpeza com o aumento do tempo.

2.4 ÁCIDO CÍTRICO

O ácido cítrico foi sugerido pela primeira vez como um irrigante por Wayman *et al.*(1997) sendo um ácido orgânico (ácido 2-hidroxi propano tricarbóxico), sólido e cristalino, quando à temperatura ambiente, muito solúvel na água (133 g/100ml de água em temperatura ambiente). Esta substância é geralmente recomendada como irrigante final pela sua capacidade em remover *smear layer* (Baumgartner *et al.*, 1984; Torabinejad *et al.*, 2002). Sua atividade antimicrobiana está relacionada com o seu baixo pH, o qual promove a desnaturação das proteínas, inclusive de enzimas, interferindo no metabolismo bacteriano (Siqueira & Uzeda, 1997).

3. PROPOSIÇÃO

Testar, in vitro, a atividade antimicrobiana do EDTA 17% e do ácido cítrico, em diferentes concentrações, contra patógenos endodônticos anaeróbicos estritos e facultativos (cepas ATCC e clínicas) através do método de difusão em Agar.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS TESTADOS

Os microrganismos ATCC utilizados estão listados abaixo. Foram também testadas as mesmas espécies, porém clinicamente isoladas de canais radiculares infectados (cepas selvagens).

BACTERIAS ANAERÓBICAS ESTRITAS:

Porphyromonas gingivalis (ATCC 49417)

Prevotella intermedia (ATCC 25611)

Fusobacterium nucleatum (ATCC 25586)

Gemella morbillorum (ATCC 27824)

MICRORGANISMOS FACULTATIVOS (ATCC)

Candida albicans (ATCC 62342)

Enterococcus faecalis (ATCC 29212)

Staphylococcus aureus (ATCC 25923)

4.2 SUBSTÂNCIAS TESTADAS:

Substâncias ativas:

EDTA 17%

Ácido cítrico 1, 10, 30 e 50%

Controle

Solução salina estéril a 0,85%

Clorexidina gel e líquida 2%

Os gluconatos de clorexidina, EDTA 17% e as diferentes concentrações do ácido cítrico foram preparados na mesma farmácia de manipulação (Drogal Ltda. - Piracicaba, SP).

4.3 MÉTODOS PARA TESTAR A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA - MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

PREPARAÇÃO DO INÓCULO

A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método clássico de difusão radial em ágar com algumas modificações (método da camada dupla para os microrganismos facultativos e aeróbio e plaqueamento direto dos microrganismos anaeróbios estritos) e posterior leitura dos halos de inibição de crescimento microbiano.

Os organismos facultativos foram subcultivados em placas de BHI Ágar sangue e incubados por 18-24 h a 37°C em condições atmosféricas (aeróbios) ou em 10% CO₂ (estufa de CO₂ - Jouan, Saint-Herblain, Cédex-França). Os organismos anaeróbios estritos foram cultivados em placas de FAA + 5% sangue de carneiro desfibrinado, de acordo com a Figura 1, (Ebefarma, Araras, SP) e incubados em câmara de anaerobiose (Son Whitley Scientific, Bradford, UK) em atmosfera anaeróbia de 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂ por 48h.

Após crescimento em meio sólido, colônias isoladas de facultativos foram suspensas em tubos contendo 5 mL de BHI, de acordo com a Figura 2. Após agitação mecânica, a suspensão era ajustada em espectrofotômetro com transmitância de 800 nm, até atingir a concentração equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland (1.5×10^8 bactéria/mL). Tal concentração de inóculos foi utilizada por promover crescimento semi-confluyente de todos os microrganismos testados (KOO et al. 2000).

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

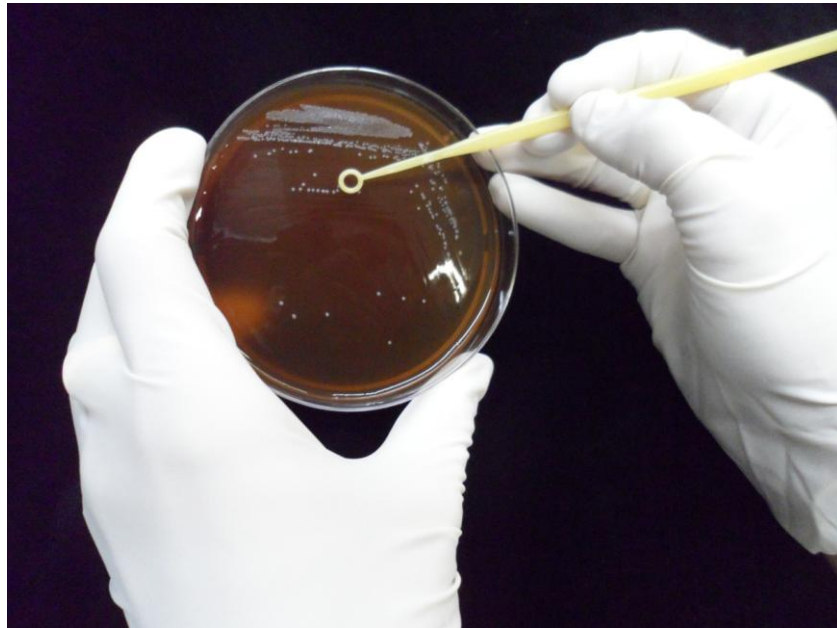


Figura 1. Anaeróbios estritos cultivados em placas de FAA.



Figura 2. Colônias isoladas suspensas em tubos contendo 5 mL de BHI.

PREPARO DAS CAMADAS DE ÁGAR

Para avaliar a atividade antimicrobiana das substâncias testadas frente aos microrganismos foram utilizadas placas de 140 mm de diâmetro. Os testes foram realizados em triplicata em tempos diferentes.

Para o teste com bactérias anaeróbias estritas foram utilizadas placas de 80 mm de diâmetro. Os testes foram realizados em triplicata e em tempos diferentes.

Microrganismos facultativos: Método da camada dupla

Inicialmente, foram preparadas as placas contendo 40 mL de MHA que serviram de base para a camada de inóculo (seed).

Quarenta mL de BHIA foram preparados e autoclavados em frascos de vidro com tampas rosqueáveis. Durante o processo de resfriamento, quando o BHIA atingiu 45°C, ainda em estado líquido, adicionou-se 400µL do inóculo microbiano e promoveu-se agitação uniforme do conjunto, vide Figura 3. O BHIA passou a ter, portanto, 1% de inóculo microbiano, sendo, então, distribuído sobre a camada sólida de MHA, de acordo com a Figura 4. Foi aguardado a solidificação do meio de cultura.

Microrganismos anaeróbios estritos: Plaqueamento direto

Para as bactérias anaeróbias estritas foi utilizada somente uma camada de meio de cultura, no qual o inóculo bacteriano foi plaqueado diretamente (camada *seed*). Estudos pilotos foram feitos para determinar qual a melhor concentração da suspensão bacteriana e a técnica de inoculação que permitisse crescimento semi-confluyente dos organismos a serem testados. Nestes estudos foi observado que, o método da camada dupla associada com 1% do inóculo nas concentrações de 0,5 e 1 na escala McFarland, não produziu crescimento das bactérias anaeróbias estritas. Isto ocorreu devido à sensibilidade térmica de tais bactérias e à necessidade de ter uma concentração mais elevada de células bacterianas para haver crescimento.

Placas de 80 mm foram preparadas com 50 mL de FAA + 5% sangue de carneiro desfibrinado. Após a solidificação do Agar, as placas foram colocadas em atmosfera de anaerobiose por 24 horas para serem pré-reduzidas. Em seguida, foram plaqueados 150 uL do inoculo bacteriano, de forma uniforme, diretamente sobre o meio de cultura com o uso de um swab de madeira estéril, de acordo com a Figura 5.



Figura 3. 400 μ L do inóculo microbiano acrescentado ao BHIA.



Figura 4. BHIA sendo distribuído sobre a camada sólida de MHA.

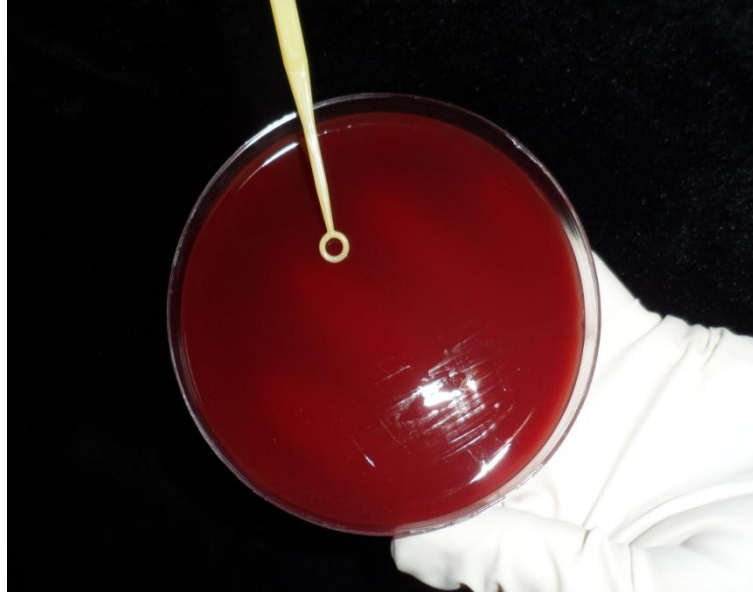


Figura 5. 150 uL do inóculo bacteriano plaqueado diretamente sobre o meio de cultura.

4.4 COLOCAÇÃO DOS TUBOS DE INOX SOBRE A SUPERFÍCIE DO ÁGAR

Após a solidificação dos meios de cultura, cilindros de inox estéreis foram preenchidos com as substâncias a serem testadas e dispostos sobre a superfície do Agar. Foram colocados 6 cilindros (3 para cada tempo após a espatulação), em cada placa com o meio de cultura. As placas foram mantidas por 2 horas à temperatura ambiente para permitir a difusão das substâncias na superfície do Agar. As placas contendo os inóculos de anaeróbios estritos foram conservadas em jarros anaeróbios à temperatura ambiente. A manipulação das placas contendo culturas anaeróbias estritas foi feita sob o fluxo contínuo de nitrogênio para reduzir o tempo de exposição de tais bactérias à atmosfera ambiente.

4.5 INCUBAÇÃO

As placas foram mantidas a 37°C em condições gasosas apropriadas: levedura (*Candida albicans*) e *Staphylococcus aureus* em estufa de O₂ a 37°C por 24 horas. Placas semeadas com *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* foram colocadas em estufa a 37°C sob fluxo contínuo de 10% de CO₂,

por 48 horas. Placas com microrganismos anaeróbios estritos foram incubadas em câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, UK) em atmosfera anaeróbia de 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂ por 48 h.

4.6 LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO

A leitura para organismos, tais como *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, foi feita após 24 horas de incubação em estufa de O₂. Enquanto que a leitura para o anaeróbio facultativo *Enterococcus faecalis* foi feita após 48 horas de incubação a 10% de CO₂.

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

4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

De maneira a se obter uma visão geral da atividade antimicrobiana das soluções testadas, foram calculadas as médias da susceptibilidade às substâncias testadas e da atividade antimicrobiana para os microrganismos.

5. RESULTADOS

De acordo com o emprego das substâncias químicas, verificou-se na Tabela 1 que o EDTA 17% foi a substância química que produziu um maior halo de inibição contra os microrganismos testados. *Porphyromonas gingivalis selvagem* foi o microrganismo mais sensível ao EDTA com halo de inibição de 25,81 mm e menor halo de inibição (4,81 mm) quando submetido ao ácido cítrico 1%. Para *Enterococcus faecalis*, o EDTA 17% inibiu o maior número de células bacterianas, com halo de inibição máximo de 9,27 mm, enquanto que o ácido cítrico 1% apresentou a menor capacidade inibitória, com ausência de halo de inibição. Em relação ao *Staphylococcus aureus* o EDTA 17% apresentou maior halo de inibição (9,26 mm), de acordo com a Figura 6, enquanto que o menor halo foi para o ácido cítrico 50% (0,54mm). *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 49417) apresentou maior halo quando submetido ao ácido cítrico 50% (23,95 mm), enquanto que o ácido cítrico 1% não apresentou capacidade inibitória. Para *Candida albicans*, o EDTA 17% apresentou maior halo de inibição (17,97 mm). Por outro lado não teve seu crescimento inibido frente às concentrações de 30% e 50% do ácido cítrico. No teste para *Gemella morbillorum* (ATCC 27824), provou-se que o maior halo de inibição deu-se pela ação do ácido cítrico 50% (10,60), vide Figura 7, enquanto que teve seu crescimento inibido frente à concentração de 1%. Para *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), o ácido cítrico 50% apresentou maior halo de inibição (17,75 mm), entretanto, não apresentou nenhum halo sob a ação do ácido cítrico 1%. No caso do *Fusobacterium nucleatum SELVAGEM*, o ácido cítrico 1% não apresentou nenhum halo de inibição, ao passo que, o maior halo foi obtido quando submetido ao EDTA 17%.

As leituras dos halos foram feitas com paquímetro digital (Figura 8 e 9). Nota-se que o controle positivo apresentou halo frente à bactéria *Enterococcus faecalis* (Figura 10).

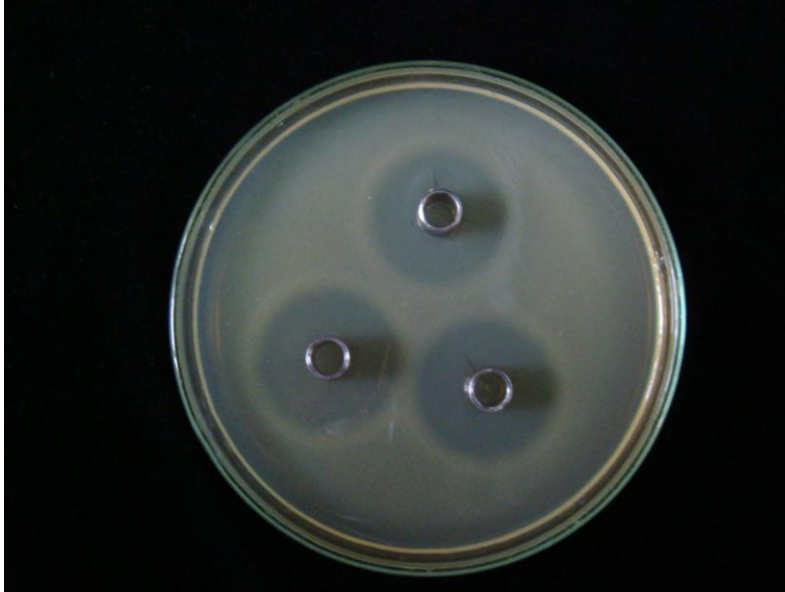


Figura 6: Halos de inibição do EDTA 17% frente ao *Staphylococcus aureus*.

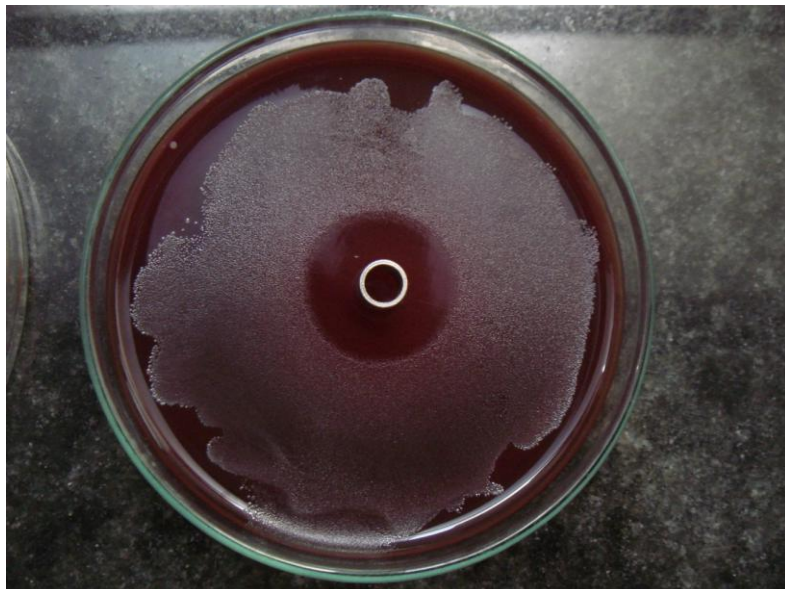


Figura 7: Halo de inibição formado pelo ácido cítrico 50% frente à *Gemella morbillorum* ATCC.



Figura 8: Leitura do halo de inibição com paquímetro digital.



Figura 9: Leitura do halo de inibição formado pelo ácido cítrico frente à *Gemella morbillorum* ATCC, utilizando paquímetro digital.

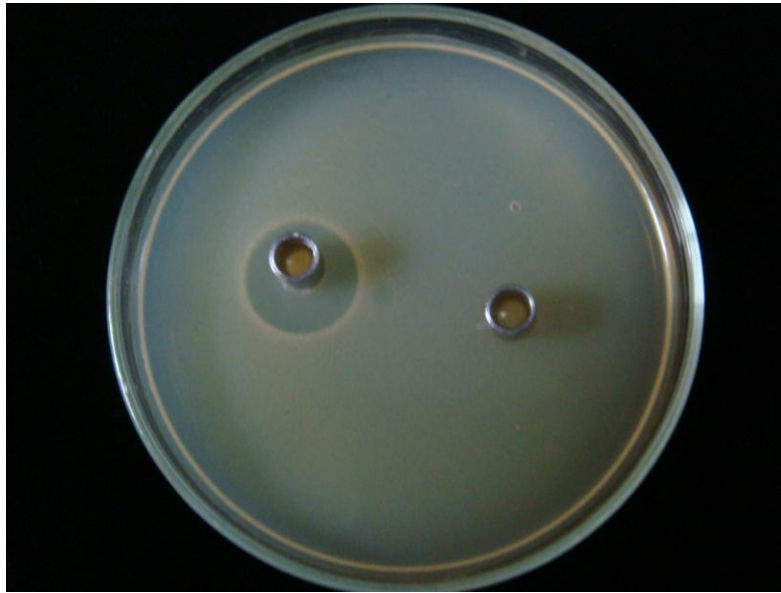


Figura 10: Substância controle (clorexidina líquida 2%) apresentando halo por inibição bacteriana frente ao microrganismo *Enterococcus faecalis*. Ausência do halo de inibição do controle negativo (solução salina).

TABELA 1. Média dos halos de inibição dos microrganismos testados frente a diferentes agentes químicos.

| Substâncias testadas | <i>C. a.</i> | <i>E. f.</i> | <i>S. a.</i> | <i>P. g.</i> ATCC | <i>P. g.</i> SELV | <i>F. n.</i> ATCC | <i>F. n.</i> SELV | <i>G. m.</i> | Média da atividade antimicrobiana de cada irrigante |
|--|--------------|--------------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------|---|
| EDTA 17% | 16.84 | 9.25 | 8.79 | 16.37 | 21.79 | 10.96 | 12.13 | 9 | 13.14 |
| Ác. Cítrico 1% | 1.82 | (SHI) | 1.73 | (SHI) | 4.86 | 1.68 | 1.17 | (SHI) | 1.4 |
| Ác. Cítrico 10% | 0.81 | 1.87 | (SHI) | 12.12 | 13.5 | 8.89 | 5.34 | 3.57 | 5.76 |
| Ác. Cítrico 30% | (SHI) | 4.05 | (SHI) | 21.12 | 15.35 | 12.99 | 9.8 | 5.9 | 8.65 |
| Ác. Cítrico 50% | (SHI) | 5.43 | (SHI) | 20.52 | 16.38 | 13.66 | 13.16 | 8.26 | 9.67 |
| Média da susceptibilidade antimicrobiana de cada microrganismo às substâncias testadas | 3.89 | 4.12 | 2.1 | 14.02 | 14.37 | 9.63 | 8.32 | 5.34 | |

C.a.: *Candida albicans*; *E.f.*: *Enterococcus faecalis*; *S.a.*: *Staphylococcus aureus*; *P.g.*: *Porphyromonas gingivalis*; *F.n.*: *Fusobacterium nucleatum*; *G.m.*: *Gemella morbillorum*; *SELV*: selvagem (cepa clínica); *SHI*: Sem halo de inibição

6. DISCUSSÃO

O EDTA e soluções de ácido cítrico podem ser empregados na remoção da *smear layer*, melhorando a limpeza e desinfecção dos canais radiculares. (Siqueira, 1998; Soares, 2001). Çalt e Serper, em 2002, avaliaram os efeitos do EDTA 17% na remoção da *smear layer* e na estrutura da dentina, após 1 e 10 minutos de aplicação. Foram usados 6 dentes unirradulares instrumentados até a lima #60. Verificou-se que a irrigação realizada por 1 minuto é eficaz na remoção da lama dentinária, enquanto que, a aplicação por 10 minutos causou excessiva erosão peritubular e intertubular.

No presente estudo, o EDTA a 17% apresentou atividade antimicrobiana semelhante ao ácido cítrico a 50%, sendo mais eficaz que o último sobre *Enterococcus faecalis*, *Staphilococcus aureus*, *Candida albicans* e *Porphyromonas gingivalis selvagem*. Todas as espécies testadas mostraram sensíveis ao EDTA, confirmando os achados de Siqueira et al. (1997). Dentre as bactérias anaeróbias testadas, *Porphyromonas gingivalis selvagem* foi a espécie que mostrou maiores zonas de inibição (25,81mm), seguida de *Porphyromonas gingivalis ATCC* (18,01mm), *Fusobacterium nucleatum SELVAGEM* (15,56mm) e *Fusobacterium nucleatum ATCC* (11,78mm). A bactéria facultativa que apresentou menor zona de inibição ao EDTA foi *Staphylococcus aureus* (menor halo: 8,43mm). *Candida albicans* também apresentou grande zona de inibição frente ao EDTA (maior halo: 16,43 mm).

O EDTA é considerado também ativo contra as bactérias anaeróbicas, entretanto tem um efeito menor contra os microrganismos aeróbicos.

O ácido cítrico a 50% teve maior atividade antimicrobiana que a concentração 1%, tendo ação contra bactérias anaeróbias, confirmando os achados de Nikolaus et al. (1988) e de Siqueira et al. (1998) e contra *Enterococcus faecalis*, confirmando os achados de Smith & Wayman (1986). Entretanto, *Candida albicans* não foi inibida pelas concentrações de 30% e 50% e *Staphylococcus aureus* obteve somente 1 halo de inibição defronte às concentrações de 1% e 50%. Pupo et al. (1994) testando a atividade antibacteriana de soluções irrigadoras dos canais radiculares frente a

Enterococcus faecalis e à microbiota mista oriunda de canais radiculares, observaram que o ácido cítrico só foi bactericida nas concentrações de 10%, 30% e 50%. Para os demais microrganismos foi inefetivo, assim como na concentração de 1 a 10%. Nossos achados foram semelhantes aos de Pupo *et al.* (1994).

7. CONCLUSÃO

Diante da metodologia empregada nessa pesquisa e dos resultados encontrados, concluiu-se que o EDTA 17% e o ácido cítrico 50% possuem ação antibacteriana satisfatória contra patógenos endodônticos.

REFERÊNCIAS

Barroso LS, Habitante SM, Silva FSP. Estudo comparativo do aumento da permeabilidade dentinária radicular quando da utilização do hipoclorito de sódio, EDTA e ácido cítrico após o preparo químico-cirúrgico. *J Bras Endod* 2002; 3(11): 324-30.

Baumgartner JC, Brown CM, Mader CL, Peters DD, Shulman JD. A scanning electron microscopic evaluation of root canal debridement using saline, sodium hypochlorite, and citric acid. *J Endod* 1984; 10(11): 525-31.

Baumgartner JC, Falkler WA. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* 1991; 17(8):380–3.

Çalt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 2002;28:17-9.

Davis SR; Brayton S; Goldman M. The morphology of the prepared root canal: a study utilizing injectable silicone. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972;34:642-8.

Dahlen G. Culture-based analysis of endodontic infections. In: Fouad AF, ed. *Endodontic Microbiology*. 1st ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell; 2009:225–4

Ingle JI, Beveridge EE. *Endodontics*. 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1976.

Hoshino E, Ando N, Sato M, Kota K. Bacterial invasion of nonexposed dental pulp. *J Endod* 1992;25:2-5.

Leonardo MR. *Endodontia: Tratamento de canais radiculares: Princípios técnicos e biológicos*. 2 v. São Paulo: Artes Médica; 2005.

Lopes HP, Siqueira Junior JF. *Endodontia, biologia e técnica*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. 980p.

Goldman M, Goldman LB, Cavaleri R, Bogis J, Lin PS. The efficacy of several endodontic irrigating solutions: a scanning electron microscopic study: Part 2. J Endod. 1982; 8(11):487-92.

Gomes BPF A *et al.* Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol Immunol. 2004; 19(2):71-6.

Gomes BPF A, 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. 2009; 35(10):1350-3.

Hong CY *et al.* The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion, J Oral Pathol Med. 2004; 33(3):162-9.

Kokkas AB, Boutsoukis A, Vassiliadis LP, Stavrianos CK. The influence of the smear layer on dentinal tubule penetration depth by three different root canal sealers: an in vitro study. J Endod 2004; 30(2):100 –2.

Munson MA *et al.* Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. J Dent Res. 2002; 81(11):761-6.

Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005; 99(2):231–52.

Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. J Endod 1993; 19(6):302–6.

Nikolaus BE *et al.* The bactericidal effect of citric acid and sodium hypochlorite on anaerobic bacteria. J Endod 1988; 14:31-4.

Örstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. Endod Dent Traumatol. 1990; 6(4):142-9.

Patterson SS. In vivo and in vitro studies of the effect of the disodium salt of ethylenediamine tetra-acetate on human dentine and its endodontic implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1963; 16:83-103

Pitt Ford TR, Roberts GJ. Tissue response to glass ionomer retrograde root fillings. *Int Endod J.* 1990; 23(5):233-8.

Pupo J *et al.* Atividade antimicrobiana de soluções para irrigação de canais radiculares. *RGO* 1994; 42(1):17-9.

Sand Hf. The dissociation of EDTA and EDTA-sodium salts. *Acta Odontol Scand.* 1961;19:469-82.

Sassone LM *et al.* A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. *J Endod.* 2008; 34(5):541-5.

Scelza MFZ, Pierro V, Scelza P, Pereira M. Effect of three different time periods of irrigation with EDTA-T, EDTA, and citric acid on smear layer removal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2004; 98(4):499 –503.

Siqueira Junior JF, De Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod.* 1997; 23(3):167-9.

Smith JJ, Wayman BE. An evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid as a root canal irrigant. *J Endod* 1986; 12 (2) 54-8.

Soares IJ, Goldberg F. *Endodontia: Técnicas e Fundamentos.* Porto Alegre: Artmed, 2001.

Soares JA, Pires Junior DR. Influence of sodium hypochlorite-based irrigants on the susceptibility of intracanal microbiota to biomechanical preparation. *Braz Dent J.* 2006;17(4):310-6.

Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992;18:427-30.

Tomazinho LF, Avila-Campos MJ. Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella*

nigrescens in chronic endodontic infection. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007; 103(2):285-8.

Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002; 94(6):658-66.

Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J *et al.* A new solution for removal of the smear layer. J Endod 2003;29:170-5.

Vasconcelos BC. Cleaning ability of chlorhexidine gel and sodium hypochlorite associated or not with EDTA as root canal irrigants: a scanning electro microscope study. J Appl Oral Sci. 2007; 15(5):387-91.

Vianna ME, Gomes BPFA. 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.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. Oral Microbiol Immunol. 2007; 22(6):411-8.

Wayman BE, Kopp WM, Pintero GJ, Lazzari EP. Citric and lactic acids as root canal irrigants in vitro. J Endod. 1979; 5(9):258-65.

White RR, Goldman M, Lin PS. The influence of the smeared layer upon dentinal tubule penetration by endodontic filling materials. Part II. J Endod 1987; 13(8):369-74.

White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. J Endod. 1997;23(4):229-31.

Williams S, Goldman M. Penetrability of smeared layer by a strain of *Proteus vulgaris*. J Endod 1985; 11(9):135-8.

Yamada RS, Armas A, Goldman M, Lin PS. A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating

solutions: Part 3. J Endod 1983; 9(4):137-42.

Yamashita JC. Avaliação, por microscopia eletrônica de varredura, da capacidade de limpeza de algumas soluções irrigadoras empregadas em endodontia. Araraquara: UNESP, 2000. 125 f. Dissertação (Mestrado), Endodontia – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

Yesilsoy 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.

Yoshida T. Clinical evaluation on the efficacy of EDTA solution as an endodontic irrigant. J Endod. 1995; 21(12):592-3.

Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Toda T, Sagawa H. Correlation between clinical symptoms & microorganisms isolated from root canals with periapical pathosis. J Endod 1987; 13(1): 24-8.

Zavistoski J, Dzink J, Onderdonk A, Barlett JJ. Quantitative bacteriology of endodontic infections. Oral Surg 1980; 49(2):171-4.