UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

FLAVIA DE FÁTIMA ZANON OLIVEIRA

QUANTIFICAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* POR MÉTODOS DE CULTIVO APÓS O USO DE ANTIMICROBIANOS INTRACANAIS NA TERAPIA ENDODÔNTICA

VITÓRIA
2012

FLAVIA DE FÁTIMA ZANON OLIVEIRA

QUANTIFICAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* POR MÉTODOS DE CULTIVO APÓS O USO DE ANTIMICROBIANOS INTRACANAIS NA TERAPIA ENDODÔNTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Clínica Odontológica

Orientadora: Profa.Draª Rosana de Souza
Co-orientadora: Profª Drª Ana Paula Ferreira Nunes

VITÓRIA
2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências da Saúde),
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Oliveira, Flavia de Fátima Zanon
Quantificação de *Enterococcus faecalis* por métodos de cultivo após o uso de antimicrobianos intracanais na terapia endodôntica/ Flavia de Fátima Zanon Oliveira.- 2012.
102 f.: il.

Orientadora: Rosana de Souza Pereira.
Co-orientadora: Ana Paula Ferreira Nunes.

Dissertação (mestrado) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde

1. Endodontia 2. *Enterococos faecalis* 3. Antimicrobianos
I. Pereira, Rosana de Souza; II. Nunes, Ana Paula Ferreira.
III.Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde.
IV. Título.

CDU: 616.314

Dedico

A DEUS, toda honra e toda a glória!

Aos meus pais, que com força extraordinária me ensinaram a ousar e superar todos os obstáculos, em busca do conhecimento, do bem comum e da conquista da liberdade, imprescindíveis ao ser humano...

Ao meu esposo Marcelo e aos meus filhos: Maria Eduarda e Gabriel, grandes amores da minha vida!

AGRADECIMENTOS

A Deus, eterno Pai e Autor da vida, que me capacitou, e permitiu mais esta vitória.

À querida Professora Drª.Rosana de Souza Pereira pelo cuidado, orientação e apoio imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À Professora Drª. Ana Paula F. Nunes, pela co-orientação, brilhante contribuição e por disponibilizar o Laboratório de Microbiologia, Laboratório de Resistência Bacteriana (RESBAC), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) para a execução deste trabalho.

À Profª.Drª. Selva Maria Guerra, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da UFES, por sua incansável dedicação a este curso de pós-graduação.

Ao Prof.Dr.Mario Júlio Avila-Campos e sua equipe junto ao Laboratório de Anaeróbios, no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), por conceder a oportunidade de aprendizado e contribuir para o crescimento deste programa de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Marco César Guimarães, por gentilmente disponibilizar sua equipe do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, e em especial aos técnicos: Cristine Facco Saturnino e Jairo Oliveira, pela dedicação e profissionalismo, fundamentais na execução das imagens deste trabalho;

À Fundação de Âmparo e Apoio à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) - por apoiar financeiramente esta pesquisa.

Aos Professores que prontamente aceitaram a participação na banca examinadora: Dr. Aristeo Atsushi Takasaki; Dr. Alfredo Feitosa, Drª. Viviane Nakano e Dr. Francisco Carlos Ribeiro, pela nobre disponibilidade e enriquecedora contribuição neste trabalho,

Aos Professores, Dr. Ricardo Shuanck e Drª Claudia Reis por compartilharem de seus conhecimentos nos momentos de dúvidas deste trabalho.

A todos os professores do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduaçãoem Clínica Odontológica desta Universidade, pelos ensinamentos transmitidos.

Às queridas pesquisadoras, Viviane Arenas e Karla Rossoni, pela indispensável monitoria, e exemplos de amor e dedicação à Ciência,

A todos os colegas do Curso de Mestrado, Ana Paula Gomes, Bruna P. Escórcio, Bruna S. Fiorott, Cristina O. Castro, Enzo Tetzner, Katiane Oliveira, Luciana F. Marba, Priscila Borgo, Regina Furbino, Rosângela S. Gavi e Susi C. Pereira, pela amizade construída e agradável companhia.

Ao secretário Igor, pela eficiência e profissionalismo prestados a este curso de pós-graduação,

A todos os funcionários do Instituto de Odontologia da UFES (IOUFES), em especial: Srª Rose; Srª Iracy, Sr. Klebson e Sr. Cleônis, pelo zelo e serviços prestados com dedicação.

Aos meus amados pais, Neide e Claudina, pelo incentivo constante e fundamental apoio, em todas as etapas de minha vida.

Às minhas irmãs Camila e Renata, pela grande amizade e pela torcida.

A todas as pessoas, que de alguma forma, colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Mas os que esperam no Senhor renovarão as suas forças subirão com asas como águias correrão e não se cansarão, caminharão e não se fatigarão”

(Isaias 40:31)

RESUMO

Este estudo,*in vitro* , avaliou a susceptibilidade do *Enterococos faecalis (E. faecalis)* aos diferentes antimicrobianos intracanais utilizadas na terapia endodôntica. Trinta e seis molares inferiores extraídos de humanos foram autoclavados e contaminados com*E. faecalis*(ATCC29212) por 14 dias. Após o período de contaminação, os canais radiculares foram preparados com instrumentos rotatórios e divididos em dois grupos experimentais (n=26) e um grupo controle (n=8). Todos os procedimentos foram realizados na câmara de fluxo laminar. O grupo experimental foi irrigado com NaOCl 5,25% e dividido de acordo com a medicação intracanal: grupo 1 (n=13): gel de clorexidina 2% e grupo 2 (n=13): $Ca(OH)_2$. O grupo controle foi tratado com solução salina 0,85%. Quatro coletas foram processadas para cada amostra: após o período de contaminação (A); imediatamente após a instrumentação (B); após 14 dias de medicação curativa (C) e sete dias após a remoção da medicação intracanal (D). Dois espécimes foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a fim de observar a contaminação dos túbulos dentinários por este microorganismo. Observou-se significante redução de Unidades Formadoras de Colônias(UFCs) após o uso do irrigante NaOCl 5,25%, e após o uso das medicações à base de $Ca(OH)_2$ e gel de clorexidina 2%. Os melhores resultados foram obtidos com o gel de clorexidina 2%, embora não tenham sido encontradas diferenças estatísticas significantes entre estas duas substâncias. Após um período de sete dias sem a medicação intracanal, observou-se um aumento significativo do número de UFCs para os grupos 1 e 2. A metodologia utilizada foi eficaz na contaminação dos túbulos dentinários por *E. faecalis*, o que pôde ser observado nas imagens obtidas dos dois espécimes preparados para MEV. O irrigante NaOCl 5,25% foi efetivo na redução da carga microbiana. As duas medicações intracanaisutilizadas foram capazes de reduzir o número *E. faecalis* neste sistema após o período de 14 dias. No entanto, nenhum antimicrobiano foi efetivo no controle da recontaminação do canal principal e dos túbulos dentinários por este microrganismo, após sete diassem medicação intracanal.

Palavras-chave: Endodontia. *Enterococcus faecalis*. Antimicrobianos.

ABSTRACT

This *in vitro* study evaluated the susceptibility of *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) to different intracanal antimicrobials used in endodontic therapy. Thirty-six human molars previously extracted were autoclaved and inoculated with *E. faecalis* (ATCC 29212) for 14 days. After the contamination period the specimens were instrumented by rotatory files and subdivided into two experimental groups (n = 26) and one control group (n = 8). All procedures were performed in laminar flow hood. The experimental group was irrigated with 5,25% NaOCl and divided according to intracanal medication: group 1 (n = 13): 2% chlorhexidine gel and group 2 (n = 13): $Ca(OH)_2$. The control group was treated with 0,85% saline. Four samples were processed for each specimen: after the infection period (A), immediately after instrumentation (B), 14 days after healing medication (C) and seven days after removing the intracanal medication(D). Two specimens were infected and evaluated by SEM to observe the contamination of the dentinal tubules by this microorganism. There was a significant reduction in the Colony Forming Units (CFU) after using 5,25% NaOCl as an endodontic irrigant and after usingthe intracanal medications based on $Ca(OH)_2$ and 2% chlorhexidinegel. Better results were obtained with 2% chlorhexidine gel, although there were not statisticals differences between these two substances. After seventh day without intracanal medication there was significant increase in the number of CFUs for group1 and 2. This methodology was capable to achieving the observation by SEM of the contamination in the main canal and dentinal tubules by *E. faecalis*. The 5,25% NaOCl was an effective irrigant. The two intracanal medications were capable to reduce the number of the *E. faecalis* in the root canal system after 14 days, but no antimicrobial was effective in preventing recontamination of the main canal and dentinal tubules by this microorganism, after seven days without intracanal medication.

Keywords: Endodontics. *Enterococcus faecalis*. Antimicrobials.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A. meyeri – *Actinomyces meyeri*
A. naeslundii – *Actinomyces naeslundii*
A. viscosus – *Actinomyces viscosus*
A. israelli – *Actinomyces israelii*
API – Analytical Profile Index
ATCC – American Type Culture Collection
Atm – atmosfera (unid. de pressão)
BEA – ágar Azida bile-esculina
B. subtilis – *Bacillus subtilis*
BHI – Brain heart infusion
C. albicans – *Candida albicans*
$Ca(OH)_2$ – hidróxido de Cálcio
°C – Celsius
CCS – Centro de Ciências da Saúde
CT – comprimento de trabalho
D – distal
DNA – ácido desoxirribonucléico
Enterococcus – resistentes à Vancomicina - VER
E. faecalis – *Enterococcus faecalis*
E. faecium – *Enterococcus faecium*
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
FAPES – Fundação de Âmparo e Apoio à Pesquisa do Espírito Santo
F. nucleatum – *Fusubacterium nucleatum*
g – grupo
G – Gauge
h – hora
IOUFES – Instituto de Odontologia da UFES
MEV – microscopia eletrônica de varredura
M – Molar (unid. química)
MV – mesio vestibular
ML – mesio lingual

ml – mililitro

MTAD – nome comercial de um irrigante endodôntico

n – número

µl – microlitro

NaOCl – Hipoclorito de sódio

P. endodontalis – *Porphyromonas endodontalis*

P. gingivalis – *Porphyromonas gingivalis*

P. intermedia – *Prevotella intermedia*

P. nigrescens – *Prevotella nigrescens*

P. acnes – *Propionibacterium acnes*

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

PBS – Phosphate Buffered Saline

PCR – polymerase chain reaction

PMCC – paramonoclorofenol canforado

q– PCR – Quantitative polymerase chain reaction

rRNA – Ribosomal ribonucleic acid

RESBAC – Laboratório de Resistência Bacteriana

RT– PCR – reverse transcriptase polymerase chain reaction

S. viridans – *Streptococcus viridans*

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. mutans – *Streptococcus mutans*

TSA – Trypticase soy agar

TSB – Tryptic Soy Broth

UFC – unidade formadora de colônia

USP – Universidade de São Paulo

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

VER – Vancomicin *Enterococcus* resistence

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem da incubadora (Certomat®) 55
Figura 2 – Imagem do frasco contendo os espécimes no interior da incubadora 55
Figura 3 – Imagem no interior da câmara de fluxo laminar da etapa de contaminação dos espécimes 56
Figura 4 – Frasco contendo 200ml de TSB e os espécimes 56
Figura 5 – Figura 5 – Esquema representativo das quatro etapas de coleta A, B, C e D 59
Figura 6 – Imagem dos instrumentos ProTaper Universal: S1; S2; SX; F1; F2 e F3. 60
Figura 7 – Imagem do frasco de vidro utilizado para confecção do dispositivo - teste. 62
Figura 8 – Dispositivo- teste 62
Figura 9 – Etapa de selamento do dispositivo com Superbonder® 63
Figura 10 – Imagem dos espécimes durante o período de medicação intracanal 64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Representação dos valores de UFCs transformados em log_{10}, dos 36 espécimes após 14 dias de contaminação pelo *E. faecalis*. 68

Gráfico 2 – Valores de UFCs do grupo - controle antes (coleta A) e após o preparo químico - mecânico (coleta B), irrigados com salina 0,85% (n = 8).....69

Gráfico 3 – Valores representativos das UFCs do grupo experimental, antes e após o preparo químico - mecânico, com o irrigante NaOCl 5,25% (n=26).....70

Gráfico 4 – Valores de UFCs do grupo medicado com gel de clorexidina 2% nos três momentos (coletas A, B e C). 71

Gráfico 5 – Valores de UFCs do grupo medicado com $Ca(OH)_2$ nos três momentos (coleta A, B e C). 72

Gráfico 6 – Valores encontrados do grupo tratado com gel de clorexidina 2%, em linha azul valores referentes a coleta C e em vermelho, valores referentes a coleta D (CLX: clorexidina) 76

Gráfico 7 – Valores encontrados no grupo tratado com $Ca(OH)_2$, em linha azul valores referentes a coleta C e em vermelho valores referentes a coleta D. 77

Gráfico 8 – Valores percentuais dos grupos: experimental e controle, quanto ao cultivo de *E. faecalis* nas etapas de coleta C e D. (HC: hidróxido de cálcio; CLX: clorexidina).....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Medidas de dispersão, após 14 dias de contaminação dos espécimes pelo *E. faecalis* 69
Tabela 2 – Medidas de dispersão dos valores obtidos na coleta B para o grupo controle e grupo experimental, irrigados com Salina 0,85% e NaOCl 5,25% respectivamente. 70
Tabela 3 – Teste estatístico aplicado para os grupos controle e experimental, coleta B. 71
Tabela 4 – Medidas de dispersão grupos: 1, 2 e grupo controle, obtidos após coleta C. 72
Tabela 5 – Análise estatística referente à coleta C aplicada aos grupos 1, 2 e grupo controle 73
Tabela 6 – Comparação entre as médias obtidas dos grupos 1 e 2 após coleta C . 73
Tabela 7 – Resultados do teste *Tukey* para os grupos 1, 2 e controle, após coleta C. 74
Tabela 8 – Medidas de dispersão dos grupos 1, 2 e grupo controle - medicação intracanal ausente (coleta D). 75
Tabela 9 – Valores estatísticos de UFCs obtidos após a coleta D 75

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 14
2 **REVISÃO DA LITERATURA** 16
2.1 CONTAMINAÇÃO DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES E DOS TÚBULOS DENTINÁRIOS 16
2.2 A MICROBIOTA DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES E DAS LESÕES PERIAPICAIS EM DENTES COM INSUCESSO DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO 19
2.3 DESINFECÇÃO DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES E DOS TÚBULOS DENTINÁRIOS POR SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS INTRACANAL 29
3 **OBJETIVO GERAL** 52
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 52
4 **MATERIAL E MÉTODOS** 53
4.1MATERIAL 53
4.2 MÉTODOS 53
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA 66
5 **RESULTADOS** 68
6 **DISCUSSÃO** 79
7 **CONCLUSÃO** 89
8 **REFERÊNCIAS** 90
ANEXO A - Caracterização morfológica das colônias *E. faecalis* (ATCC 29212) . 95
ANEXO B - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura após 14 dias de contaminação dos espécimes com *E. faecalis.* 96
ANEXO C- Valor de UFCS transformados em Log10 de todas as etapas do experimento. 97

1 INTRODUÇÃO

A manutenção da cadeia asséptica no sistema de canais radiculares e o tratamento das patologias perirradiculares são alvos da terapia endodôntica. Esta especialidade da Odontologia contempla os avanços científicos e tecnológicos, contudo, apesar do sucesso encontrado, o retratamento endodôntico ainda é um procedimento comum entre os profissionais desta área.

A literatura relata que o índice de sucesso da terapia endodôntica situa-se entre 53 a 95% (BERGENHOLTZ et al., 1979; FRIEDMAN; ABITOL; LAWRENCE, 2003; SIQUEIRA JÚNIOR; RICHER; RÔÇAS, 2006). Tal discrepância deve-se às diferentes modalidades de tratamento endodôntico analisados, dos critérios de avaliação utilizados, do período de observação pós-tratamento endodôntico e de outras variáveis (ASHLEY; HARRIS, 2001).

Atualmente, visto a importância da contaminação microbiana na etiopatogênese das doenças periapicais, todas as etapas do tratamento endodôntico visam alcançar a máxima redução do número de microrganismos, de raspas dentinárias e tecidos contaminados, do interior do sistema de canais radiculares infectados.

Segundo Lopes e Siqueira (2010), o preparo químico-mecânico é a etapa do tratamento endodôntico que visa limpar e modelar o canal radicular por meio de instrumentos endodônticos e de soluções químicas auxiliares.

Entre as soluções irrigadoras recomendadas, destaca-se o hipoclorito de sódio por suas excelentes propriedades como solvente de tecido orgânico e efetivo potencial antimicrobiano. No entanto, a ação residual desta substância não tem sido confirmada (ESTRELA et al., 2002; GOMES et al., 2001).

Com o objetivo de complementar o preparo do canal radicular, estudos apontam para o emprego do $Ca(OH)_2$, da clorexidina, e associação destas duas substâncias como medicação curativa intracanal (ALMYROUDI et al., 2002; MURAD et al., 2008; SEDGLEY; BUCK; APPELBE, 2006).

Apesar da eficácia dos procedimentos, muitos microrganismos são resistentes aos antimicrobianos usados sendo que uma das principais causas do fracasso na terapia endodôntica está associada à microbiota e sua capacidade de infectar os túbulos dentinários, e assim persistir na porção apical do sistema de canais radiculares. Estudos que se utilizam da cultura para pesquisar conteúdos de cavidades pulpares infectadas e abscessos perirradiculares, têm demonstrado a sua natureza polimicrobiana e a alta prevalência de anaeróbios nas infecções endodônticas (BAUMGARTNER, 2004; TOMAZINHO; AVILA-CAMPOS, 2007).

Neste contexto, o *Enterococcus faecalis (E. faecalis)* destaca-se como a espécie mais comumente detectada em canais com polpa necrótica e com infecções persistentes ou secundárias. A literatura relata que a persistência do *E. faecalis* em canais radiculares tratados, é atribuída aos seus mecanismos de sobrevivência, inclusive à capacidade de suportar ambientes hostis e escassez nutricional (HANCOCK et al., 2001; PINHEIRO et al., 2003b; SEDGLEY et al., 2006).

O processo de redução e eliminação destes microorganismos tem sido alvo de pesquisas. Diante da complexa anatomia do canal radicular com os istmos e deltas, muitos destes patógenos permanecem nestas áreas e não são alcançados pelos instrumentos endodônticos e soluções irrigadoras, além do que, muitas destas soluções apresentam limitada eficácia frente aos patógenos comuns ao sistema de canais radiculares, necessitando de uma complementação da desinfecção deste sistema promovida pela medicação curativa intracanal.

Desta forma, o uso de métodos de pesquisa que busquem avaliar todo e qualquer procedimento que possa levar efetivamente à desinfecção do sistema de canais radiculares, é de grande importância para a obtenção do sucesso da terapia endodôntica em médio e longo prazo, razão deste estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONTAMINAÇÃO DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES E DOS TÚBULOS DENTINÁRIOS

Um estudo conduzido por Siqueira, Uzeda e Fonseca (1996) avaliou por microscopia eletrônica de varredura (MEV), túbulos dentinários infectados por quatro tipos diferentes de bactérias anaeróbias facultativas comumente isoladas de infecções endodônticas. Foram usados incisivos extraídos de bovinos que foram mantidos em NaOCl 0,5% por 12 horas, para desinfecção dos mesmos. As coroas e os ápices radiculares foram removidos e também o cemento. O diâmetro dos canais radiculares foi alargado a fim de se obter cilindros de dentina padronizados. Os blocos de dentina foram imersos em solução de ácido cítrico 10% durante três minutos para remoção da lama dentinária. Após esterilização, as amostras foram divididas de acordo com o inóculo bacteriano em: seis tubos com *Porphyromonas endodontalis (P. endodontalis)*; seis com *Fusubacterium nucleatum (F. nucleatum)*; cinco com *Actinomyces israelii (A. israelii*); cinco com *Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis)*; cinco com *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) e cinco com *E. faecalis*. Todos os microorganismos foram cultivados em caldo BHI-PRAS durante 21 dias, e o meio foi renovado a cada três dias. Após esse período, os espécimes foram examinados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Pelas análises concluíram que todas as bactérias observadas neste experimento foram capazes de penetrar os túbulos dentinários em diferentes profundidades.

Peters, Wesselink e Moorer (2000) realizaram um estudo a fim de desenvolver um modelo para quantificar a penetração bacteriana no interior dos túbulos dentinários. Utilizaram um aparato contendo dois compartimentos separados por um espécime de dente bovino. A face pulpar contatou a câmara inoculada pelos microorganismos testados, e o lado “cementário” (o cemento radicular foi removido), voltado para a outra câmara contendo salina estéril. Os dois compartimentos foram conectados a duas anilhas acrílicas e anéis de borracha para vedamento. As porções, coronária e apical dos elementos dentais, foram removidas e o terço médio foi usado. Os 87 espécimes foram divididos em seis

grupos, conforme o tratamento recebido: grupo 1: (n=18) submetidos ao ultrassom em salina por 30 minutos; grupo 2: (n=18) submetidos ao ultrassom em NaOCL 5% por 5 minutos seguidos de salina por 30 minutos. Os grupos: 3 (n=18); 4(n=18); 5 (n=10) e 6 (n=5) foram tratados com ultrassom eácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 15% por 5 minutos, para remover a lama dentinária, seguido de NaOCl 5% por 5 minutos e salina por 30 minutos. Os grupos 1, 2, 3 e 5 foram expostos ao *E. faecalis*, e o grupo 4 exposto ao *A. israelii*. O grupo 6 não foi infectado para servir de controle de esterilidade. Todos os espécimes foram autoclavados a 121°C por 20 minutos. A cada duas semanas, metade do meio de cultura era aspirado e renovado. Após seis semanas, os dois lados da amostra foram checados para verificar a viabilidade do microorganismo. Do grupo 5: cinco amostras foram usadas para avaliação histológica e microscopia óptica. Três amostras de cada unidade experimental foram coletadas e semeadas em ágar BHI, incubadas a 37°C por sete dias. As unidades formadoras de colônias (UFCs) foram contadas e expressas em miligrama. Os resultados encontrados foram: no grupo 1: 45% das amostras apresentaram infecção; nos grupos 2, 3 e 4 as porcentagens foram respectivamente: 45%, 89% e 28%. Em 11% nenhum crescimento foi observado do lado pulpar ou médio. No grupo 2: três espécimes não apresentaram crescimento do lado pulpar, enquanto houve crescimento nas amostras média e cementária. No grupo 3: cinco amostras apresentaram bactérias não viáveis na parte pulpar e /ou média, apesar de ser observado crescimento em segmentos mais profundos, e o grupo1: nenhuma bactéria viável foi encontrada no terço médio de apenas uma amostra. No exame histológico observaram infecção intermediária (menos que a metade dos túbulos) em quatro dos cinco espécimes dentinários. O quinto espécime deste grupo não apresentou sinais histológicos de disseminação do *E.faecalis.* Os autores concluíram que: a remoção da lama dentinária fornece uma penetração bacteriana em maior extensão; o *E. faecalis*colonizou os túbulos dentinários significantemente em maior profundidade que o *A. israelii*; a cultura microbiana foi a técnica mais sensível para estabelecer a presença bacteriana no interior dos túbulos dentinários.

Distel, Hatton, Gillespie (2002) ao avaliarem *in vitro* a colonização de canais radiculares por *E. faecalis* em dentes de humanos extraídos, medicados com

$Ca(OH)_2$, observaram biofilmes formados após 86 e 160 dias de inoculação, que apresentaram espessuras de 21µm e 28-30µm, respectivamente. Portanto, os autores puderam observar evidências da colonização e formação de biofilmes em canais radiculares de humanos pelo *E. faecalis*.

Britto et al. (2009) realizaram um estudo a fim de observar a redução bacteriana intracanal pela ação de três diferentes irrigantes. Canais radiculares de sessenta e seis dentes de humanos extraídos foram contaminados por *E. faecalis* durante sete dias. Um inóculo foi preparado a partir da suspenção de 1,0ml de cultura pura deste microrganismo (ATCC 29212) crescida em Tryptic Soy Broth (TSB) por 24h e posteriormente adicionada a 5,0ml de TSB fresco. Desta suspensão utilizou-se 1,0ml para inocular cada espécime, com o auxílio de uma seringa de insulina. Novo meio de cultura foi adicionado aos canais ao 1°, 4° e 6° dia do inóculo inicial. Após sete dias, os autores observaram ao MEV uma densa colonização bacteriana nas paredes do canal radicular.

Com o objetivo de avaliar o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio, Estrela et al. (1999) contaminaram túbulos dentinários de dentes de humanos extraídos com quatro diferentes microrganismos: *E. faecalis**,** Staphylococcus aureus (S. aureus), Bacillus subtilis (B. subtilis) e Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)* e uma mistura destes microorganismos nos períodos de 0, 48 horas, 72 horas e 10 dias. As cepas bacterianas foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. As suspensões obtidas foram ajustadas ao tubo 2 da escala de McFarland (6×10^8 células/ml) e os espécimes foram inoculados com as respectivas suspensões através do auxílio de seringas descartáveis, com volume suficiente para preencher todo o canal. Foi dispensado 1,0ml de cada suspensão, para obter a mistura de microorganismos. Estes procedimentos foram repetidos a cada 72 horas durante 28 dias sempre usando culturas frescas dos inóculos citados. O crescimento bacteriano foi confirmado pela turbidez do meio e pela semeadura em placas de Agar BHI. Os autores afirmaram que o método de contaminação em um período de 28 dias, foi eficaz para estabelecer uma profunda contaminação dos túbulos dentinários.

Almyroudi et al. (2002) compararam a ação de quatro diferentes substâncias utilizadas como medicação intracanal, e para tal utilizaram cilindros de dentina

obtidos a partir de dentes de humanos extraídos. Os espécimes foram dispostos em frascos contendo caldo TSB, em grupos de oito elementos cada, e contaminados com *E. faecalis* preparados a partir de inóculo inicial deste microorganismo (American Type Culture Collection - ATCC 59876). Durante um período de 14 dias, novos inóculos foram preparados e adicionados aos frascos a cada 3 dias. Espécimes foram preparadas para visualização em MEV e as micrografias obtidas demonstraram uma efetiva penetração do *E. faecalis* nos túbulos dentinários, e uma profundidade maior de penetração foi observada em relação ao alcance da broca utilizada para preparar o interior dos cilindros dentinários. Os autores consideraram o método efetivo para contaminar os espécimes, porém afirmaram limitações.

Siqueira Júnior et al. (2010) observaram por meio do MEV, a contaminação de canais radiculares por *E. faecalis*, com o intuito de avaliar a ação de diferentes instrumentos endodônticos na eliminação desta bactéria do interior do canal radicular. Quarenta e quatro dentes de humanos extraídos foram contaminados por este microrganismo por um período de 30 dias. Cada frasco com dez espécimes, contendo 200 ml de caldo TSB foi inoculado a cada sete dias. Um inóculo preparado a partir de 1,0 ml de cultura pura de *E. faecalis* (ATCC 29212) crescida por 24 horas a 37°C, foi adicionado a 5,0ml de TSB fresco. Desta nova suspensão utilizou-se 1,0ml para realizar a contaminação dos frascos, mantidos em uma incubadora programada para efetuar movimentos suaves. As imagens obtidas permitiram aos autores observarem uma densa contaminação dos canais radiculares pelo *E. faecalis* e a formação de estruturas parecidas com biofilmes.

2.2 A MICROBIOTA DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES E DAS LESÕES PERIAPICAIS EM DENTES COM INSUCESSO DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO

Um estudo realizado por Sundqvist, Fidgor e Sjgren (1998) avaliaram a composição microbiana de canais radiculares com indicação de retratamento. Testes microbiológicos foram realizados a partir de amostras obtidas de material obturador removido de 54 dentes com tratamento endodôntico e lesão periapical

persistente. Os dentes foram retratados e proservados durante cinco anos. Os resultados demostraram que a microbiota era composta de espécies únicas de microorganismos Gram-positivos. O *E. faecalis* foi o microorganismo isolado e recuperado com maior frequência. A taxa de sucesso nos retratamentos foi de 74%. Os autores observaram que a composição microbiana em dentes que ainda não haviam recebido intervenção endodôntica, foi notoriamente diferente da microbiota de dentes com insucessos endodônticos e que a presença de infecção no momento da obturação e o tamanho da lesão periapical são fatores determinantes de um prognóstico desfavorável.

Hancock et al. (2001) investigaram na população norte americana a composição da microbiota de dentes que não tiveram sucesso no tratamento endodôntico. Este estudo fez uso de técnicas anaeróbicas sofisticadas a partir de amostras coletadas de 54 dentes com sinais radiográficos de periodontite apical crônica. Foram obtidas amostras dos condutos radiculares e dos restos de guta-percha por meio de pontas de papel absorvente, as quais foram transferidas para ampolas contendo meio para transporte de amostras (amostra 1). Um corte de quatro milímetros de três ou cinco limas utilizadas foi transferido para uma segunda ampola contendo o mesmo meio (amostra 2). Ambas as amostras cresceram em condições aeróbias e anaeróbias e o crescimento bacteriano foi avaliado. A qualidade das restaurações dos dentes estudados foi considerada boa em 21 casos, inadequada em 28 casos e pobre em cinco casos. A análise da amostra 1 indicou a presença de microrganismos em 33 dos 54 dentes (61,1%). Em 20 casos, não houve bactéria cultivável. Em um caso*, Candida albicans* (*C. albicans*) estava presente como único microorganismo. Em seis dos 10 casos, *o E. faecalis* foi o único microrganismo presente, e nos outros quatro, somente um microrganismo adicional foi encontrado. Houve predominância de anaeróbios Gram-positivos (80,4%) como *E. faecalis*, *Peptostreptococcus spp, Actinomyces spp e Streptococcus* como espécies/gêneros predominantes. Na amostra 2, a presença de espécies bacterianas foi demonstrada em 28 dos 54 dentes (51,9%). *C. albicans* não foi detectada em nenhum caso. Houve também predominância de anaeróbios Gram-positivos (88,1%) como *E. faecalis, Actinomyces spp e Streptococcus spp* como espécies/gêneros predominantes. O *E. faecalis* foi observado em 32,1% dos dentes sendo o microrganismo mais

encontrado. Segundo os autores, esse resultado se deve à assepsia inadequada, isolamento de má qualidade ou infiltração coronária durante tratamento inicial e à pressão seletiva do $Ca(OH)_2$ usado como medicação intracanal. Deve-se considerar durante o retratamento, o uso de soluções e medicamentos intracanais alternativos para melhor prognóstico dos casos.

Sunde et al. (2002) investigaram a microbiota periapical de 36 dentes com periodontite apical persistente. Após cultivo em anaerobiose, um total de 148 amostras, 67 espécies microbianas foram encontradas. Uma das 36 lesões periapicais apresentou cultura negativa. Aproximadamente metade das bactérias detectadas, era anaeróbia. Espécies Gram-positivas constituíram 79,5% da microbiota, microrganismos facultativos como *Staphylococcus, Enterococcus, Enterobacter, Pseudomonas, Stenotrophomonas, Sphingomonas, Bacillus*, ou *Candida* foram encontradas em 27 das lesões (75%). Grânulos foram encontrados em nove lesões (25%), e nestes *A. israelii*, *Actinomyces viscosus* (*A. Viscosus*), *Actinomyces naeslundii* (*A. naeslundii*) e *Actinomyces meyeri* (*A. meyeri*)foram identificados. Os autores observaram uma variedade de microorganismos, particularmente Gram-positivos na lesão periapical de dentes com periodontite apical persistente.

Pinheiro et al. (2003b) investigaram a microbiota de dentes com falhas no tratamento endodôntico e sua associação com características clínicas. Sessenta dentes obturados endodonticamente e com evidências clínicas e radiográficas indicadoras de retratamento foram avaliados. Algumas características como o tipo dental, sintomas clínicos, presença de cárie, fístula, edema, sensibilidade à percussão, mobilidade, condição periodontal, presença de exsudato e a qualidade da obturação foram comparadas com os achados microbiológicos. Durante o retratamento, foram coletadas amostras dos canais e realizadas técnicas microbiológicas avançadas para anaeróbios. Trinta e sete espécies bacterianas diferentes foram encontradas. Nove canais radiculares não tinham bactéria cultivável (15%). Dos 28 casos (46,7%), um único microrganismo foi isolado. Oito casos (13,3%) apresentavam duas espécies e 15 (25%) eram infecções polimicrobianas. Microrganismos facultativos corresponderam a 57,4% das espécies isoladas e os anaeróbios estritos, 42,6%. Houve uma predominância de Gram-positivos. A bactéria mais frequentemente isolada foi o

E. faecalis. Dentes obturados com dor ou história de dor foram associados a infecções polimicrobianas e anaeróbios, incluindo *Prevotella e Fusobacterium spp*. Dor espontânea foi relacionada com *Prevotella intermedia (P. intermédia*)e *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*). Fístulas foram relacionadas a *Streptococcus, Actnomyces*, especialmente *A. naeslundii.* Dentes não selados coronariamente mostraram associação com *Streptococcus* e *Candida.* Concluíram que a microbiota de dentes com falhas no tratamento é limitada a poucas espécies, com predomínio de Gram-positivos. Entretanto, infecção polimicrobiana e anaeróbios estritos foram achados em canais de dentes sintomáticos.

Com o objetivo de identificar *E. faecalis* em canais radiculares que apresentavam lesões perirradiculares não cicatrizantes e determinar se a prevalência desses microrganismos é aumentada em pacientes com diabetes, Fouad et al. (2005) usaram o método de polymerase chain reaction (PCR) e sequência molecular para detectar a presença de quarenta espécies bacterianas. Amostras foram obtidas de condutos radiculares por meio de pontas de papel absorvente de um total de 37 pacientes com indicação de retratamento endodôntico. Foram incluídos todos os pacientes que apresentaram sintomas clínicos e presença de lesões periapicais persistentes ao exame radiográfico. Seis indivíduos eram portadores de diabetes tipo II. O ácido desoxirribonucleico (DNA) foi extraído dos espécimes crescidos no meio de cultura em condições de aerobiose e foram amplificados com o uso de *primers* que tiveram como alvo o gene *tuf* de 14 *Enterococcus* spp*.* Os produtos de PCR foram sequenciados e identificados filogeneticamente. Dos 37 casos, 8 (22%) foram positivos para *E. faecalis*. Não houve diferença estatística na prevalência de *E. faecalis* entre os grupos com selamento coronal pré-operatório aceitável (6/30 ou 20%) e o grupo de não aceitáveis (2/7 ou 29%). Também não houve diferença estatística entre grupos com obturação prévia aceitável (4/18 ou 22%) e não aceitável (4/11 ou 36%). Apenas um caso com obturação e selamento coronal prévio inaceitável, não apresentou presença de *E. faecalis* no canal radicular. Dos seis pacientes diabéticos (33%), dois casos foram positivos para *Enterococcus* spp. Os resultados desse estudo demonstraram que estes microorganismos podem não estar presentes na maioria dos casos com lesões perirradiculares não

cicatrizantes e que mais estudos são necessários para caracterizar o papel dos mesmos na persistência das lesões perirradiculares, como também, determinar sua resistência às técnicas de desinfecção endodôntica e aos antibióticos.

Sedgley et al. (2005) avaliaram quantitativamente pelo método molecular q-PCR e por cultura microbiológica, amostras coletadas da saliva de 30 pacientes em tratamento endodôntico do curso de Odontologia da Universidade de Michigan a fim de detectar a presença do *E. faecalis* (ATCC 40608) em culturas puras e mistas. A saliva foi coletada durante 60 segundos em 10ml de água destilada e após 60 segundos, nova coleta foi obtida da saliva e acondicionada em tubos plásticos (Falcon), cada amostra foi centrifugada a 4° C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e pellets foram resuspensos em 1,0ml de água destilada livre de nuclease. Foram plaqueados inóculos de 50µl de cada amostra em placas de ágar Tood Hewitt para crescimento não-seletivo e ágar Azida bile-esculina (BEA) para isolar o E*. faecalis*. Todas as placas de Petri foram incubadas em aerobiose a 37°C por um período de 24-48h. As unidades formadoras de colônias porml foram determinadas. A identificação do *E.faecalis* foi observada pela hidrólise da bile-esculina e em seguida purificadas pela semeadura em placas de BEA frescas. A identificação das colônias foi processada pelo teste Analytical Profile Index (API) 20 Strep (Bio Mérieux SA, França). Este experimento foi conduzido para determinar o menor limite de detecção de *E. faecalis* em cultura mista de *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), também presente em amostras clínicas de humanos, de modo que foi selecionada como a melhor espécie para testar a especificidade do *primer* (alta similaridade na sequência do 16S ácido Ribosomalribonucleico (rRNA). O *E.faecalis* foi detectado em cinco (17%) das 30 amostras coletadas, nas concentrações entre 114-490 células/ml e nos ensaios de cultura microbiológica foi detectado em apenas duas amostras, dentre as cinco detectadas pelo Quantitative polymerase chain reaction(q-PCR). As 25 amostras negativas para o *E. faecalis* no q-PCR, também foram negativas para cultura. Os autores relataram a maior incidência de *E. faecalis* pelo q-PCR nas amostras de saliva, e consideraram a maior sensibilidade deste teste, em relação a cultura microbiológica.

Gomes et al. (2006) realizaram um estudo para investigar a presença de *E. faecalis* em infecção radicular primária e secundária com lesão periapical utilizando métodos de cultura e análise em PCR. Neste estudo foram utilizados 50 dentes com infecção endodôntica primária e 50 dentes com infecção secundária. Os fracassos endodônticos foram determinados com base em avaliação clínica e radiográfica. A maioria dos dentes com infecção secundária (45) tinham sido tratado há mais de quatro anos, e cinco casos há mais de dois anos, sendo que os pacientes apresentavam sintomas persistentes e ou desconforto à percussão. Técnicas de cultura foram utilizadas incluindo diluição em série e identificação bioquímica. Para detecção em PCR usaram uma espécie-específica primária de 16S rRNA. Foram detectados microrganismos em 23 dos 100 dentes utilizados, pelo método de cultura e 79 de 100 pela análise em PCR. Dentre estes canais, o método de cultura identificou dois (4%) de 50 canais necróticos e 21 (42%) de 50 canais tratados. Pelo método PCR identificaram em 41 (82%) e 38 (76%) de 50 canais com infecção primária e secundária, respectivamente. Concluíram que *E. faecalis* foi detectado tão frequentemente em dentes com polpa necrótica como em dentes que resultaram em fracasso do tratamento endodôntico quando a análise em PCR foi utilizada.

Stuart et al. (2006) evidenciaram que a infecção intrarradicular, a infecção extrarradicular, reação de corpo estranho e cistos são fatores que contribuem para infecção perirradicular persistente, considerada a maior causa de fracasso endodôntico, e pode ser caracterizada por altas porcentagens de *E. faecalis* (entre 24 a 77%). De acordo com os autores estes microrganismos são cocos Gram-positivos, facultativos que possuem capacidade de sobrevivência na presença ou ausência de oxigênio, além de apresentarem vários fatores de virulência, capacidade de competir com outros microrganismos, invadir túbulos dentinários e resistência nutricional. Na infecção endodôntica primária, podem ser encontrados de quatro a 40% e associados à lesão perirradicular crônica assintomática. Ainda evidenciaram que em tratamentos endodônticos fracassados, são nove vezes mais comuns do que na infecção primária. Sua detecção pelo método PCR (67 a 77%) mostrou maior eficácia que o método de cultura (24 a 70%). Segundo estes autores, o uso de boa técnica asséptica e aumento do tamanho do preparo apical poderia facilitar a remoção da bactéria

intratubular pela penetração mais eficiente de antimicrobianos. Também ressaltaram a importantânciado uso do EDTA para remoção da porção inorgânica da *smear layer* a fim de permitir a penetração de irrigantes como hipoclorito de sódio 3%, ou clorexidina 2% nos túbulos dentinários, assim como medicação intracanal (clorexidina gel 2% ou a associação deste com hidróxido de cálcio, ou combinação de hidróxido de cálcio com paramonoclorofenol canforado). Estes autores afirmaram que o hidróxido de cálcio usado de forma única não apresentou eficácia na eliminação de *E. faecalis*, contudo, cimentos à base de óxido de zinco e eugenol e o AH PLUS® apresentaram efeito antimicrobiano sobre esses microrganismos adicionados a um bom selamento coronário.

A prevalência do *E. faecalis* foi investigada em diferentes sítios bucais (cavidade bucal, língua, sulco gengival e canal radicular) de 41 pacientes em tratamento endodôntico, num total de 136 amostras por Sedgley, Buck e Appelbe (2006). Os autores utilizaram os métodos de cultura microbiológica e PCR para detecção do microrganismo. Avaliaram a relação entre algumas características clínicas observadas, e a presença desta bactéria nos sítios de amostragem. Todas as amostras foram coletadas antes de iniciar o tratamento endodôntico. A avaliação foi realizada em apenas 21 pacientes, por apresentarem todas as quatro amostras. Nos resultados da cultura foram detectados *E. faecalis* em uma amostra (cavidade bucal) de dois pacientes, e duas amostras (cavidade bucal e língua) de dois outros pacientes. A avaliação pelo PCR detectou a presença da bactéria em 29 (70%) dos pacientes, que apresentaram pelo menos uma amostra para o *E. faecalis*. O PCR foi significantemente mais sensível que a cultura. O *E. faecalis* foi mais detectado na língua (42%) em relação ao sulco gengival (14%), cavidade oral (10%) e canal radicular (10%). Foi observada uma maior prevalência do *E. faecalis* em pacientes com comprometimento periodontal. Os autores consideraram a presença do *E. faecalis* em canais radiculares, e salientaram que sua ocorrência na cavidade oral pode ser maior do que anteriormente sugerida. Ainda segundo os autores, possivelmente este microrganismo por fazer parte do biofilme da língua possa penetrar em canais previamente tratados, o que pode contribuir para sua patogenicidade.

Um estudo realizado por Sedgley et al. (2006) comparou por cultura e q-PCR, a detecção e quantificação do *E. faecalis*, obtidos de amostras clínicas de infecções endodônticas primárias (n = 40), e retratamentos (n = 48). Os dentes foram isolados com lençol de borracha previamente às coletas, que foram obtidas com o auxílio de cones de papel introduzidos no interior do canal e transferidas para o meio de transporte VMGA III. Os pacientes apresentavam idade entre 25-85 anos. Os resultados obtidos por cultura foram: presença de bactérias em 54,5% e *E. faecalis* em 10,2%; e por q-PCR: 100% de detecção de bactérias e 79,5% de detecção de *E. faecalis* num total de 88 amostras. O *E. faecalis* foi mais detectado em amostras de retratamento do que nas amostras provenientes de infecção primária, porém esta diferença não foi estatisticamente significante. Os autores consideraram que apesar da maior capacidade de detecção dos testes moleculares observados neste estudo, ambos os testes convencional e molecular são necessários para a melhor compreensão do papel do *E. faecalis* nos processos de infecção dos canais radiculares.

Segundo Genttleman e Roda (2007), as causas de insucesso de tratamento endodôntico incluem erros de procedimentos como: acesso insatisfatório à cavidade, canais não localizados (tanto os principais quanto os acessórios), canais inadequadamente preparados e obturados, complicações na instrumentação (degraus, perfurações, ou instrumentos fraturados), extravasamento de material obturador do canal e infiltração coronária. A limpeza, o acabamento, a obturação e a restauração final inadequados de um dente endodonticamente tratado foram considerados como fatores que podem levar a uma lesão pós-tratamento. Ainda de acordo com os autores, caso o tratamento endodôntico inicial não resulte em um espaço livre de bactérias, ou se a obturação não eliminá-las adequadamente, e novos microrganismos estiverem presentes no canal limpo e obturado, há potencial possibilidade de uma infecção pós-tratamento. Quanto à microbiota contaminante, foi observada predominância de Gram-positivos não anaeróbios, e a espécie comumente isolada foi o *E. faecalis*, que mostrou-se resistente à desinfecção do canal. São também encontrados em infecções endodônticas persistentes, fungos principalmente *C. albicans.* Segundo estes autores, a infecção extrarradicular se deve às bactérias que invadem os tecidos perirradiculares por difusão através do espaço do canal

radicular via extrusão de resíduos de dentina infectada ou pela contaminação na sobre-instrumentação utilizando limas contaminadas ou através de bolsas periodontais contaminadas que se comunicam com a área apical.

De acordo com Nair (2007), os fatores que causam o insucesso do tratamento endodôntico são: controle de infecção inadequado, cavidades de acesso mal planejadas, canais não instrumentados, instrumentação insuficiente e restaurações temporárias ou permanentes com infiltração. Falhas ainda ocorrem devido à complexidade anatômica do sistema dos canais radiculares com regiões que não podem ser debridadas e obturadas com os instrumentos, materiais e técnicas existentes. As bactérias encontradas em lesão persistente foram predominantemente cocos Gram-positivos, bastonetes e filamentos. Através de técnicas baseadas em cultura, espécies pertencentes ao gênero *Actinomyces, Enterococcus* e *Propionibacterium* foram frequentemente isolados e caracterizados em tais canais. A infecção microbiana persistente na porção apical do sistema de canais radiculares é a causa principal de falhas endodônticas tanto em canais pobremente tratados quanto em casos tratados adequadamente.

Com o objetivo de comparar dois diferentes métodos de detecção e quantificação de *E. faecalis* em infecções endodônticas, Willians et al. (2006) coletaram amostras clínicas destas infecções, primárias e secundárias (refratárias), a fim de realizar os testes de q-PCR e cultura. Um segundo objetivo foi desenvolver o ensaio do PCR transcriptase reversa (RT- PCR) para a detecção do *E. faecalis* no estado viável, mas não cultivável. Todas as amostras foram obtidas a partir de dentes unirradiculares de 29 participantes, 15 portadores de infecção endodôntica primária e 14 com infecção secundária. Os critérios de inclusão dos casos de infecção refratária foram: histórico de tratamento endodôntico há mais de cinco anos; obturação a 5,0mm do ápice radicular; evidência radiográfica de lesão periapical; restauração adequada e coroa suficiente para isolamento. Foram obtidas 87 amostras intracanais: S1- obtida após a abertura coronária; S2- após a instrumentação e irrigação e S3- após curativo de demora. Os autores realizaram três coletas com pontas de papel absorvente estéril, transferidas para o meio específico de acordo com o teste a ser realizado. Nas infecções refratárias o *E. faecalis* foi encontrado para

S1 em 14% dos casos pela cultura e, 43% dos casos pelo q-PCR. Com a terapia endodôntica, a detecção por cultura do *E. faecalis*, foi reduzida para um caso em S2 e totalmente eliminado em S3. Porém, a detecção pelo q-PCR aumentou para 57% dos casos em S2, e 50% dos casos em S3. O teste de RT-PCR detectou o RNAm em S3 de uma infecção primária e seis infecções refratárias, estas mesmas amostras também foram detectadas pelo q-PCR. Os autores concluíram que as técnicas moleculares q-PCR e RT-PCR são mais sensíveis do que o método tradicional de cultura na detecção e quantificação do *E. faecalis* de infecções endodônticas e que as bactérias no estado viável, mas, não cultivável, podem persistir após a terapia endodôntica.

Garcez et al. (2010) relataram o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica combinado com tratamento endodôntico através da avaliação microbiológica de 30 dentes anteriores, de pacientes com lesão periapical de uma clínica privada, já submetidos ao tratamento endodôntico e antibioticoterapia. Os pacientes apresentavam bom estado de saúde e tinham entre 17 - 52 anos de idade. Amostras dos dentes acometidos foram obtidas antes de acessar o canal; após a terapia endodôntica e após a terapia fotodinâmica. Todas as coletas foram transferidas para frascos com caldo ágar nutriente e encaminhados para análise microbiológica e antibiograma (método de Kirby-Bauer). Nos resultados da primeira coleta, todos os pacientes apresentaram pelo menos um microrganismo resistente. Dentre os microrganismos encontrados, 33% eram Gram-negativos; 67% Gram-positivos; 57% facultativos e 43% anaeróbios. A terapia endodôntica reduziu significantemente os números de espécies microbianas: 10 dos elementos dentários tratados obtiveram 100% de eliminação dos microrganismos após o tratamento endodôntico. A terapia endodôntica associada à TFD eliminou todas as espécies resistentes. Os autores concluíram que a TFD coadjuvante ao tratamento endodôntico convencional, possibilita uma maior redução da carga microbiana, e apresenta significante efetividade contra bactérias resistentes no interior do sistema de canais radiculares após o preparo químico-mecânico.

Vidana et al. (2010) avaliaram um total de 50 pacientes de uma clínica privada com indicação de retratamento endodôntico em dentes com periodontite apical. Com o intuito de esclarecer a origem de *E. faecalis* obtido dos canais

radiculares, foram coletadas amostras de saliva e fezes desses pacientes. Amostras do canal radicular que detectaram a presença do *E. faecalis* e as coletas correspondentes de saliva e fezes foram submetidas à avaliação microbiológica e genotipagem. A maioria dos dentes investigados foram os molares. Microrganismos foram detectados em 37 dos pacientes (74%), contra 13 (26%) que não apresentaram crescimento bacteriano. O microrganismo mais encontrado foi *E. faecalis* e *Streptococcus viridans* (*S. viridans*). O *E. faecalis* foi detectado em 8 dos 50 pacientes (16%) com periodontite apical e em nenhum destes foi identificado *E. faecalis* na saliva pela cultura, no entanto, em seis indivíduos, o microorganismo foi isolado na amostra fecal. Para estes casos, o teste gel eletroforese *pulsed-field* foi utilizado para investigar a relação da cepa bacteriana do canal com a das fezes, mas não houve relação genética entre elas. *E. faecalis* isolado de lesões refratárias possivelmente não derivam da microbiota normal do próprio paciente, portanto, a possibilidade de uma infecção exógena não pode ser excluída.

Um estudo recente de Pavaskar et al. (2012) avaliou *in vitro* a ação do $Ca(OH)_2$ e do Linezolida (antimicrobiano de amplo espectro, utilizada com eficácia comprovada contra espécies de *Enterococcus* resistentes à Vancomicina - VER) e da associação destes dois medicamentos, em túbulos dentináros infectados com *E. faecalis* de pré-molares extraídos de humanos. Os resultados mostraram que o $Ca(OH)_2$ só foi efetivo até 72 horas, porém o Linezolide foi mais efetivo do que o $Ca(OH)_2$, com melhores resultados nos tempos de 8 e 14 dias. Este fármaco tem sido recentemente estudado e sua associação ao $Ca(OH)_2$ tem sido recomendada, porém sua biocompatibilidade com os tecidos periapicais ainda não foi avaliada.

2.3 DESINFECÇÃO DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES E DOS TÚBULOS DENTINÁRIOS POR SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS INTRACANAL

Um estudo feito por Siqueira e Uzeda (1996) avaliou *in vitro* a infecção de túbulos dentinários, por três diferentes bactérias comumente isoladas de infecções endodônticas. Dentes incisivos de bovinos após serem desinfetados

com hipoclorito de sódio a 0,5% por 12 horas e estocados em solução salina até o início o uso, tiveram seus ápices e coroas removidos perpendicularmente ao seu longo eixo. O remanescente foi novamente seccionado para obtenção de dois cilindros de dentina com 4,0mm de comprimento. Os canais radiculares foram alargados e seus respectivos diâmetros padronizados em 2,0mm. Os espécimes foram colocados em frascos contendo ácido cítrico 10% por três minutos e agitados para a remoção da lama dentinária. Dois cilíndros de dentina foram separados para avaliação por microscopia eletrônica de varredura. Todos os dentes foram autoclavados a 121°C por 20 minutos, em tubos contendo caldo BHI, e posteriormente incubados em estufa a 37°C por sete dias, para prova de esterilidade. Os espécimes foram divididos do seguinte modo: 36 tubos inoculados com *A. israelii*; 36 com *F. nucleatum* e 36 com *E. faecalis*. Os inóculos foram ajustados à turbidade 0,5 da escala de McFarland e incubados por 21 dias a 37°C. O meio de cultura foi renovado a cada três dias. Após o período de incubação, os cilíndros infectados foram lavados com solução salina para remoção do meio de cultura. Cada grupo bacteriano foi dividido em: 15 espécimes submergidos em pasta de $Ca(OH)_2$ + salina; 15 em placas contendo $Ca(OH)_2$ + PMCC, e seis em solução salina estéril. As placas foram acondicionadas em jarras, em condições de anaerobiose, e incubadas a 37°C por diferentes períodos de tempo. Dois cilindros foram avaliados para cada grupo controle. Os espécimes foram agitados em tubos de 5,0 ml de solução salina estéril, para remoção do medicamento. Em seguida, todas as amostras foram transferidas para tubos contendo 5,0ml de caldo BHI e incubados a 37°C por 40 dias. No grupo controle, todos os espécimes infectados, apresentaram cultura positiva para todos os períodos de tempo. Os espécimes tratados com $Ca(OH)_2$ + PMCC, no tempo de uma hora de exposição foi suficiente para eliminar as bactérias nos túbulos dentinários, exceto o *E. faecalis* que demandou um dia. A pasta de $Ca(OH)_2$ + solução salina foi ineficaz para eliminar *E. faecalis* e *F. nucleatum*, mesmo após sete dias de exposição. O *A. israelii* foi eliminado dos túbulos após um dia de contato com a pasta de $Ca(OH)_2$ + solução salina. Os autores consideraram que a pasta a base de $Ca(OH)_2$ + PMCC foi efetiva em desinfectar túbulos dentinários contaminados com as três cepas bacterianas.

Estrela et al. (1999) avaliaram o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio em túbulos dentinários infectados com quatro diferentes microrganismos: *E. faecalis*, *S. aureus, B. subtilis e P. aeruginosa* e uma mistura desses microrganismos nos períodos de 0, 48 horas, 72 horas e 10 dias com a medicação intracanal. Estes microrganismos foram inoculados em caldo BHI e incubados à temperatura de 37°C por 24 horas. Foram utilizados 63 dentes de humanos extraídos (incisivos centrais superiores) divididos em cinco grupos de 12 espécimes cada. Os dentes foram instrumentados até lima tipo K #60 a 1,0mm do ápice radicular pela técnica de preparo *step-back* e irrigados com 3,0mm de hipoclorito de sódio 1%. Os espécimes foram lavados com EDTA a 17% por três minutos. Após o preparo os dentes foram esterilizados em autoclave por 30 minutos. Foram usados três dentes para o controle negativo, não inoculados, mantidos em meio úmido e posteriormente transferidos para caldo BHI por um período de sete dias. A inoculação dos microrganismos foi feita com o uso de seringas, com volume suficiente para preencher todo o canal, e este procedimento foi realizado a cada 72h durante 28 dias sempre usando culturas frescas e com ajuste ao tubo 2 da escala de McFarland. Os espécimes foram mantidos em meio úmido com temperatura de 37°C. Os dentes foram irrigados com 5,0ml de salina, secos e completamente preenchidos com pastas de hidróxido de cálcio. A medicação foi removida nos intervalos de 0, 48 horas, 72 horas e 10 dias, com o uso de irrigação com salina e a movimentação de uma lima no interior do canal. Os dentes foram secos e imersos em 5,0ml de BHI e incubados por 48 horas. O crescimento bacteriano foi mostrado pela turbidez do meio de cultura. Os resultados obtidos demonstraram que num período de sete dias o $Ca(OH)_2$ não apresentou nenhum efeito antimicrobiano contra o *E. faecalis, S. aureus, B. subtilis e a P. aeruginosa* e a mistura destes microrganismos *in vitro*. Os autores sugeriram que dentro das condições usadas neste experimento, a quantidade de íons hidroxila liberados pelo $Ca(OH)_2$ não foi suficiente para promover a eliminação destas espécies.

Estrela et al. (2001) avaliaram *in vitro* a efetividade antimicrobiana do $Ca(OH)_2$ com quatro tipos de veículos. Diferentes microorganismos foram avaliados: *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. Aeruginosa, B. Subtilis, Streptococcus mutans (S. mutans) e C. albicans*. As cepas foram inoculadas em 5,0ml de caldo BHI e incubadas a

37°C por 24h, de modo que para o preparo da suspensão experimental foram usados indicadores biológicos cultivados em ágar BHI incubados nas mesmas condições citadas. Células microbianas foram ressuspensas em salina para obter a concentração de 3 x 10^8 células ml^{-1} equivalente ao tubo 1 da escala de MacFarland, e 1,0 ml de cada suspensão pura foi usada para obter a mistura-teste de microrganismos. Pontas de papel absorvente #50, num total de 588, foram imersas nas soluções experimentais por três minutos. As pontas de papel foram colocadas em placas de Petri contendo os seguintes curativos de demora: $Ca(OH)_2$ + salina; $Ca(OH)_2$ + paramonoclorofenol canforado; $Ca(OH)_2$ + solução de clorexidina a 1%; $Ca(OH)_2$ + sulfato lauril de sódio a 3%; $Ca(OH)_2$ + Otosporin® (FQM) e um grupo controle composto por salina + Agar-ágar a 1%. Em seguida as pontas de papel absorventes foram removidas em intervalos de tempo de: um minuto, 48 horas, 72 horas, e 7 dias, transferidos para meio de cultura apropriado e incubados a 37°C por 48 horas. O crescimento bacteriano foi observado pela turbidez do meio de cultura e pela coloração de Gram obtida das amostras semeadas na superfície de ágar BHI. Os resultados obtidos demonstraram que as pastas de $Ca(OH)_2$ utilizadas neste experimento tiveram ação antimicrobiana após 48 horas contra espécies puras e contra uma suspensão mista dos microrganismos. O veículo associado ao $Ca(OH)_2$, não influenciou no tempo necessário para a ação antimicrobiana.

Um estudo *in vitro* realizado por Gomes et al. (2001) avaliou a efetividade do NaOCl e da clorexidina (gel e líquida) em diferentes concentrações na eliminação do *E. faecalis*. Todos irrigantes foram manipulados nas seguintes concentraçãos: NaOCl 0,5%; 1%; 2,5%; 4% e 5,25% e clorexidina 0,2%; 1% e 2%. O NaOCl e a clorexidina líquida foram diluídos em água destilada sem conservantes, e a clorexidina gel foi constituída por gel base (natrosol a 1%) e gluconato de clorexidina. Colônias puras de 24 horas de *E. faecalis* foram semeadas em placas de ágar BHI enriquecido com sangue de carneiro 10%. Posteriormente realizaram uma suspensão em solução salina estéril 0,85% e ajustada a 0,5 da escala de McFarland. Um ml de cada substância testada foi adicionado à placa de cultura de células contendo 24 poços, incluindo o grupo controle (salina estéril). Para cada tempo determinado e específica concentração, seis poços foram disponibilizados. Um total de 726 irrigantes

testes e 66 grupos controle foi realizado. Dois mililitros da suspensão bacteriana foram misturados ao irrigante e deixados em contato nos tempos de: 10, 30 e 45 segundos; 1, 3, 5, 10, 20 e 30 minutos e 1 e 2 horas. Após cada período, 1,0 ml de cada poço foi transferida para tubos contendo 2,0ml de caldo BHI e os respectivos neutralizantes (tiossulfato 0,6%, para o NaOCl e Tween 80 0,5% + lecitina 0,07% para clorexidina) afim de impedir a ação dos irrigantes. Após o tempo específico, todos os tubos foram incubados a 37°C por sete dias. Foram considerados cultura positiva, todos os tubos com turbidez equivalente ao tubo quatro da escala de McFarland (12 x 108 UFC/ml). A pureza das colônias foi confirmada pela coloração de Gram, pela morfologia das colônias e por identificação bioquímica. Os resultados obtidos mostraram que todos os irrigantes foram efetivos em eliminar a bactéria testada, porém em tempos diferentes. A clorexidina líquida 1 e 2 % e o NaOCl foram efetivos num tempo discretamente menor (< 30 segundos) quea clorexidina líquida (0,2%) e a clorexidina gel (2%) que consumiu 30 segundos e 1 minuto, respectivamente. A clorexidina gel 0,2% destruiu células bacterianas após duas horas de contato, contra apenas 15 minutos na concentração de 1%. O NaOCl demonstrou que quanto maior sua concentração,menorfoi o tempo necessário para inibir o crescimento bacteriano. Os autores confirmaram a atividade antimicrobiana do NaOCl e da clorexidina contra o *E. faecalis*, contudo o tempo de ação dependeu da concentração do irrigante testado. Os dados obtidos forneceram à clorexidina gel, propriedades de um bom irrigante endodôntico.

Segundo Lima, Fava e Siqueira Jr. (2001), o *E. faecalis* é reconhecido como um importante agente etiológico relacionado ao fracasso dos tratamentos endodônticos. Estes autores avaliaram, *in vitro*, a eficiência da clorexidina e de algumas substâncias antibióticas na eliminação do biofilme de *E. faecalis.* A formação do biofilme foi induzida em membranas de celulose que continham 1,0 ml dos medicamentos a serem testados. Feita incubação por 24 horas a 37°C, o biofilme foi transferido para placas de ágar *Mitissalivarius* e as colônias foram contadas depois de 48 horas de incubação. Grandes diferenças entre as formulações testadas foram encontradas. A associação da clindamicina com metronidazol reduziu significantemente o número de células em um dia de biofilme. Os resultados obtidos demonstraram que entre os medicamentos

testados, somente o gel de clorexidina 2% foi capaz de eliminar o maior número de microrganismos.

Ferraz et al. (2001) avaliaram *in vitro* a ação antimicrobiana do gluconato de clorexidina utilizado como irrigante endodôntico na forma de gel 2%, comparado à forma líquida 2% e ao NaOCl 5,25%. Setenta dentes unirradiculares extraídos de humanos foram instrumentados até o ápice com lima K # 40 e submetidos à autoclavagem. Posteriormente, os espécimes foram contaminados com *E. faecalis* e coletas foram efetuadas antes e após a instrumentação dos canais. O conduto radicular foi preparado com lima Hedstrom #35 e o material coletado foi inserido em 5,0ml de BHI e a turbidez do meio foi avaliada após um período de 48 horas. Observação ao MEV do terço médio das amostras foi feita a fim de avaliar remanescentes de debris teciduais e obliteração de túbulos dentinários. Os resultados indicaram que o gel de clorexidina 2% produz uma superfície radicular limpa e que possui atividade antimicrobiana comparável às outras soluções testadas. Os autores concluíram que o gel de clorexidina 2% apresenta um bom potencial como irrigante endodôntico.

De acordo com Evans et al. (2002), a resistência do *E. faecalis* ao hidróxido de cálcio está relacionada ao fato desta espécie possuir uma bomba de prótons que reduz o pH intracitoplasmático ao projetar prótons para dentro da célula, impedindo um aumento do pH interno, o que acarretaria a morte celular. Desta forma, quando o *E. faecalis* for detectado na infecção do canal, sua erradicação pode ser de extrema dificuldade por métodos convencionais.

Almyroudi et al. (2002) utilizaram um modelo experimental com o propósito de adequar um sistema de medicamentos endodônticos comercializados e manter constante a concentração destes por um longo período de tempo. Foram obtidos cilindros com a largura de 4,0mm, a partir de dentes anteriores extraídos de humanos que tiveram suas coroas e sua porção apical seccionadas. O diâmetro interno dos canais foi padronizado com uma broca carbide de 1,4mm de diâmetro. A lama dentinária foi removida com EDTA a 15% e NaOCl a 4,4 % utilizados com ultrassom. Os espécimes foram autoclavados em caldo TSB por 30 minutos a 37°C. Um total de cinco grupos contendo oito espécimes cada, foram dispostos em tubos de vidro contendo TSB. *E. faecalis* foi inoculado nos

tubos semanalmente, durante três semanas. Após o período de incubação, os cilindros foram lavados três vezes com salina em vórtex por 30 segundos. Os espécimes foram secos com gaze estéril e acondicionados em placas de Petri de acordo com a medicação utilizada: 1 - salina estéril (controle); 2 - pasta de $Ca(OH)_2$; 3 - gel de clorexidina 1%; 4 - gel de clorexidina 1% + pasta de $Ca(OH)_2$ e 5 - Periochip (Procter & Gamble). Todos os espécimes foram mantidos em condições de umidade. Blocos com mesma medicação foram divididos em três grupos com diferentes intervalos de tempo: grupo 1 - incubados a 37°C por 72 horas; grupo 2 - incubados a 37°C por oito dias e grupo 3 - incubados a 37°C por 14 dias. A dentina foi removida com brocas usadas em uma sequência crescente de diâmetro, e posteriormente acomodadas em placas de Petri contendo 1,0ml de caldo TSB. Esta coleção de pó de dentina foi aspirada com o auxílio de uma pipeta e plaqueada em 360 placas de ágar-sangue. Após 24 horas de incubação, as UFCs foram contadas. Os dados foram submetidos à análise estatística. A maioria dos espécimes nos quatro grupos de medicação intracanal, não foi colonizada pelo *E. faecalis* após tratamento. No grupo controle o número de microrganismos foi significantemente maior do que nos grupos experimentais a cada intervalo de tempo. Não houve diferença estatisticamente significante entre os quatro grupos em nenhum intervalo de tempo ($p>0.05$), com exceção para o grupo do $Ca(OH)_2$, após 14 dias, que na profundidade de 0,2mm, apresentou maior proporção de colonização em relação aos outros grupos medicados. Os autores concluíram que o $Ca(OH)_2$ foi eficaz na eliminação do *E. faecalis* no interior de túbulos dentinários nos tempos de três e oito dias, mas falhou no tempo de 14 dias. As formulações de clorexidina utilizadas também foram eficientes para eliminar o *E. faecalis*, e houve um desempenho discretamente superior para a clorexidina gel.

Distel, Hatton, Gillespie (2002) avaliaram *in vitro* a colonização de canais radiculares por *E. faecalis* em dentes de humanos extraídos, medicados com $Ca(OH)_2$. O objetivo deste experimento foi testar a capacidade de formação de biofilme por este microorganismo e sua resistência à medicação intracanal. Um total de 46 dentes teve suas coroas removidas e foram instrumentados com lima #50 a 1mm do ápice. Brocas Gates-Glidden de números 2, 3 e 4, foram usadas para o preparo do terço coronal. Os espécimes foram montados num aparato

formado por um frasco contendo uma rolha de borracha de modo que a porção coronal da raiz ficasse inserida na rolha e cerca de 2,0mm da porção apical do dente inserido no frasco contendo BHI. As raízes foram divididas em quatro grupos: grupo 1 – quinze espécimes medicados com $Ca(OH)_2$ (Pulpdent); grupo 2 - quinze medicados com pontas #50 de $Ca(OH)_2$ pela técnica *tug back* de acordo com o fabricante; grupo 3 - oito espécimes não receberam nenhum medicamento, controle positivo (inoculação bacteriana) e grupo 4 - oito espécimes para o controle negativo (sem inoculação bacteriana). O crescimento bacteriano foi observado através da turbidez do meio. Os canais também foram observados por MEV e microscopia a laser confocal. Diferenças na expressão de proteínas foram investigadas a fim de observar se células de *E. faecalis* possivelmente originadas do biofilme radicular, expressavam os mesmos genes, ou seja, as mesmas proteínas de células planctônicas associadas ao biofilme. Para tal, as raízes foram seccionadas no seu longo eixo e preparadas para observação no MEV. Esta técnica detectou a presença de biofilmes em canais medicados com $Ca(OH)_2$ em um tempo aproximado de 77 dias. Após 60 dias, foram observados crescimento bacteriano nos grupos 1, 2 e 3. Os biofilmes formados após 86 e 160 dias de inoculação, apresentaram espessuras de 21µm e 28 - 30µm, respectivamente.

A ação antibacteriana de diferentes concentrações de NaOCl (1% e 5%) e clorexidina (0,12%, 0,5% e 1%) foi testada por Sassone et al. (2003) contra diversos microorganismos anaeróbios e facultativos, em diferentes intervalos de tempo. As bactérias facultativas avaliadas foram *E. faecalis*; *Escherichia coli (E. coli)* e *S. aureus* e as anaeróbias: *P. gingivalis* e *F. nucleatum*. Após o cultivo em condições e meio apropriado, as bactérias foram centrifugadas e lavadas por três vezes, para remoção de resíduos provenientes do meio de cultura. Uma próxima etapa incluiu o preparo de suspensão bacteriana em solução salina enriquecida com 0,1% de albumina bovina, as amostras foram diluídas e contadas a fim de se obter uma suspensão de aproximadamente 10^9 UFC/ml. O teste de inibição por contato foi utilizado neste estudo para avaliar a atividade antimicrobiana dos agentes desinfetantes, observados imediatamente após o contato com a suspensão bacteriana, e nos tempos de 5, 15 e 30 minutos. As soluções de clorexidina e NaOCl foram eficazes na eliminação do *S. aureus, F.*

nucleatum, P. gingivalis e *E. coli* em todos os intervalos de tempo testados. A solução de clorexidina a 0,12% não impediu o crescimento do *E. faecalis*, porém nas concentrações de 1% e 0,5% assim como o NaOCl nas concentrações de 1 e 5% , eliminaram todas as cepas testadas, nos diferentes períodos de tempo. Os autores concluíram que para melhores resultados de atividade antimicrobiana em relação à solução de clorexidina são obtidos com a de concentração superior a 0,12%.

Um estudo *in vitro* realizado por Gomes et al. (2002) investigou a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio em combinação com diversos veículos contra alguns microrganismos comumente isolados de infecções periapicais dos canais radiculares. Dentre estas: seis espécies facultativas e quatro espécies anaerobias Gram negativas. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em ágar de modo que cilindros de aço inoxidável foram colocados em cada meio de ágar inoculado com o respectivo microrganismo. Os medicamentos e os seus controles foram colocados no interior dos cilindros. Os halos de inibição de crescimento foram medidos e registrados após a incubação para cada placa e os resultados foram analisados estatisticamente (Teste ANOVA). Os efeitos antimicrobianos dos medicamentos foram classificados do mais potente ao mais fraco como se segue: $Ca(OH)_2$ + PMCC + glicerina ; o $Ca(OH)_2$+ PMCC; $Ca(OH)_2$ + glicerina, $Ca(OH)_2$ + anestésico , $Ca(OH)_2$ + soro fisiológico, $Ca(OH)_2$+ H_2O; $Ca(OH)_2$ + polietilenoglicol. As pastas com veículos oleosos apresentou as maiores zonas de inibição em comparação com veículos aquosos ou viscosos. Conclui-se que a o $Ca(OH)_2$ apesar de ser uma medicação intracanal recomendada apresenta sua atividade antimicrobiana e capacidade de difusão afetadas pelo tipo de veículo utilizado.

Friedman, Abitol e Lawrence (2003) avaliaram por quatro a seis anos o êxito do tratamento endodôntico realizado numa clínica de graduação universitária, onde foram estudados 450 dentes. A porcentagem de cura foi significativamente maior para dentes tratados sem periodontite apical (92%) do que com periodontite apical (74%). A porcentagem de cura geral foi de 81%, e os autores consideraram que a resistência sistêmica do paciente, a qualidade da instrumentação, obturação e restauração final também contribuíram como fatores importantes na obtenção de êxito do tratamento endodôntico.

Gomes et al. (2003) avaliaram *in vitro*, a atividade antimicrobiana do gluconato de clorexidina gel 2% e do $Ca(OH)_2$ contra o *E. faecalis*. Essas medicações intracanais foram testadas isoladamente e combinadas, em espécimes cilíndricos de dentina radicular. Um total de 180 dentes unirradiculares recém-extraídos de bovinos foram selecionados e preparados para o experimento, mantidos em hipoclorito de sódio 0,5% durante sete dias. Aproximadamente 5,0 mm da porção coronal e apical foram removidas com o propósito de se obter três cilindros de 4,0mm de comprimento. Somente o cilindro mediano foi usado para o experimento. O cemento radicular foi removido, e o diâmetro do canal foi padronizado pelo uso de brocas carbide de 2,1mm de diâmetro. Os cilindros de dentina foram acondicionados em frascos contendo 3,0ml de NaOCl e submetidos ao ultrassom durante 10 minutos. Em seguida, o mesmo procedimento foi realizado com solução de EDTA 17%. Os espécimes foram autoclavados em 3,0ml de caldo BHI, e individualmente inoculados com *E. faecalis* e incubados a 37°C, durante sete dias. A medicação intracanal foi utilizada na seguinte disposição: grupo 1 (45 espécimes – gel de clorexidina 2%); grupo 2: (45 espécimes - pasta de $Ca(OH)_2$ + polietilenoglicol na proporção 1:1); grupo 3: (45 espécimes – gel de clorexidina 2% + pasta de $Ca(OH)_2$ na proporção 1:1) e grupo 4: (45 espécimes - grupo controle - preenchidos com suspensão de caldo BHI). Durante o período de medicação intracanal, os dentes foram incubados a 37°C, avaliados no 1°, 2°, 7°, 15° e 30°dia. Após este período, os espécimes foram lavados com água destilada e secos com pontas de papel estéril. Amostras de dentina foram coletadas pelo uso sequencial de brocas com diâmetros crescentes e transferidas para pequenos frascos contendo 3,0ml de BHI + neutralizadores, para evitar a ação do medicamento. Os frascos foram incubados durante 30 dias e diariamente observou-se o crescimento bacteriano pela turbidez do meio de cultura. O gel de clorexidina 2% inibiu o crescimento do *E. faecalis* após 1, 2 , 7 e 15 dias. O $Ca(OH)_2$ foi ineficaz em todos os períodos. A combinação da clorexidina gel 2% e $Ca(OH)_2$ foi efetiva após o primeiro e segundo dias, e a ação reduzida entre o sétimo e 15° dia. Após 30 dias, todos os espécimes cresceram na presença de todos os medicamentos. Os autores sugeriram que o gel de clorexidina 2% possui maior atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* em relação ao $Ca(OH)_2$, no entanto perde sua propriedade quando usada em longos períodos.

Estrela e Holland (2003) realizaram um estudo retrospectivo baseado na revisão da literatura. Foram usados os seguintes descritores: hidróxido de cálcio; cavidade da pulpar; medicação intracanal; mineral trióxido agregado; cimento Portland. Os autores observaram a efetividade desta substância no tratamento da polpa dental, bem como seu uso como medicação curativa intracanal. Esta pesquisa concluiu que é necessário sempre que possível dar tempo para que a medicação à base de $Ca(OH)_2$ desempenhe sua ação contra os microorganismos das infecções endodônticas através da manutenção da alta concentração de íons hidroxila afim de que a atividade enzimática da bactéria seja modificada e ocorra sua inativação; o sítio de ação dos íons hidroxila envolvem as enzimas da membrana citoplasmática portanto esta medicação apresenta efeitos similares em bactérias aeróbicas, anaeróbicas, Gram-positiva e Gram-negativa e o uso do curativo a base de $Ca(OH)_2$ entre sessões, promove melhores resultados no processo de saúde periapical em relação ao tratamento em sessão única.

Pinheiro et al. (2003a) estudaram a microbiota de canais radiculares de dentes com insucesso ao tratamento endodôntico e testaram *in vitro* a suscetibilidade de cepas de *E. faecalis* a diferentes antibióticos. Foram retratados endodonticamente, 60 dentes com lesão periapical persistente. Durante o procedimento, o material obturador foi removido e realizado a coleta microbiológica dos canais radiculares. Foram utilizados meios de transporte, cultura e incubação que propiciava o crescimento de bactérias anaeróbias. Vinte e uma cepas de *E. faecalis* foram testadas quanto à suscetibilidade a agentes antimicrobianos. As cepas bacterianas também foram testadas quanto à produção de beta-lactamase utilizando nitrocefin. Microrganismos foram isolados em 51 casos. A maioria dos canais apresentava somente uma ou duas espécies bacterianas. Do total de espécies bacterianas isoladas, 57,4% eram bactérias facultativas e 83,3% Gram-positivas. O *E. faecalis* foi a espécie bacteriana mais frequentemente isolada. Bactérias anaeróbias representaram 42,6% das espécies e, entre elas, *Peptostreptococcus spp.* foram as mais isoladas. Associações significantes foram encontradas entre dor ou história de dor e infecções anaeróbias e polimicrobianas ($p<0,05$). Todas as cepas de *E. faecalis* foram sensíveis, *in vitro* às penicilinas, entretanto, a sensibilidade à amoxicilina e

à amoxicilina com ácido clavulânico foi menor que à benzilpenicilina. Suscetibilidade limitada também foi verificada com azitromicina, que foi ativa contra somente 14,2% dos isolados. Nenhuma cepa produziu beta-lactamase. Os autores observaram que a microbiota dos canais com insucesso no tratamento endodôntico é composta por um número limitado de espécies microbianas, predominantemente Gram-positivas, facultativas, especificamente *E. faecalis*, que foram os microorganismos mais comumente isolados. Infecções polimicrobianas e anaeróbios foram frequentemente encontrados em canais radiculares tratados endodonticamente com sintomatologia clínica.

Um estudo realizado por Evans et al. (2003) avaliou *in vitro* a ação antimicrobiana de uma pasta a base de $Ca(OH)_2$ e clorexidina 2%, contra *E. faecalis* presentes em túbulos dentinários de bovinos. O cemento de 24 dentes foi removido, de forma que se obteve a padronização de cilindros de dentina bovina com 7,0mm de diâmetro externo. O diâmetro interno também foi padronizado com o auxílio de brocas específicas. As coroas e os ápices dentários foram removidos a fim de se obter cilindros com 4,0mm de comprimento. Os espécimes foram agitados em ultrassom, banhados com EDTA 17% e solução de NaOCl 5,25%, para remoção da lama dentinária. Os blocos de dentina foram autoclavados, dispostos em meio de cultura (TSB) inoculado com *E.faecalis* e incubados a 35°C por cinco dias. Após este período, os espécimes foram lavados com água destilada estéril e secos com gaze estéril. Os cilindros dentinários foram individualmente colados em placas de Petri, com resina epóxica. Dois grupos, de 10 elementos cada, receberam as seguintes medicações no espaço do canal: grupo A - pasta de $Ca(OH)_2$ + água destilada estéril; grupo B - pasta de $Ca(OH)_2$ + gel de clorexidina 2%. Após um período de sete dias de incubação, a 35°C e 100% de umidade, todos os espécimes foram removidos da placa de Petri, e a pasta intracanal foi removida com 2,0ml de água destilada. Amostras dentinárias obtidas do interior do canal, por brocas com diâmetros crescentes, foram diluidas e 100µl desta solução plaqueada em placas de Agar BHI. As placas foram incubadas por 24 horas, e o número de UFCs de *E. faecalis* por miligrama de amostra de dentina do grupo A foi significantemente diferente da do grupo B. A pasta de $Ca(OH)_2$ + clorexidina 2% foi mais efetiva em reduzir *E. faecalis* nos túbulos dentinários. Esta pesquisa

demonstrou que a mistura de $Ca(OH)_2$ + clorexidina 2% apresentou eficácia antimicrobiana superior do que o $Ca(OH)_2$ usado somente.

O estudo *in vitro* realizado por Dametto et al. (2005) avaliou a atividade antimicrobiana e o efeito residual do gel de clorexidina 2% usado como irrigante endodôntico, comparado à clorexidina líquida 2% e NaOCl 5,25%. Utilizaram 80 dentes unirradiculares com ápices formados, extraídos de humanos que tiveram suas coroas removidas na junção amelocementária. Para eliminar a lama dentinária, os dentes foram submetidos ao ultrassom, banhados com EDTA 17% por 10 minutos e posteriormente com NaOCl 5,25%, por mais 10 minutos. O forame apical foi selado com resina epóxica para prevenir a infiltração bacteriana. Cada espécime foi disposto em pequenos frascos com tampas contendo 5,0ml de BHI e autoclavados a 121° C. Colônias puras de *E.faecalis* crescidas em 24 horas, foram suspensas em 5,0ml de BHI e ajustadas à escala um de McFarland. O BHI dos frascos foi substituído pelo inóculo de 5,0ml, trocados os meios a cada dois dias. Estes dentes foram incubados por sete dias a 37°C. A disposição dos espécimes foi estabelecida da seguinte forma: grupo 1 - 20 dentes irrigados com gel de clorexidina 2%; grupo 2 - 20 dentes irrigados com clorexidina 2% líquida; grupo 3 - 20 dentes irrigados com NaOCl 5,25%; controle 1 - dez dentes irrigados com água destilada e controle 2 - dez dentes irrigados com natrosol gel. Antes da etapa de instrumentação, os canais foram irrigados com 3,0ml de solução salina e secos com pontas de papel absorvente. Posteriormente, foram transferidos para frascos contendo 1,0ml de BHI estéril. O preparo dos canais foi realizado com limas tipo K mantidas a 1,0mm do ápice radicular. A cada troca de lima, os canais foram irrigados com 1,0ml do irrigante teste. Ao término da instrumentação, cada elemento recebeu 3ml do respectivo neutralizador e 3,0ml final de solução salina. Os canais foram preenchidos com 40µl de BHI estéril, selados com guta-percha e incubados a 37°C por sete dias. Os dentes foram então novamente irrigados com 3,0ml de solução salina e secos com pontas de papel absorvente que foram transferidas para frascos contendo 1,0ml de BHI estéril. As amostras foram submetidas a diluições seriadas, e alíquotas de 50 µl semeadas em Ágar sangue. As UFCs foram contadas e a pureza das colônias confirmada pela coloração de Gram, testes bioquímicos e morfologia das colônias. Os resultados demonstraram significante

redução do número de bactérias no canal radicular após a instrumentação e irrigação sem diferença significativa entre os grupos 1, 2 e 3. Os espécimes tratados com água destilada e gel de natrosol também obtiveram redução no número de microorganismos. Após sete dias da instrumentação, houve um aumento generalizado de UFCs nos espécimes tratados com água destilada, NaOCl 5,25% e gel de natrosol. Nos grupos irrigados com clorexidina na forma gel e líquida, a baixa contagem de UFCs foi mantida. Os autores concluíram que tanto a clorexidina na forma gel quanto líquida apresentaram potencial para uso como um agente antimicrobiano auxiliar durante os procedimentos biomecânicos.

Berber (2005) avaliou *in vitro* o uso de substâncias químicas auxiliares do preparo químico-mecânico (gel de clorexidina 2% e clorexidina líquida 2%, NaOCl 5,25%, 2,5% e 0,5% e soro fisiológico) e técnicas de instrumentação dos canais radiculares na redução de *E. faecalis* no canal principal e nos túbulos dentinários. Utilizaram-se 270 raízes de premolares inferiores autoclavadas que foram contaminadas por 21 dias com *E. faecalis* e divididas em 18 grupos nos quais as técnicas de instrumentação foram testadas variando o uso das substâncias químicas auxiliares. Amostras bacteriológicas do canal radicular foram coletadas antes e imediatamente após o preparo químico-mecânico e, posteriormente, cultivadas a fim de se determinar as UFCs. Após a instrumentação, as raízes foram seccionadas em três blocos: apical, médio e cervical. Amostras de dentina foram removidas sequencialmente com brocas tronco-cônicas e as raspas obtidas foram coletadas em tubos com caldo BHI, plaqueadas em ágar-sangue e incubadas por 48 horas para posterior contagem das UFCs. Na luz do canal radicular todas as substâncias, inclusive o soro fisiológico quando associados à instrumentação mecânica, promoveram uma redução de quase 100% nas coletas microbiológicas imediatamente após o preparo químico-mecânico. Nas coletas resultantes das raspas de dentina em todos os terços, técnicas e profundidades, o NaOCl 5,25% e o gel de clorexidina 2% obtiveram os melhores resultados na redução bacteriana dos túbulos dentinários seguidos do NaOCl 2,5%, clorexidina líquida 2% e NaOCl 0,5%. O autor concluiu que o NaOCl 5,25% seguido pelo gel de clorexidina 2%

juntamente com as técnicas de instrumentação utilizadas, foram efetivos na eliminação de *E. faecalis* dos túbulos dentinários e do canal radicular.

Siqueira Jr., Richer e Rôças (2006) realizaram o acompanhamento clínico e radiográfico de 100 casos de tratamento e retratamento endodôntico de dentes que apresentavam lesão perirradicular associada. Como estratégia antimicrobiana durante o tratamento foi utilizado o hipoclorito de sódio a 2,5% como solução irrigadora e a pasta contendo hidróxido de cálcio, paramonoclorofenol canforado e glicerina como medicação intracanal. Critérios radiográficos e clínicos rígidos foram aplicados para classificar os casos como sucesso estabelecido, sucesso provável e fracasso. Os resultados verificados demonstraram índice de sucesso de 74% e fracasso de 5% dos casos, enquanto que casos com aparente processo de reparo perirradicular totalizaram 21%. O baixo índice de fracasso nos casos examinados atestou a importância da utilização de uma estratégia antimicrobiana durante a execução do tratamento endodôntico.

Estrela et al. (2007) avaliaram a ação antimicrobiana da água ozonizada, do ozônio gasoso, hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina 2% em canais radiculares infectados com *E. faecalis*. Foram utilizados para esta pesquisa 30 dentes ântero-superiores de humanos, que ficaram imersos em solução de NaOCl 5% por 30 minutos para remoção de tecidos orgânicos antes do início do preparo. O terço cervical foi trabalhado com brocas Gates-Glidden números 3 e 4 e, posteriormente, os dentes foram instrumentados pela técnica *crown-down* até a lima K # 50 a 1,0ml do ápice radicular. A cada mudança de instrumento foi realizada irrigação com 3,0ml de solução de NaOCl 1%. As coroas foram removidas mantendo uma padronização de 16,0mm no comprimento destas raízes. Os espécimes foram preenchidos com EDTA 17% para remoção da lama dentinária e autoclavados. Um tubo *eppendorf* de 1,5ml foi conectado à porção coronal do dente através de resina epóxica formando um aparato para este experimento, dividido em cinco grupos: grupo 1 - água ozonizada; grupo 2 - ozônio gasoso; grupo 3 - NaOCl 2,5%; grupo 4 - digluconato de clorexidina 2%; grupo 5: controle positivo; grupo 6: controle negativo. Foram usados 5,0ml de BHI estéril com o inóculo bacteriano para contaminar os espécimes através do uso de seringas estéreis por um período de 60 dias. Para observar a ação dos

irrigantes uma mangueira de uretano foi utilizada no interior do aparato garantindo a fluidez em cada grupo experimental numa quantia de 50ml por 20 minutos. Amostras foram coletadas com pontas de papel absorvente, imersas em meio de cultura a 37°C durante 48 horas, em baixas concentrações de oxigênio, após 20 minutos e após o período de 72 horas O crescimento microbiano foi analisado pela turbidez do meio de cultura. Os resultados demonstraram que não houve efeito antimicrobiano de nenhum irrigante utilizado contra o *E. faecalis* no período de irrigação de 20 minutos e 72 horas. As bactérias se mostraram viáveis no controle positivo e não houve crescimento bacteriano no controle negativo. Os autores concluíram que a irrigação com água ozonizada; NaOCl 2,5%; clorexidina 2% e a aplicação de gás ozônio após 20 minutos, em canais radiculares de humanos infectados com *E. faecalis*, não foram eficientes para inativar este microorganismo.

Krithikadatta, Indira e Dorothykalyani (2007) avaliaram a desinfecção dos túbulos dentinários pelos diferentes medicamentos: gel de clorexidina 2%; gel de metronidazol 2%; vidro bioativo com partículas de 45µm (S53P4), e $Ca(OH)_2$. Este experimento utilizou 45 pré-molares de humanos que foram descoronados. Uma nova secção foi realizada acima do terço médio, e obtidos blocos de 6,0mm. O diâmetro externo foi padronizado através da remoção do cemento e, internamente, utilizaram Gates-Glidden #3, com o mesmo fim. Os blocos foram esterilizados individualmente em autoclave imersos em 1,0ml de TSB. As colônias isoladas de cultura pura de 24 horas do *E. faecalis* (ATCC 29212) foram cultivadas em Trypticase soy agar (TSA), posteriormente suspensas em 5,0ml de TSB, incubadas por quatro horas a 37º C e ajustadas à turbidade 0,5 da escala de McFarland. Do inóculo obtido, 50 µl foram transferidos para microtubos estéreis com 1,0ml de TSB, contendo os espécimes. Os blocos foram contaminados durante 21 dias, após este período, receberam irrigação com solução salina. Um total de cinco grupos de 15 espécimesrecebeu a medicação citada anteriormente. O grupo controle foi tratado com salina. Os espécimes foram incubados por 21 dias e após este período foram irrigados com 5,0ml de salina estéril a fim de remover o excesso de caldo de incubação. Cinco blocos foram aleatoriamente escolhidos para avaliar a profundidade de penetração do *E. faecalis* através de microscopia eletrônica de varredura. Os

grupos, com exceção do grupo 1 (controle negativo), receberam a medicação com o respectivo veículo: grupo 2 e 3 - salina estéril; grupo 4 - polietilenoglicol;grupo 5 - glicerina. Os espécimes foram selados com cera de parafina e incubados a 37°C. Realizaram a avaliação antibacteriana por cultura, ao fim de 1, 3 e 5 dias, através da coleta dos debris formados após o uso de Gates-Glidden #4 e 5 no interior dos blocos. Os resultados demonstraram: 100% de inibição após o uso de clorexidina 2%, 86,5% com metronidazol 2%, 62,8% com vidro bioativo e 58,5% para o $Ca(OH)_2$. Os autores concluíram que apesar das limitações deste estudo, o gel de clorexidina 2% foi o medicamento mais efetivo contra *E. faecalis*.

Wang et al. (2007) avaliaram a efetividade antimicrobiana da clorexidina gel 2% e o efeito antibacteriano do $Ca(OH)_2$ adicionado à clorexidina gel, usados como medicação intracanal. Foi testada *in vitro* a ação antibacteriana da clorexidina gel 2% contra o *E. faecalis*, cultivado em ágar sangue por 24 horas. Também foi testada a substância Tween 80 a 3% adicionado a L-α- lecitina a 0,3% junto à clorexidina gel 2% e à suspensão bacteriana e sua ação neutralizadora em relação à clorexidina foi confirmada e que, este agente não possui ação antimicrobiana. Participaram deste estudo, 43 pacientes, em tratamento endodôntico com diagnóstico de periodontite apical. Amostras obtidas dos canais mesiovestibular, de molares superiores; distovestibular de molares inferiores; vestibular de premolares superiores e de canal único, foram coletadas com o auxílio de pontas de papel absorvente após isolamento absoluto e rigoroso protocolo de desinfecção (S1), instrumentação rotatória Profile (Dentsply/Tulsa- Ballaigues, Suiça) + irrigação com gel de clorexidina 2% (S2), e após 14 dias com medicação intracanal de $Ca(OH)_2$ e gel de clorexidina 2% (S3). Todas as coletas foram processadas para cultura microbiológica num prazo de 24 horas. Bactérias estavam presentes em 39 das 43 amostras em S1; das 39 culturas positivas em S1, 35 foram culturas negativas. Em S3, três coletas foram perdidas e de 36 amostras obtiveram 33 culturas negativas. Os autores afirmaram que o gel de clorexidina 2% possui efetiva ação antimicrobiana no canal radicular. No entanto, sua ação como curativo intracanal não influiu na redução bacteriana.

A diversidade de veículos adicionados ao $Ca(OH)_2$ usado como medicação intracanal, levou um grupo de estudo conduzido por Murad et al. (2008) a avaliar a capacidade de tais substâncias inibirem a infiltração bacteriana entre sessões. Este estudo *in vitro* utilizou 50 caninos superiores extraídos de humanos, instrumentados com limas rotatórias GT (Dentsply/Maillefer- Ballaigues, Suiça) e irrigados com NaOCl 5,25%. Após o último instrumento os espécimes receberam irrigação com EDTA 17% por cinco minutos e NaOCl 5,25% para remoção da lama dentinária. Após a instrumentação, os dentes foram divididos em quatro grupos de dez elementos cada, conforme o veículo utilizado: grupo 1 - $Ca(OH)_2$ pro-análise (p.a) + água destilada; grupo 2- $Ca(OH)_2$ + polietilenoglicol (PG); grupo 3 - $Ca(OH)_2$ + polietilenoglicol + paramonoclorofenol canforado (PMCC) e grupo 4 - $Ca(OH)_2$ p.a + glicerina. Dos dez espécimes restantes, cinco apresentaram coroas intactas e serviram como controle negativo, e cinco (controle positivo) não receberam nenhum tipo de tratamento. Os dentes foram montados num aparato-teste composto por duas câmaras. Duas camadas de verniz foram aplicadas na superfície externa, exceto nos dois mm apicais, que se manteve em contato com meio de cultura estéril (BHI). A câmara superior do aparato foi preenchida com saliva + meio de cultura, que contatava a porção coronal dos dentes. Este sistema foi incubado a 37° C e a turbidez do meio BHI foi checado durante um período de nove semanas. Durante o experimento, as amostras receberam selamento coronário provisório. Observou-se infiltração desde o terceiro dia até o 39° dia do experimento. Não houve diferença estatisticamente significante quando comparados todos os grupos, no entanto, análise pareadas (teste de Wilcoxone de Fridman´s*)* demonstraram que o grupo 3 alcançou melhor selamento contra a infiltração bacteriana em relação ao grupo 4. De acordo com os autores, apesar dos espécimes preenchidos com $Ca(OH)_2$ + PG + PMCC apresentarem melhor selamento contra a infiltração microbiana, não houve diferença estatisticamente significante dos grupos $Ca(OH)_2$ p.a + água destilada e $Ca(OH)_2$ + polietilenoglicol.

Um estudo de Britto et al. (2009) comparou *in vitro* a redução intracanal do *E. faecalis* produzida pela instrumentação e irrigação com NaOCl/EDTA de três diferentes sistemas de irrigação: irrigação com sistema Endovac; irrigação convencional com agulhas; e irrigação convencional com agulhas seguidas de

ativação pelo dispositivo EndoActivactor. Selecionaram para este estudo, 70 dentes caninos extraídos de humanos, com comprimento entre 23 - 27mm. Os dentes foram ajustados para um comprimento de 25mm e os canais foram instrumentados até o limite apical com lima tipo K #25 e irrigados com água. Os ápices foram selados com resina epóxica para impedir a infiltração bacteriana. Os espécimes foram montados verticalmente até a região cervical, em blocos feitos de silicone para impressão e posteriormente esterilizados em autoclave. Os dentes foram inoculados com suspensão de *E. faecalis* durante um período de sete dias, com intervalos de um, dois e quatro dias. Posteriormente, foram acondicionados em caixas metálicas e incubados a 37°C com 100% de umidade. Após o período de incubação, foram usadas, nos terços médio e cervical de todos os espécimes, brocas LA Axxes #35 e posteriormente instrumentação rotatória com Protaper F3 e F4 inseridas até o CT. Um total de 66 dentes foi dividido de acordo com a técnica irrigadora, em três grupos com 20 dentes cada. O grupo 1: irrigação com NaOCl 2,5% , seguida de irrigação com EDTA 17%, com agulha NaviTip 30 Gauge; grupo 2: irrigação com EDTA 17% junto a sonicação desta solução com sistema EndoActivator e grupo 3: irrigação com NaOCl 2,5% / EDTA 17% pelo sistema Endovac. Para a coleta foi utilizado 1,0ml de solução salina e instrumentação com uma lima Hedström #40 transferida para tubos contendo solução salina a 0,85%. Todas as amostras foram agitadas em vórtex por um minuto. A etapa de diluição seriada foi realizada e alíquotas de 0,1ml foram semeadas em placas de ágar mitis-salivarius e incubadas a 37°C por 48 horas. As UFCs formadas foram contadas, baseadas nos fatores de diluição conhecidos. Os resultados foram submetidos a análises estatísticas: teste *D´Agostino e Pearson Omnibus*, para revelar a distribuição para todos os grupos; *T-Student* para comparar a infecção inicial entre grupos, e o teste *Mann-Whitney* realizado para análise intragrupo (redução de S1 para S2). As paredes dos canais radiculares de todos os espécimes analisados pelo MEV foram densamente colonizadas pelo *E. faecalis*. O método experimental de contaminação promoveu uma base confiável da carga bacteriana. Todos os grupos experimentais com os irrigantes NaOCl/EDTA se mostraram significantemente mais efetivos do que o grupo controle positivo na redução do *E. faecalis*. Entretanto, diferenças não significantes foram observadas entre grupos experimentais. Todos os espécimes do grupo controle

produziram culturas positivas em S2. Os autores concluíram que os três protocolos de irrigação foram equivalentes na redução do *E. faecalis* colonizados nos canais radiculares.

Denotti et al. (2009) avaliaram *in vitro* a cinética de aderência do *E. faecalis* e atividade antimicrobiana de três diferentes medicamentos usados na Endodontia: 1 - CPD, medicamento obtido da mistura de diferentes componentes ativos: hidróxido de cálcio, pasta de iodofórmio paramonoclorofenol, cânfora, mentol e Trey Zinc (Dentsply-Ballaigues, Suiça); 2 - Endoidrox (a base de hidróxido de cálcio) e 3 - PCS (Kerr – Atlanta, EUA) princípio ativo é o óxido de zinco e eugenol (Kerr – Atlanta, EUA). Cada medicamento foi manipulado de acordo com o fabricante e 0,25mg de cada um foi usado. Para este experimento utilizaram um sistema de agitação que impediu adesão bacteriana simulando a fluidez salivar nas superfícies das pastas testadas. Bactérias foram cultivadas em ágar Muller-Hinton. A suspensão bacteriana foi preparada para obter a concentração com turbidez equivalente ao número três da escala de McFarland. Esta mesma suspensão foi usada para obter o DNA padrão para a curva de quantificação do PCR *real time* (q-PCR). As coletas foram realizadas por 10 dias e as células viáveis foram contadas por contagem de placa e o índice de adesão avaliado após a extração de DNA através da quantificação pelo q-PCR. Após 48 horas o método de difusão Kirby-Bauer foi realizado e os componentes utilizados não apresentaram atividade antimicrobiana para a cepa de *E. faecalis* testada. Os resultados da cultura e do método molecular, demonstraram que os componentes que continham $Ca(OH)_2$ apresentaram-se mais efetivos contra o crescimento bacteriano e contra a formação de biofilme. Os autores apoiaram a teoria de que o *E. faecalis* apresenta a habilidade de sobrevivência nos componentes testados. Entretanto, puderam observar, que componentes a base de $Ca(OH)_2$ podem ser ativos contra a progressão do biofilme durante um curto período de tempo (2 - 4 dias).

O estudo realizado por Delgado et al. (2010) permitiu avaliar a eficácia do hidróxido de cálcio e da clorexidina gel 2% na eliminação do *E. faecalis* em túbulos dentinários contaminados artificialmente por este microorganismo durante 21 dias, incubados em condições de aerobiose a uma temperatura de 37°C. Neste experimento foram usados 60 dentes unirradiculares de humanos

divididos em 4 grupos de 15 elementos cada, de acordo com a medicação utilizada: $Ca(OH)_2$; clorexidina gel 2%; $Ca(OH)_2$ + clorexidina gel 2 % e solução salina estéril, no grupo controle negativo. As coroas e a porção apical das raízes foram removidas de modo a padronizar um comprimento de 8,0mm para todas as amostras e foram estocados em salina até o início do experimento. O curativo foi aplicado por uma seringa até observar o extravasamento do material e o excesso deste foi removido. Os orifícios apical e coronal foram selados com restaurador provisório (Cimpat – Septodont, Saint-Maur-de- Fossés, França). Os espécimes foram incubados a 37°C por 14 dias. Após o período de incubação, o curativo foi removido com o uso de solução salina e uma solução neutralizadora específica para cada agente antimicrobiano. Brocas Gates-Glidden #5 e #6 foram usadas três vezes no interior do canal a fim de formar raspas de dentina que foram transferidas para microtubos contendo 1,0ml de caldo BHI e centrifugadas por um minuto. Alíquotas de 25µl foram semeadas em ágar-sangue BHI e incubadas por 48 horas a 37°C. Foi realizada a contagem de UFCs e confirmação da pureza das colônias pela coloração de Gram e morfologia das colônias. A suspensão contendo raspas de dentina foi preparada para análise em microscopia de fluorescência. Os resultados obtidos demonstraram que a solução salina não influenciou a viabilidade do *E. faecalis* no interior dos túbulos dentinários. O uso de $Ca(OH)_2$ e clorexidina 2% reduziu o número de UFCs comparado com o grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significante entre o número de UFCs no uso de clorexidina com ou sem $Ca(OH)_2$. A avaliação pela microscopia de fluorescência detectou diferença estatisticamente significante na ação antimicrobiana da clorexidina comparada a do $Ca(OH)_2$, mas não houve diferença estatisticamente significante entre o uso da clorexidina usada com ou sem o $Ca(OH)_2$. Estes autores concluíram que a clorexidina e o $Ca(OH)_2$ foram efetivos contra o *E. faecalis*. O uso do $Ca(OH)_2$ foi menos efetivo que a clorexidina, e a viabilidade do *E. faecalis* foi observada após 14 dias nos canais que receberam esta medicação. Os autores destacaram que a persistência deste patógeno no interior dos canais radiculares, deve-se à sua permanência em estado viável, mas não cultivável.

Freire et al. (2010) avaliaram o pH do gel de clorexidina 2% e do $Ca(OH)_2$, usados isoladamente ou combinados, bem como a influência da dentina no pH

destas substâncias. Dez incisivos de bovinos foram autoclavados a 121°C por 15 minutos e, posteriormente, foram cortados perpendicularmente ao seu longo eixo, na junção amelocementária. Pó de dentina foi obtido com o uso de brocas esféricas # 4 em baixa rotação no interior do canal radicular sem o uso de refrigeração. A coleta foi estocada em frascos plásticos. As medicações foram preparadas em placas de vidro e o pH foi determinado em 1,0ml de cada uma delas. O pó dentinário foi acrescentado em 1,8% do volume total de cada medicação. As misturas foram acondicionadas em frascos em triplicatas e divididas em seis diferentes grupos: grupo 1: gel de clorexidina 2%; grupo 1D: gel de clorexidina 2% + pó de dentina; grupo 2: gel de clorexidina 2% + $Ca(OH)_2$ P.A.; grupo 2D: gel de clorexidina 2% + $Ca(OH)_2$ P.A.+ pó de dentina; grupo 3: $Ca(OH)_2$ + propilenoglicol e grupo 3D: $Ca(OH)_2$ + propilenoglicol + pó de dentina. Um peagâmetro foi usado para as medições em diferentes intervalos de tempo: imediatamente após o preparo, um, sete, 14 e 21 dias. Os resultados obtidos demonstraram que o pH do gel de clorexidina 2% associado ou não ao $Ca(OH)_2$ foi significantemente modificado pela presença da dentina. Observaram que o pH do $Ca(OH)_2$ associado à clorexidina permaneceu alto mesmo na presença do pó de dentina, portanto sua habilidade de dissociação em íons hidroxila foi mantida.

Retamozzo et al. (2010) realizaram um estudo a fim de determinar a concentração do hipoclorito de sódio e o tempo necessário para este irrigante desinfetar cilindros de dentina infectada com *E. faecalis*. Foram usados quatrocentos e cinquenta cilindros de dentina (5 mm de diâmetro e 4 mm de altura) com um lúmen (2-3 mm de largura) preparados a partir de incisivos extraídos de bovinos submetidos à remoção do cemento e da pré-dentina. Os túbulos foram expostosdurantequatro minutos ao ácido etilenodiaminotetracético17% e ao hipoclorito de sódio 5,25% e em seguida, expostos ao *E. faecalis* (ATCC 4082) por um período de 3 semanas em caldo BHI. Os cilindros foram então divididos em três grupos, nas concentrações de NaOCl:1,3%, 2,5%, ou 5,25% e nos tempos de 5 , 10 , 15 , 20 , 25 , 30 , 35 , e 40 minutos com intervalos de um minuto para um total de 30 sub-grupos, incluindo os controles positivo e negativo. Cada amostra foi inseridano interior de um tubo de 2,0ml de caldo de BHI e incubadas durante 72 horas.Ausência de

turvação indicou nenhum crescimento bacteriano, enquanto que a turbidez indicou a presença de bactérias viáveis .O regime de irrigação mais eficaz foi de 5,25% aos 40 minutos, visto que a irrigação com 1,3% e 2,5% de hipoclorito de sódio durante este mesmo intervalo de tempo foi ineficaz na remoção de *E. faecalis* de cilindros dentina infectada. Os autores concluiram que a alta concentração e longa exposição a hipoclorito de sódio são necessários para a eliminação de *E. Faecalis* na dentina contaminada

Mohammadi, Giardino e Mombeinipour (2012) avaliaram a ação residual de três diferentes substâncias no interior de canais radiculares de incisivos de bovinos infectados durante 14 dias com *E. faecalis*. Os espécimes foram descoronados e tiveram o cemento removido com o uso de lixas. As amostras foram padronizadas em blocos de 4,0mm e, posteriormente,autoclavadas. Após o período de infecção, todos os espécimes foram divididos em cinco grupos, conforme a solução irrigadora: grupo 1 - Tetraclean (Ogna Laboratório e Farmacêutica, Muggio - Itália) (30 amostras); grupo 2 – MTAD (irrigante endodôntico composto por doxicilina + ácido cítrico + Tween 80) (Dentsply, Tulsa- USA) (30 amostras); grupo 3 - NaOCl 5,25% (30 amostras); grupo 4 - controle positivo (10 amostras) e grupo 5 - controle negativo (10 amostras). Os condutos receberam um total de 3,0ml de solução irrigadora e, após um período de 10 minutos, foram secos com pontas de papel absorvente. As amostras foram coletadas com o uso sequencial de brocas de baixa rotação no lúmen dos espécimes em diferentes intervalos de tempo (0, 7, 14, 21, e 24 dias). Cada amostra coletada foi transferida para tubos contendo 3,0ml de BHI e, em seguida, processada a cultura. Os dados obtidos demonstraram uma mínima presença de UFCs nos grupos experimentais após o tratamento. O grupo controle positivo apresentou bactérias viáveis em todo o experimento e o controle negativo não apresentou bactéria viável em nenhum momento. Puderam concluir que a substantividade do Tetraclean foi significantemente maior do que o MTAD e mantida nos túbulos dentinários por até 28 dias. O NaOCl 5,25% apresentou uma mínima substantividade neste estudo.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* a susceptibilidade do *E. faecalis* à ação de substâncias utilizadas durante a terapia endodôntica, como agentes irrigantes e medicação curativa intracanal.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) detectar por métodos de cultivo, a susceptibilidade do *E. faecalis* ao hipoclorito de sódio 5,25%, usado como solução irrigadora, e à medicação curativa intracanal à base de hidróxido de cálcio e ao gel de clorexidina 2%;

b) comparar a efetividade entre as duas diferentes medicações intracanal utilizadas neste experimento, após 14 dias de medicação;

c) avaliar a efetividade das medicações curativas no controle da recontaminação do canal principal e dos túbulos dentinários por este microrganismo, após um período de sete dias; e

d) observar ao microscópio eletrônico de varredura a contaminação do canal principal e dos túbulos dentinários pelo *E. faecalis*, após o período de 14 dias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foram selecionados 36 molares inferiores extraídos de humanos, obtidos do banco de dentes da USP (Universidade de São Paulo) submetidos ao seguinte critério de inclusão: três canais, com os ápices completamente formados e comprimento radicular compreendido entre 14 e 16mm, mensurados com o auxílio de uma régua endodôntica, da margem cervical (junção amelocementária) ao ápice radicular. Os fatores de exclusão foram: presença de calcificações, de reabsorções radiculares e o quarto canal. Após uma monoinfecção *in vitro* por *E. faecalis* (ATCC 29212), os espécimes foram trabalhados com instrumentos endodônticos rotatórios ProTaper Universal (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suiça) e amostras microbiológicas foram obtidas e processadas no Laboratório de Resistência Bacteriana (RESBAC) do Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Espírito Santo. Foram preparados, dois espécimes para observação do biofilme ao MEV. Os procedimentos de cultura microbiológica foram realizados de acordo com os procedimentos operacionais padrão do laboratório supracitado e, realizados pelo mesmo pesquisador após treinamento e realização do estudo piloto. Nesta etapa pôde-se adequar o protocolo para esta pesquisa.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFES (protocolo de aprovação n°: 290/10).

4.2 MÉTODOS

Seleção e preparo das amostras

Os dentes molares inferiores foram previamente armazenados em solução salina 0,85% e antes de sua manipulação foram mantidos por 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5%. Os cálculos dentários presentes foram removidos com curetas periodontais e o tecido cariado removido, com o auxílio de escavadores de dentina n°5 (Duflex, SS-White - RJ, Brasil) e brocas de aço

esféricas para contra-ângulo. Inicialmente, realizou-se a abertura coronária com brocas esféricas diamantadas (KG Soresen Ind. Com. Ltda, RJ, Brasil) e brocas Endo Z (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suiça). As coroas dentárias foram removidas próximo à junção amelocementária com disco diamantado n° 7020 (KG Sorensen Ind. Com. Ltda, Brasil) adaptado para peça de mão. Uma lima tipo K # 10 (Dentsply, Maillefer; Ballaigues, Suíça) foi inserida no interior de cada canal, e observou-se com o auxílio de uma lupa, a saída de sua ponta através do forame apical. Da medida obtida subtraiu-se 0,5mm para estabelecer o comprimento de trabalho (CT). Os espécimes foram instrumentados com limas tipo K #10 e #15 (Dentsply, Maillefer- Ballaigues,Suiça) até o comprimento de trabalho e irrigados com solução salina. Posteriormente, foram irrigados com EDTA 17% (Biodinâmica produtos, Brasil) e a remoção desta solução, realizada com hipoclorito de sódio 5,25% (Pharmic farmacêutica, Vitória, Brasil). Foi executada a lavagem dos dentes com solução salina a 0,85% e, logo após, estes foram acondicionados em frascos de vidro com tampa, com quatro elementos cada, contendo aproximadamente 10ml de TSB (Himedia laboratories, Mumbai, Índia) e submetidos à agitação ultrassônica durante um minuto, para favorecer a penetração do meio de cultura. Após esta etapa, os espécimes foram removidos e esterilizados em autoclave a 121°C à pressão de 1atm, durante 20 minutos. A prova de esterilidade foi confirmada após 24 horas de incubação destes espécimes em estufa a 37°C, pela ausência de turbidez.

Cultivo do *E. faecalis* econtaminação das amostras

O microorganismo testado neste experimento foi obtido a partir da American Type Culture Collection (ATCC 29212) e esta cepa microbiana foi estocada em criotubos que continham meio líquido BHI com glicerol a 20%. Deste estoque, foi realizado o repique bacteriano em placas de ágar-sangue com 5% de sangue de cavalo (Blood ágar base - Himedia laboratories, Mumbai, Índia) pela técnica de esgotamento, incubadas por 24 horas em estufa a 37°C em condições de aerobiose. Desta placa, duas a três colônias crescidas isoladamente foram inoculadas em tubos de vidro fechados com 1,0ml de caldo TSB estéril e novamente mantidos em estufa a 37°C por 24 horas. Esta suspensão bacteriana foi transferida para um novo tubo contendo 5,0ml de TSB. Desta nova

suspensão 1,0ml foi utilizado para inocular um frasco de vidro estéril com capacidade de 500ml com tampa rosqueável contendo 200ml de TSB estéril. Os espécimes foram imersos nesta solução, e mantidos em incubação (CERTOMATBS-T®, B.Brown biotech international - Buckinghamshire, Inglaterra) sob suave agitação (60 rotações/minuto, Figura 1) durante 14 dias, a uma temperatura de 37°C (BRITO et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2010). Após sete dias o meio de cultura foi renovado seguindo o mesmo procedimento inicial de inóculo. Para permitir o adequado preparo em um mesmo dia, cada frasco recebeu quatro dentes para contaminação (Figuras 1, 2, 3 e 4).

Figura 1 – Imagem da incubadora (Certomat®)

Figura 2 – Imagem do frasco contendo os espécimes no interior da incubadora

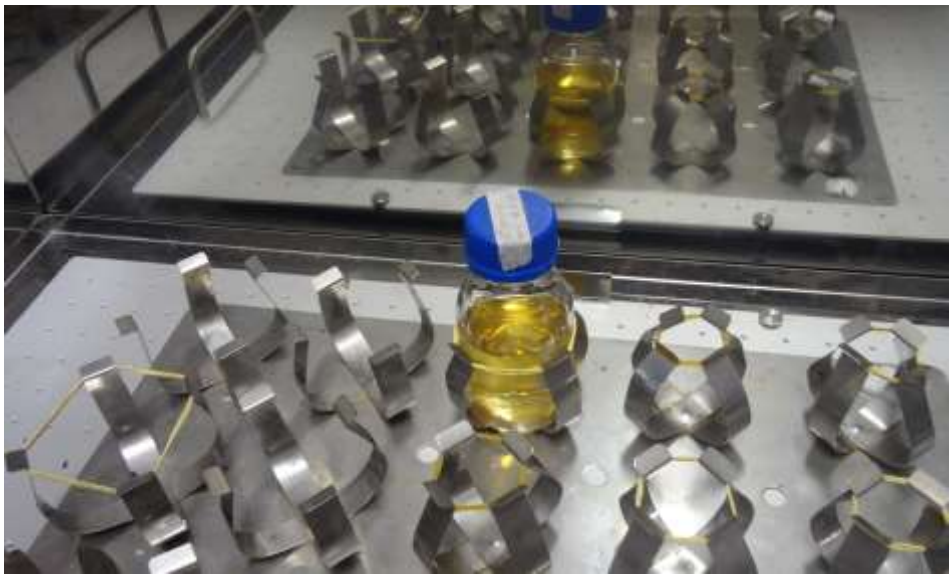


Figura 3 – Imagem no interior da câmara de fluxo laminar da etapa de contaminação dos espécimes

Figura 4 – Frasco contendo 200ml de TSB e os espécimes

Confirmação da presença do *E.faecalis*

Previamente ao inicio deste experimentoe após o período de inoculação dos espécimes, foram aplicados testes a fim de confirmar e identificar a cepa *do E. faecalis*e garantir a inexistência de outros contaminantes. Foram realizados os seguintes procedimentos:

Análise da morfologia das colônias

Amostras de cada recipiente contendo caldo inoculado com o *E. faecalis*foram semeadas em placas de ágar-sangue, e armazenadas a 37°C por 24 horas para verificar o crescimento bacteriano por meio da análise da morfologia colonial.

Análise da morfologia celular

A partir das amostras cultivadas nas placas de ágar-sangue, foram confeccionados esfregaços em lâminas de vidro, submetidos à coloração de Gram para identificação das características morfo- tintoriais desta bactéria. As lâminas foram observadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse- E200, Tóquio, Japão).

Prova da Bile-Esculina

Foram coletadas amostras das colônias crescidas no ágar-sangue e posteriormente semeadas no meio de Bile-Esculina (Himedia laboratories-Mumbai, India). O meio foi previamente submetido ao teste de esterilidade e armazenado a 37° C por 24 horas. Este meio deve ser acondicionado em tubos de vidro com tampa rosqueável, e precisa ser mantido em posição inclinada para solidificação do mesmo. Após este período, o aspecto enegrecido do meio, confirma a positividade para este teste (hidrólise de esculina), característica bioquímica do *E.faecalis.*

Teste da catalase

Uma alça bacteriológica descartável (Techno plastic products, Trasadingen, Suiça) foi utilizada para coletar uma colônia crescida em placa de ágar–nutriente (Himédia laboratories - Mumbai, India)e realizar um esfregaço em uma lâmina de vidro. Uma gota de peróxido de hidrogênio 3%(v/v) foi depositada sobre esfregaço. Observa-se a ocorrência de formação de bolhas pelo oxigênio molecular liberado na reação da catalase. Em nossos testes, não houve a formação de bolhas, confirmando a negatividade para catalase (catalase negativa) característica do *E. faecalis*, que não apresenta esta enzima.

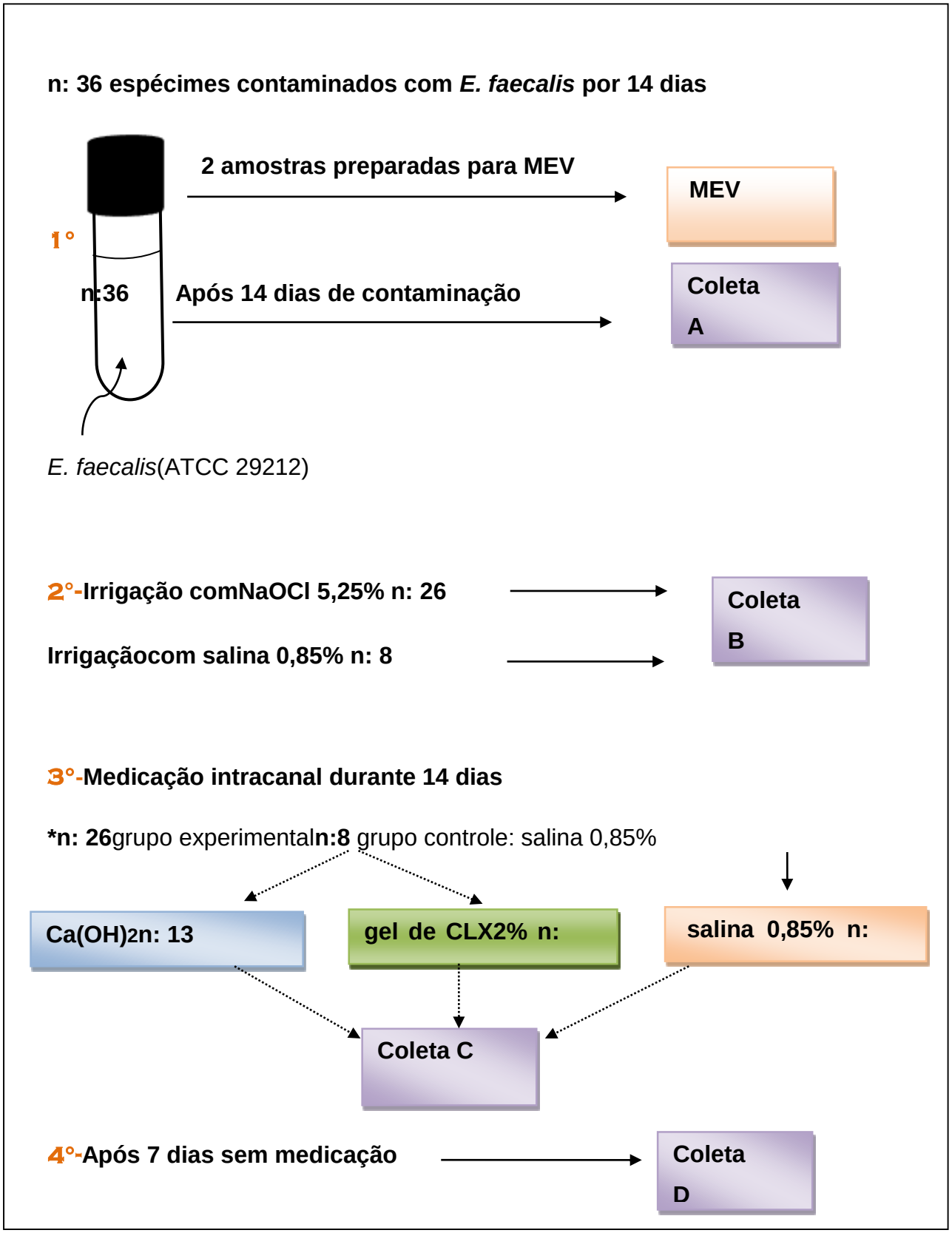
Procedimento de coleta microbiológica

As coletas foram realizadas após o uso do neutralizador pertinente a cada grupo com o auxílio de um cone de papel absorvente estéril FM (META BIOMED Co,LTD.) inserido o mais apical possível no interior de cada canal (MV,ml e D) por 1 minuto. Os três cones foram transferidos para um microtubo com capacidade de 1,5ml , contendo 400 µl de água ultra-pura (Milli-Q) e agitados em vórtex ,em três tempos de 30 segundos. Ao fim da agitação os cones foram descartados. Deste conteúdo foram utilizados 100 µl para o procedimento de diluição seriada, e 300µl estocados em *freezer*, para testes futuros. As etapas de coletas e seus intervalos de tempo estão descritos na Figura 5.

Quantificação de E. faecalis nos canais radiculares - coleta A

Após um período de contaminação de 14 dias, realizou-se a coleta A.Previamente à coleta, os dentes foram retirados do meiode cultura e o excesso do meio foi removido com uma gaze estéril. O ápice radicular foi selado com cianocrilato (Superbonder®, Henkel Loctite, Belo Horizonte, Brasil). Os remanescentes dentários foram irrigados com solução salina a 0,85% de modo a preencher todo o canal radicular, com o auxilio de uma seringa descartável de 5,0ml (Injecta produtos, São Paulo, Brasil)e agullha 30 G (Injecta produtos) estéreis e, posteriormente, foram utilizados cones de papel para processar a coleta. A partir desta etapa todos os procedimentos foram realizados na câmara de fluxo laminar, com uso de luva estéril.

Figura 5 – Esquema representativo das quatro etapas de coleta A, B, C e D



Preparo químico-mecânico

Cada elemento dental foi preparado com instrumentos rotatórios de níquel-titânio do sistema ProTaper Universal (Dentsply - Ballaigues, Suíça), representados na Figura 6.A sequência operatória seguiu a recomendação do fabricante (Quadro 1). Os instrumentos foram acionados por um motor elétrico (Easy Endo Slim, Easy, Belo Horizonte, Brasil) com velocidade e torque controlados de acordo com o fabricante. Cada instrumento rotatório foi utilizado por cinco vezes, e descartados posteriormente. Durante o preparo, os canais foram irrigados com 1,0ml de solução de NaOCl 5,25% (Pharmic farmacêutica, Vitória, Brasil) a cada troca de instrumento com o auxílio de seringa descartável de 5,0ml (Injecta produtos).

Quadro 1 – Detalhes da sequência de instrumentação do sistema Protaper Universal

Sistema ProTaper Universal		
Numeração	**Conicidade**	**Comprimento de trabalho**
S1	Variável	1/3 coronário
S2	Variável	1/3 - 2/3 coronário
SX	Variável	2/3 coronário
F1	Variável	Compr. total de trabalho
F2	Variável	Compr. total de trabalho
F3	Variável	Compr. total de trabalho

Figura 6 – Imagem dos instrumentos ProTaper Universal na sequência súpero- inferior: S1; S2; SX;F1; F2 e F3. (CÂMARA, 2008).

Susceptibilidade ao NaOCl 5,25% usado como solução irrigadora – coleta B

Imediatamente após a intrumentação, foi realizada a coleta B. Os 26 espécimes submetidos a este procedimento foram preenchidos com solução de tiossulfato de sódio a 10% com volume suficiente para preencher todo o canal, a fim de se obter a inativação do NaOCl. Esta substância permaneceu no canal por 2 minutos. Cones de papel absorvente estéreis foram utilizados para o procedimento de coleta.

Grupo controle

O grupo controle, num total de oito espécimes, foi submetido aos mesmos procedimentos de coletas, no entanto, em todas as fases utilizou-se solução salina 0,85% estéril, no interior dos canais.

Confecção do aparato-teste

Realizada a coleta B, confecionou-se um dispositivo para cada espécime, a fim de suportar os remanescentes radiculares durante o período deste experimento e fornecer condições nutricionais para o microorganismo testado. Este dispositivo-teste foi adaptado em cada amostra dental. Para a confecção, frascos de antibióticos foram utilizados e uma tampa de borracha foi adaptada na embocadura dos mesmos e selada com cianocrilato para evitar contaminação externa. Com uma lâmina de bisturi n° 15 C (Lamedid produtos S.A) realizou-se um orifício na tampa conforme o diâmetro dos espécimes e assim promover a adaptação dos mesmos. Cada frasco foi identificado com esmalte cosmético colorido (Colorama esmaltes, Brasil) para identificar o espécime. Este dispositivo foi preenchido com 10ml de caldo TSB, volume suficiente para que 2/3 das raízes ficassem imersos (Figuras 7, 8 e 9). Estes frascos, contendo TSB, foram submetidos à autoclavagem. Cada espécime foi seco com uma gaze estéril, e adaptado no respectivo aparato com leve pressão digital. A porção cervical do elemento dental em contato com a tampa de borracha foi selada com Superbonder®. Após esta etapa o conduto radicular foi seco com pontas de

papel absorvente tamanho FM (META BIOMED CO.LTD.) a fim de receber a medicação curativa (etapas 4.2.7.1 e 4.2.7.2).

Figura 7 – Imagem do frasco de vidro utilizado para confecção do dispositivo - teste.

Figura 8 – Dispositivo - teste

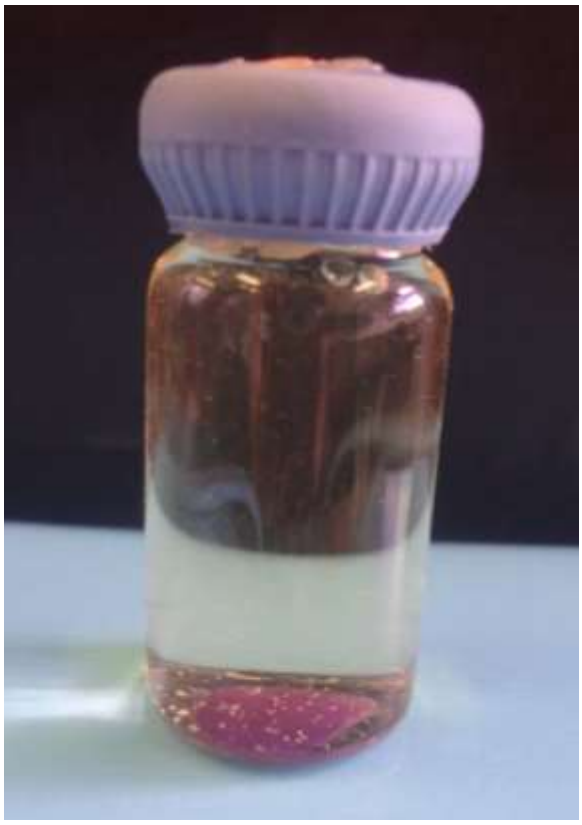


Figura 9– Etapa de selamento do dispositivo com Superbonder®

Medicação curativa

O grupo experimental foi subdividido em dois grupos de 13 elementos cada conforme as diferentes medicações testadas: grupo 1 - gel de clorexidina 2%, manipulada (Pharmic farmacêutica, Espírito Santo, Brasil) e grupo 2 - pasta à base de $Ca(OH)_2$, (Pharmic farmacêutica, Espírito Santo, Brasil) cuja composição encontra-se descrita no Quadro 2. Os canais foram secos com pontas de papel absorvente estéreis, e posteriormente, preenchidos de acordo com a respectiva medicação. O gel de clorexidina 2% foi acondicionado em uma seringa dosadora com agulha de 30 G descartável e estéril adaptada em sua extremidade.A ponta da agulha foi inserida no interior do canal até observar seu

preenchimento. Uma broca lentulo n° 35 (Dentsply, Maillefer- Suiça) foi acionada no interior de cada canal para auxiliar a inserção do medicamento, e permitir uma melhor distribuição do gel. O excesso do gel foi removido com uma bolinha de algodão estéril. A pasta à base de $Ca(OH)_2$foi aplicada com o auxílio de uma espátula n° 1 (Duflex- SSWhite) e inserida no interior dos canais com uma broca lentulo (Dentsply, Maillefer, Suiça) girando no sentido horário, em baixa rotação. Após o preenchimento de todo o canal com a medicação curativa, utilizou-se uma bolinha de algodão estéril para selar a cavidade. A partir desta etapa, o espécime foi mantidoaté o final do experimento, em estufa a 37°C, no interior de um tubo plástico Falcon® (50ml) previamente esterilizado (Figura 10).

Quadro 2 – Fórmula da pasta à base de $Ca(OH)_2$

Fórmula de composição da pasta de hidróxido de cálcio
Hidróxido de cálcio..... 49,77 g%
Glicerina..... 100,00 g%
Excipientes: Óxido de zinco e PEG 400 ---- qsp 30g

Figura 10 – Imagem dos espécimes durante o período de medicação intracanal

Remoção da medicação curativa - coleta C

Após 14 dias, uma terceira coleta foi realizada (coleta C). Para realização desta etapa, o grupo 1, medicado com gel de clorexidina 2% foi irrigado com Tween 80 a 3% +Lecitina 0,3%(Pharmic farmacêutica) que permaneceu no interior dos canais por um período de 2 minutos com o objetivo de inativar o gel de clorexidina. Cones de papel absorvente tamanho FM foram utilizados em cada canal e obteve-se a coleta C. Para o grupo 2, realizou-se irrigação com 1,0ml de ácido cítrico 0,5%para promover a inativação da pasta à base de $Ca(OH)_2$. Este substância permaneceu no interior do canal por 2 minutos, após este período foi realizada a coleta.Uma vez removida a medicação curativa dos dois grupos, os canais foram secos, selados com uma bolinha de algodão estéril e as mesmas condições descritas anteriormente foram mantidas.

Após sete dias sem a medicação intracanal – coleta D

A ação residual dos medicamentos: clorexidina gel 2% e pasta à base de $Ca(OH)_2$foi avaliada após um período de sete dias,sem a presença destas medicações intracanal. Todos os espécimes foram preenchidos com solução salina estéril a 0,85%, com volume suficiente para preencher o canal, e a quarta amostra foi obtida (coleta D).

Avaliação quantitativa

Realizou-se a avaliação quantitativa através de diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-6}e alíquotas de 100µl foram semeadas em placas de Petri descartáveis de 90 x 150mm (Techno plastic products - Trasadingen, Suiça) de ágar-nutriente (Himedia laboratories-Mumbai, India). Posteriormente, foram incubadas a 37°C por 24 horas em condições de aerobiose. Após o período de incubação foi observado o crescimento bacteriano e as características morfológicas típicas das colônias em estudo, realizando-se a contagem de colônias (UFCs). Os valores obtidos foram multiplicados por 0,4 para adequação à quantia de 1,0ml.

Análise por microscopia eletrônica de varredura

Após o período de inoculação bacteriana, dois espécimes foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura para confirmação da contaminação bacteriana e visualização do biofilme. As raízes foram sulcadas no seu longo eixo com um disco diamantado n° 7020 (KG Sorensen- Ind.Com. Ltda, Brasil) e clivadas com o auxílio de um alicate ortodôntico. Quatro hemipartes foram lavadas em Phosphate Buffered Saline (PBS) para remoção do meio de cultura, fixadas em glutaraldeido a 25% em tampão cacodilato 0,1M e mantidos à temperatura ambiente por 2 horas. Os espécimes foram lavados com tampão cacodilato 0,1M em pH = 7,2 por três vezes de 10 minutos cada e pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1 % em tampão cacodilato 0,1M adicionado ao ferrocianeto de potássioa 1,25%. Esta etapa foi realizada na capela devido à alta toxicidade do OsO_4. Os espécimes permaneceram na capela por 30 minutos e após esta etapa foram lavados em tampão cacodilato 0,1M e duas vezes em água ultra-pura (Milli-Q) durante um período de dez minutos para cada solução. Realizou-se a desidratação crescente em álcool etílico: 30%; 50%; 70%; 90% e 100% por um período de 10 minutos para cada concentração. Em seguida, foi realizada a secagem pelo ponto crítico. Após esta etapa, os espécimes foram submetidos à metalização em ouro e análise ao MEV (JEOL, Akishima, Japão) com aumento de 10.000 X.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para melhor obtenção dos resultados, os valores adquiridos nas diversas etapas desta pesquisa foram transformados em log_{10}. As médiasobtidas a partir das medicações utilizadas em diversos momentos da pesquisa foram analisadas estatisticamente.

Para análise descritiva dos dados obtidos, foram calculados: a média aritmética, o desvio padrão, os valores máximo e mínimo. Com o objetivo de demonstrar o quantitativo de bactérias encontradas em cada unidade amostral, após o período de contaminação de 14 dias, foi confeccionado o gráfico de dispersão (Gráfico 1).

O teste Shapiro-wilk é um teste de normalidade, e neste estudo, foi utilizado para averiguar a existência de distribuição normal dos dados obtidos após o período de contaminação dos espécimes. Os resultados não demonstraram uma distribuição normal dos valores encontrados, portanto, foram utilizados os testes não paramétricos: a. TesteKruskal-Wallis; b. Teste Mann-Whitney e c. Teste de Tukey.

O teste de Mann-Whitney é um teste utilizado para comparar diferenças entre duas amostras independentes, quando estas não estão normalmente distribuídas. Utilizamos este teste para avaliar estatisticamente os grupos: experimental e controle, quanto ao agente irrigante usado.

O testeKruskal-Wallis é uma alternativa não paramétrica utilizada para comparar várias amostras independentes. Trata-se de uma análise de variância, que emprega posiçõesem lugar de mensurações como critério de avaliação,onde os dados são ordinais, de maneira que sejam atribuídas posições. Para este teste o tamanho mínimo de cada amostra, deve ser seis.Neste estudo foi utilizado para comparar os valores obtidos entre os grupos tratados com solução salina 0,85%, gel de clorexidina 2% e $Ca(OH)_2$ nas coletas C e D.

O teste de Tukey é utilizado para comparação de médias onde existe mais de dois tipos de tratamento. Utilizamos este teste a fim de detectar se houve diferença entre os grupos tratados com gel de clorexidina 2% e $Ca(OH)_2$ nas coletas C.

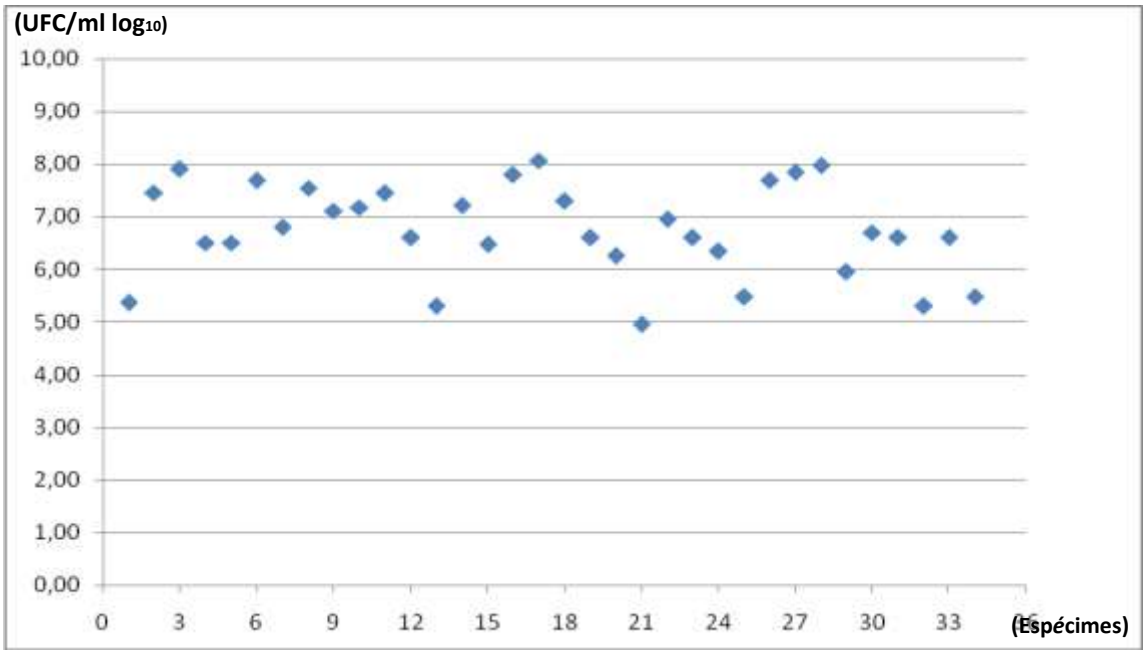
O nível de significância de 5% foi usado para todos os testes. Para realização das análises foi utilizado os seguintes softwares: Excel 2010, SPSS 11.5 for Windows.

5 RESULTADOS

Os procedimentos de coleta foram realizados em quatro etapas, e caracterizados como coletas A, B, C e D. Decorridos os 14 dias de contaminação foi realizada a primeira coleta dos espécimes (coleta A). A normalidade dos dados referente à contaminação dos 36 espécimes pelo *E. faecalis* foi avaliada pelo testeshapiro-wilk, visando observar se os valores estão dentro de uma distribuição normal. Os valores encontrados sugeriram que houve uma distribuição normal (p-valor= 0,0789).

Pôde-se constatar que o processo de contaminação foi homogêneo com valores variando entre 4,95 e 8,06 UFC/ml. Os resultados desta etapa estão apresentados no Gráfico1 e Tabela 1.

Gráfico 1 – Representação dos valores de UFCs transformados em log_{10}, dos 36 espécimes após 14 dias de contaminação pelo *E. faecalis*.



Foram obtidos os valores médios, desvio padrão, máximo e mínimo a partir do número de bactérias contadas após o processo de inoculação. Observou-se que a média representa bem os valores obtidos, pois o desvio-padrão apresentou-se menor que a metade da mesma. Valores representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Medidas de dispersão, após 14 dias de contaminação dos espécimes pelo *E. faecalis*

Médian: 36	6,751
Desvio padrão	0,857
Mínimo	4,954
Máximo	8,064

Nota: p= 0,0789.Valores transformados em log_{10}

Dos 36 elementos, dois foram separados para análise no MEV, 26 foram submetidos à irrigação com NaOCl 5,25%e 8 foram irrigados com solução salina estéril 0,85% (grupo controle). Imediatamente após a instrumentação, os espécimes foram submetidos a nova coleta (B).

Após a instrumentação, houve redução da carga microbiana para o grupo controle, nos oito espécimes, no entanto, em apenas um espécime esta redução foi maior que um log_{10}. Para as 26 amostras do grupo experimental, houve redução da carga microbiana após o preparo químico-mecânico, havendo o cultivo em apenas seis espécimes. Os valores obtidos das coletas A e B para o grupo controle e experimental estão apresentados respectivamente nos Gráficos 2 e 3.

Gráfico 2 –Valores de UFCsdo grupo - controle antes (coleta A) e apóso preparo químico- mecânico(coleta B), irrigados com salina 0,85% (n = 8)

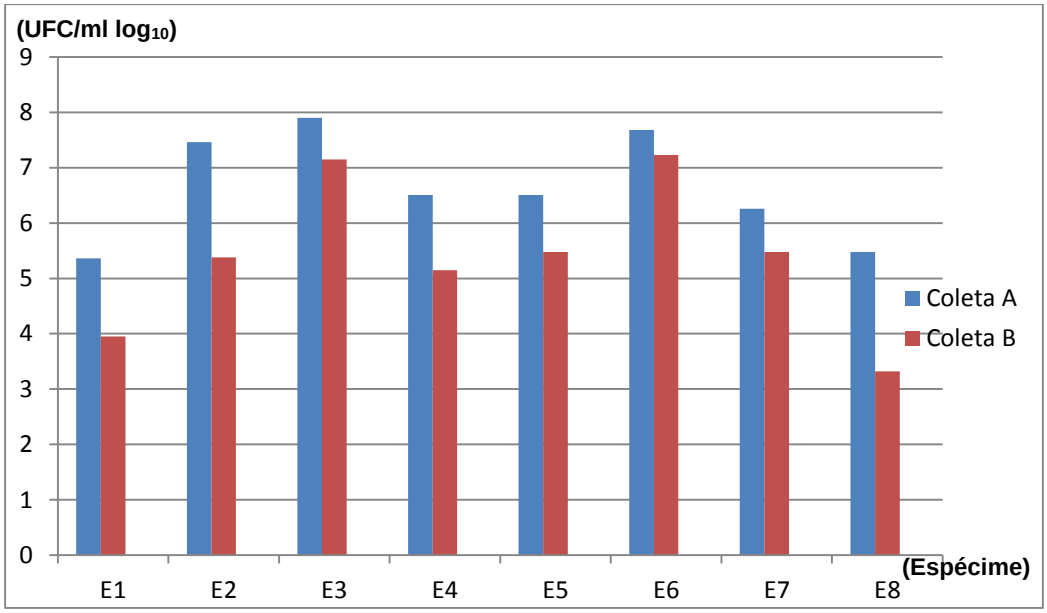
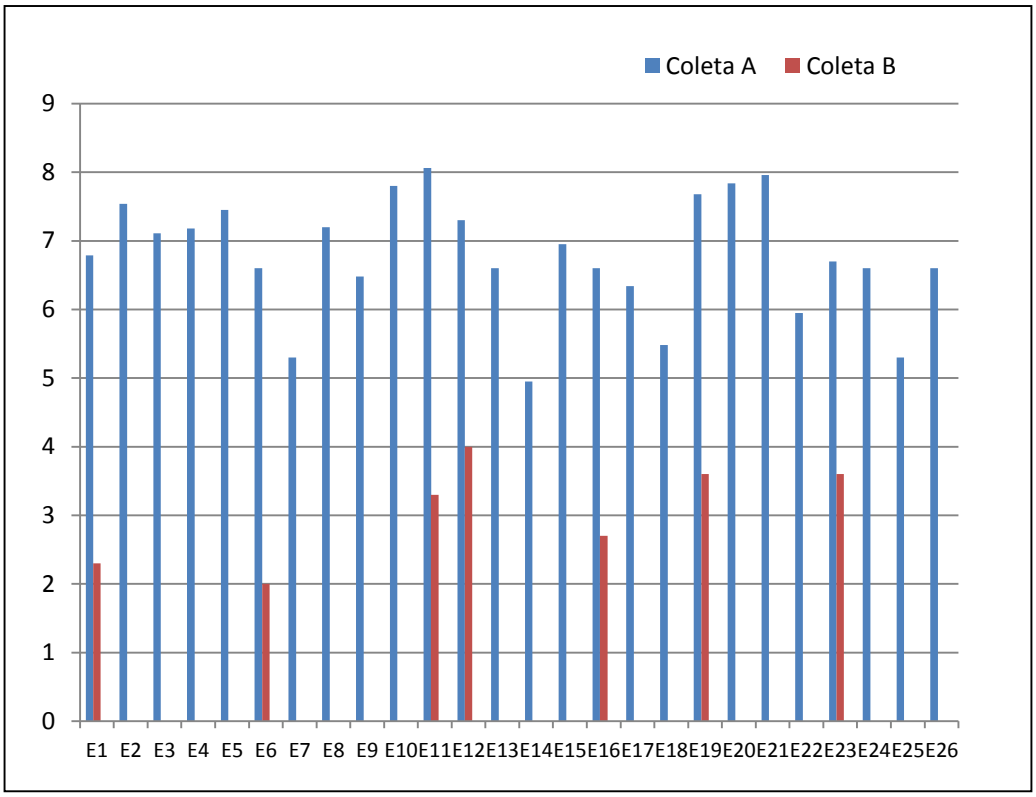


Gráfico 3 – Valores representativos das UFCs do grupo experimental, antes e após o preparo químico - mecânico, com o irrigante NaOCl 5,25% (n=26)



Após a coleta B, medidas de dispersão foram obtidasa partir dos valores referentes aos espécimes de cada grupo (experimental e controle), e calcularam-se a média; desvio-padrão; máximo e mínimo. Com a média obtida do grupo experimental (0,81) foi possível averiguar que os valores encontrados referente a redução de microorganismos foram próximos a zero, o que não pôde ser observado no grupo controle (5,38). Os valores obtidos das médias foram comparados pelo teste de Mann-Whitney e foi encontrada diferença estatisticamente significante ($p < 0,0001$) conforme descrito nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Medidas de dispersão dos valores da coleta B para o grupo controle e grupo experimental, irrigados com salina 0,85% e NaOCl 5,25% respectivamente.

Medidas Estatísticas	**NaOCl 5,25%** (n:26)	**Salina 0,85%** (n: 8)
Média	0,81	5,38
Desvio padrão	1,38	1,29
Mínimo	0,00	3,23
Máximo	4,00	7,23

Nota:: Valores transformados em $\log_{10}$

Tabela 3 – Teste estatístico aplicado para os grupos controle e experimental, coleta B.

Momento	Medicação	N	Tipo de teste	p-valor
1ª Momento	NaOCl	26	Mann-Whitney	<0,0001
	Salina	08		

Nota: (p=0,05)

O grupo experimental (n=26) foi subdividido de acordo com a medicação intracanal utilizada em grupo 1: clorexidina 2% e grupo 2: $Ca(OH)_2$, com 13 elementos cada. Após 14 dias, nova coleta foi realizada, coleta C. Pôde-se observar o cultivo em apenas um espécime do grupo 1, e em cinco espécimes para o grupo 2 (Gráficos4 e 5).

Gráfico 4 – Valores de UFCs do grupo medicado com gel de clorexidina 2% nos três momentos (coletas A, B e C).

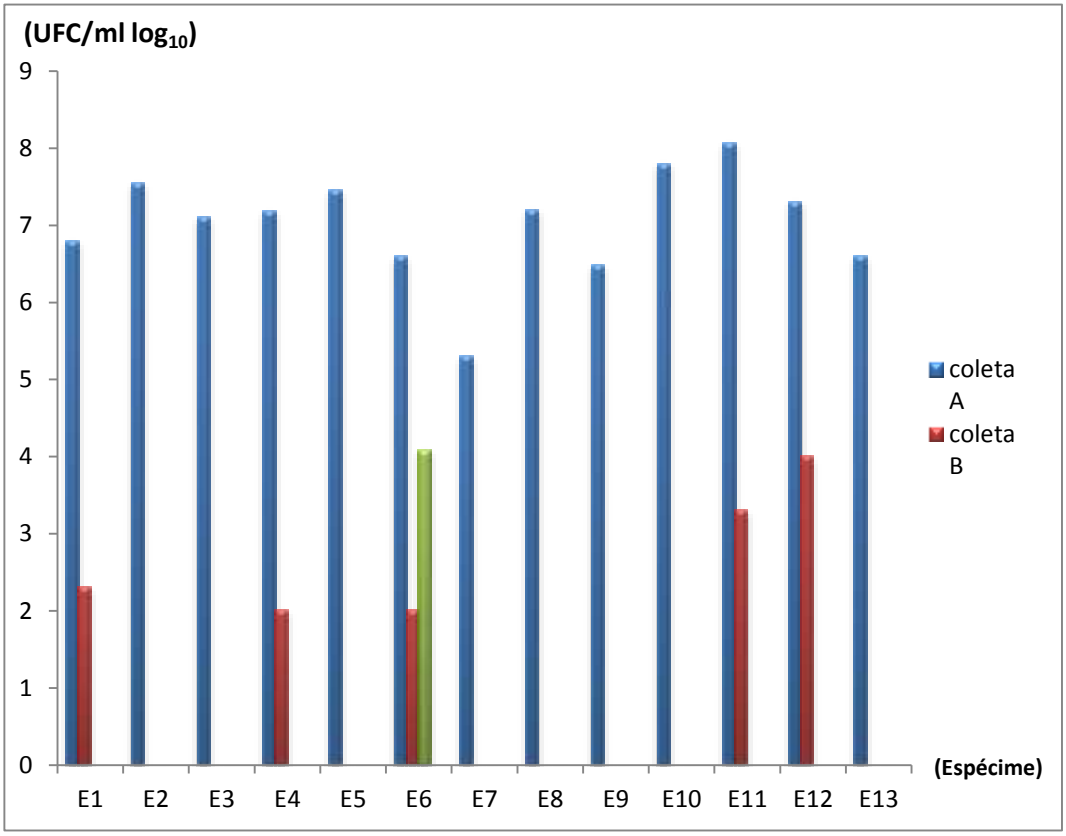
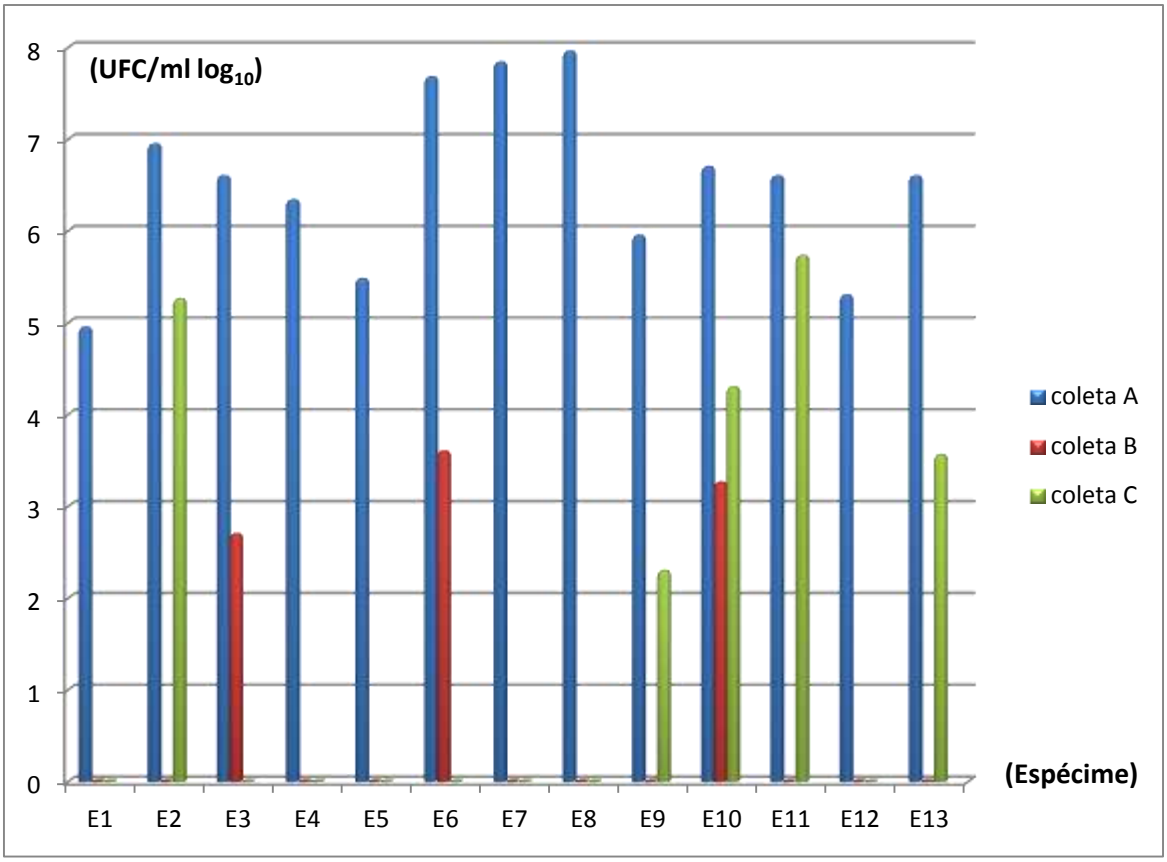


Gráfico 5 – Valores de UFCs do grupo medicado com $Ca(OH)_2$ nos três momentos (coleta A, B e C).



As medidas de dispersão para os grupos 1, 2 e controle encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Medidas de dispersão grupos: 1, 2 e grupo controle, obtidos após coleta C.

Medidas Estatísticas	**Clorexidina n= 13**	**Hidróxido de Cálcio n=13**	**Salina 0,85% n=8**
Média	0,31	1,63	5,89
Desvio padrão	1,09	2,19	0,64
Mínimo	0,00	0,00	4,60
Máximo	4,08	5,73	7,00

Nota: (p = 0,05). Valores transformados em log_{10}

Em seguida realizou-se o teste de Kruskal-Wallis entre os grupos 1, 2 e controle, e pôde-se observar que os grupos 1 e 2 obtiveram diferença estatisticamente significante em relação ao grupo controle. Estes dados encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Análise estatística referente à coleta C aplicada aos grupos 1, 2 e grupo controle

Momento	Medicação	N	Tipo de teste	p-valor
Coleta C	Clorexidina	13	Kruskal-Wallis	0,0001
	Hidróxido de Cálcio	13		
	Salina	08		

Nota: (p=0,05)

Após a coleta C, ao comparar as médias obtidas para os grupos 1 e 2 observou-se diferença entreas mesmas. No entanto não houve diferença estatísticamente significante (p-valor= 0,113). Valores expressos na Tabela 6.

Tabela 6 – Comparação entre as médias obtidas dos grupos 1 e 2 após coleta C

Medicação	N	Média	Desvio padrão	p-valor
clorexidina	13	0,314	1,087	0,113
hidróxido calcio	13	1,627	2,193	

Nota: (p=0,05)

Após a coleta C, foi aplicado o teste Tukey em um intervalo de confiança de 95%, com o intuito de verificar onde houve diferença entre as médias para o quantitativo de UFCs. Pôde-se observar diferença estatisticamente significante entre os grupos 1 e controle, e entre os grupos 2 e controle. Não houve diferença estatística entre os grupos 1 e 2. Valores apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados do teste *Tukey* para os grupos 1, 2 e controle, após coleta C.

Grupo		**Diferença entre as médias (I-J)**	**Erro Padrão**	**p-valor**	**Intervalo de Confiança 95%**	
I	II				Limite Inferior	Limite Superior
Clorexidina	Clorexidina	---	---	---	---	---
	Hidróxido	-1,3129	0,63462	0,113	-2,8748	0,2490
	Salina	-5,5764*	0,72705	0,000	-7,3658	-3,7870
Hidróxido de Cálcio	Clorexidina	1,3129	0,63462	0,113	-0,2490	2,8748
	Hidróxido	---	---	---	---	---
	Salina	-4,2634*	0,72705	0,000	-6,0528	-2,4740
Salina	Clorexidina	5,5764*	0,72705	0,000	3,7870	7, 658
	Hidróxido	4,2634*	0,72705	0, 00	2., 740	6,0528
	Salina	---	---	---	---	---

Nota: *(p= 0,05)

A coleta D foi realizada após sete dias decorridos da remoção da medicação. Nesta etapa houve a perda do espécime 14 (grupo1) e uma contaminação não permitiu a contagem de colônias no espécime 33 (grupo 2). Esta perda foi analisada estatisticamente e equivale a um dente para cada grupo.

As medidas de dispersão e os valores das médias obtidas (Tabela 8) demonstraram o aumento significativo do número de UFCs nos grupos 1 e 2, bem como no grupo controle.

Tabela 8 – Medidas de dispersão dos grupos 1, 2 e grupo controle - medicação intracanal ausente (coleta D).

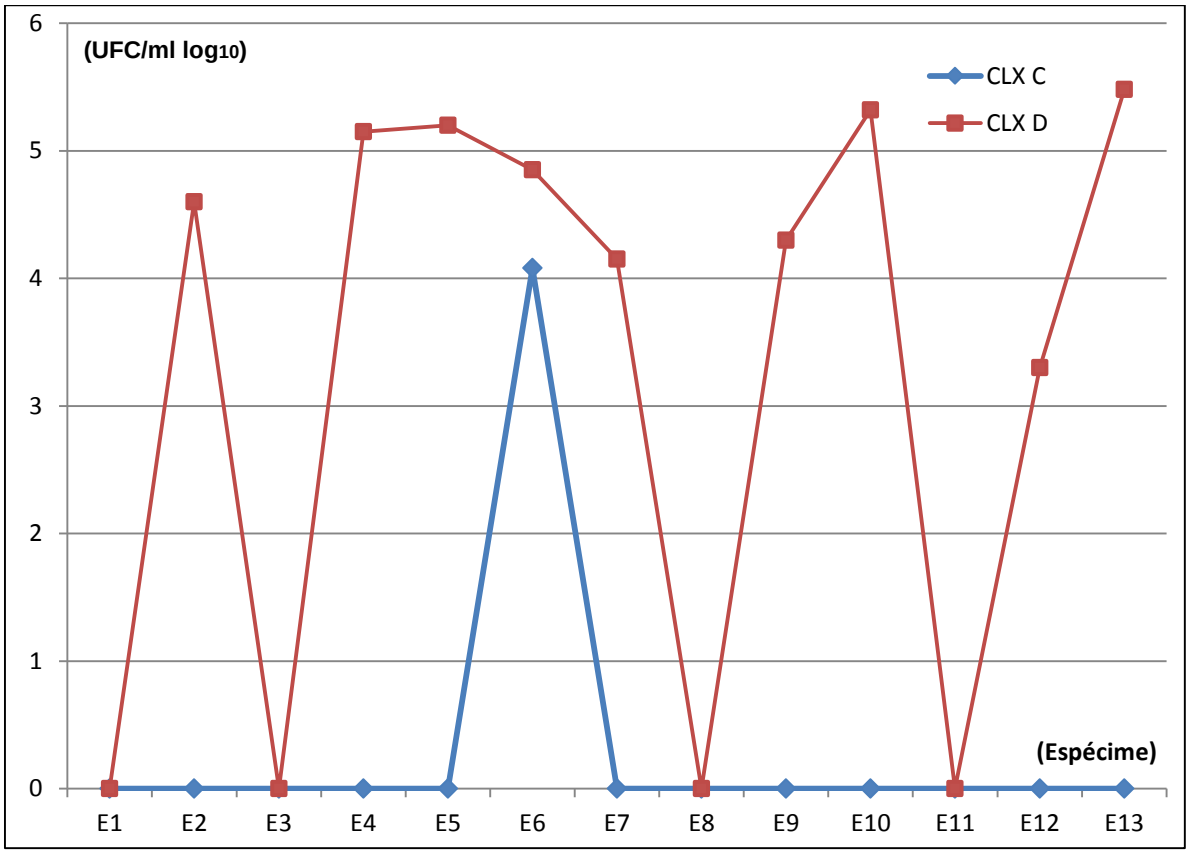
Medidas Estatísticas	**Clorexidina n=13**	**Hidróxido de Cálcio n=13**	**Salina n=8**
Média	3,53	3,02	4,96
Desvio padrão	2,12	2,34	0,59
Mínimo	0,00	0,00	4,30
Máximo	5,48	6,68	6,04

Nota: Valores transformadosem log_{10}

O teste Kruskal-Wallis foi aplicado (Tabela 9), não foi observada diferença estatisticamente significante entre os três grupos (p= 0,1546).

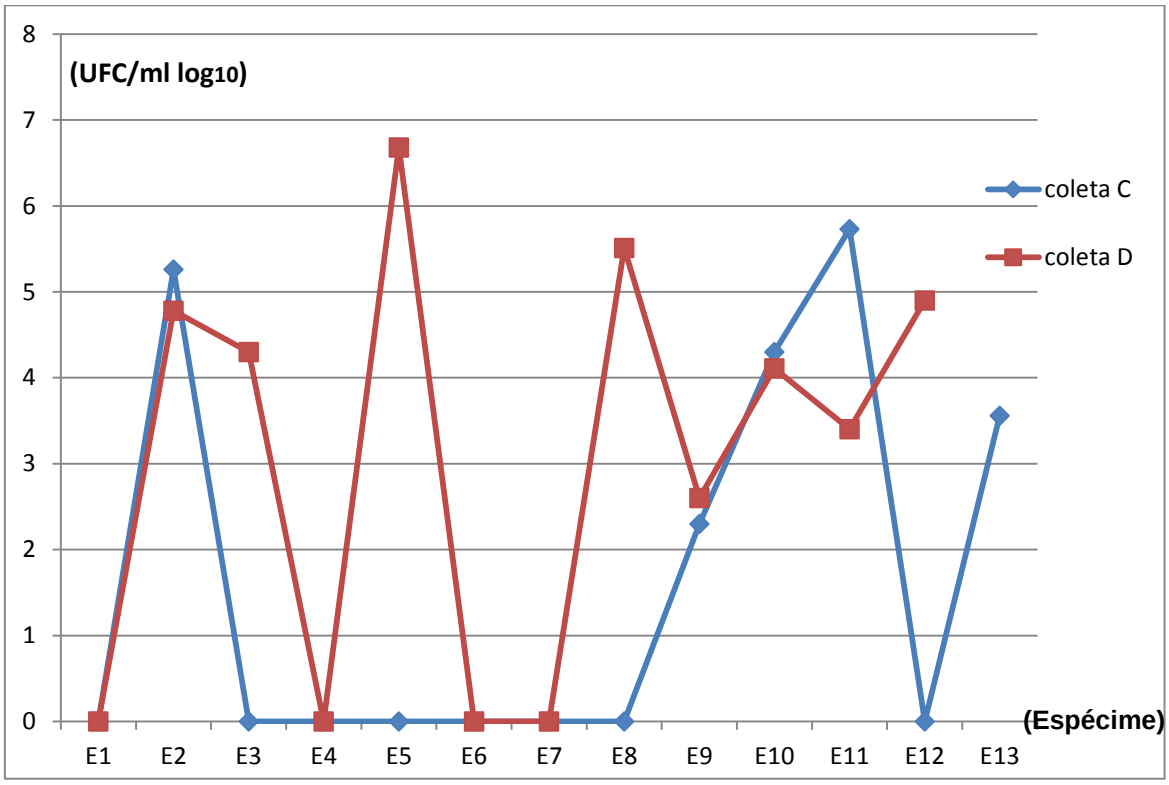
A contagem de UFCs obtidas no grupo 1 (clorexidina gel 2%) para as coletas C e D, foi demonstrada no Gráfico 6.

Gráfico 6 – Valores encontrados do grupo tratado com gel de clorexidina 2%, em linha azul valores referentes a coleta C e em vermelho, valores referentes a coleta D (CLX: clorexidina)



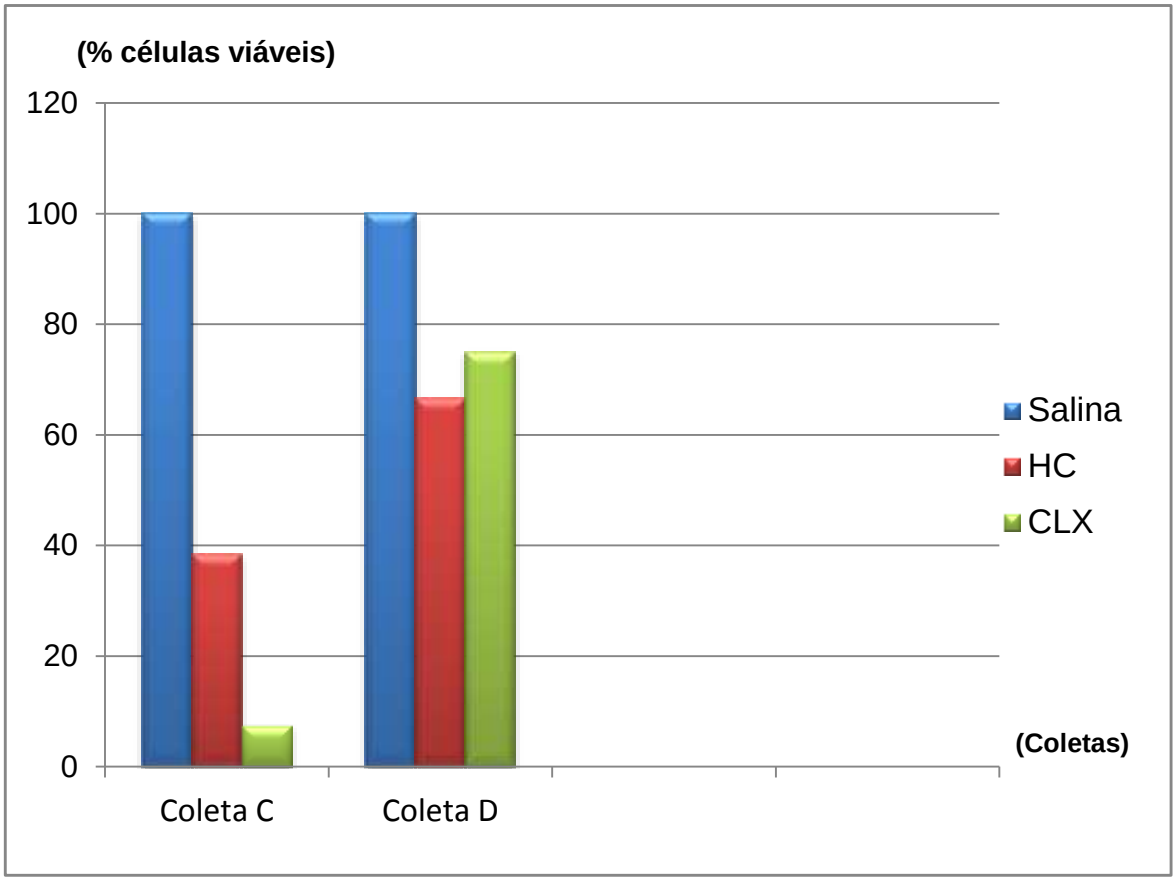
A contagem de UFCs obtidas no grupo 2, para as coletas C e D, foram comparadosGráfico 7.

Gráfico 7 – Valores encontrados no grupo tratado com $Ca(OH)_2$, em linha azul valores referentes a coleta C e em vermelho valores referentes a coleta D.



Os valores percentuais de cultivo encontrados nos grupos controle e experimental (1 e 2) foram comparados e expostos em um gráfico de colunas (Gráfico 8). Pôde-se observar que no grupo controle houve o cultivo de *E. faecalis* em 100% das amostras para as coletas C e D. No grupo 1, o cultivo foi observado em 10% e 78% das amostras respectivamente para as coletas C e D, e no grupo 2 observou-se o cultivo em 38% e 63%, respectivamente nas coletas C e D.

Gráfico 8 – Valores percentuais dos grupos: experimental e controle, quanto ao cultivo de *E. Faecalis* nas etapas de coleta C e D. (HC: hidróxido de cálcio; CLX: clorexidina).



6 DISCUSSÃO

A relação do *E. faecalis* com infecções persistentes no canal radicular têm sido relatada nas pesquisas, no entanto seus índices em infecções primárias e secundárias não estão bem definidos (WILLIANS et al. ,2006). Estudos apontam este microorganismo como uma bactéria comumente encontrada em infecções endodônticas secundárias (ROACH; HATTON; GILLEPSIE, 2001).Do mesmo modo Pinheiro et al. (2003b) e Gomes et al. (2004) relataram a presença do *E. faecalis* na microbiota de canais radiculares com insucesso, e evidenciaram como um dos microorganismos mais resistentes ao tratamento endodôntico.

Este estudo avaliou a ação de diferentes medicamentos usados durante o tratamento endodôntico, na eliminação do *E. faecalis*, de canais radiculares contaminados por este microorganismo. Embora este microorganismo represente uma pequena percentagem da microbiota, pode ser favorecido por mudanças ecológicas e estabelece-se como infecções de difícil tratamento (SUNDQVIST; FIGDOR; SJGREN, 1998). É possível evidenciar como característica de sua cultura, a capacidade de crescer em condições variadas de temperatura e de pH e também em altas concentrações de cloreto de sódio e bile (TEIXEIRA; TRABULSI, 2004). *E. Faecalis* são cocos Gram-positivos, facultativos, e possuem vários fatores de virulência: além da capacidade de competir com outros microorganismos. Também são capazes de invadir túbulos dentinários, formar biofilme e de sobreviver em ambientes hostis com escassez nutricional. (DISTEL; HATTON; GILLESPIE, 2002; KAYAOGLU; ØRSTAVIK, 2004; STUART et al., 2006).

Este estudo avaliou *in vitro* a susceptibilidade do *E. faecalis* às medicações, no interior dos túbulos dentinários de molares inferiores extraídos de humanos. Embora não seja muito comum, recentes estudos abordam trabalhos utilizando o grupo dental de molares (GONÇALVES et al., 2010; MARKVART et al., 2012; PETERS; WESSELINK; MOORER, 2000; SIQUEIRA JÚNIOR et al., 2010), visto a tipica anatomia dos canais radiculares deste tipo dental, que apresenta áreas de difícil acesso pelos instrumentos endodônticos, como curvaturas e dilacerações, o que dificulta a instrumentação destes condutos. No entanto, para se padronizar a amostra,foram selecionados molares inferiores com três canais,

com características comums de morfologia externa, evitando grandes discrepâncias anatômicas.

Modelos experimentais de contaminação de túbulos dentinários têm sido propostos na literatura para auxiliar as pesquisas. Estes abordam diferentes períodos de tempo que variam de cinco a 30 dias, e o microorganismo de escolha têm sido o *E. faecalis* (ALMYROUDI et al., 2002; BRITO et al., 2009; ESTRELA et al., 1999; SIQUEIRA JÚNIOR et al., 2010). Estrela et al. (1999) utilizaram um método, onde contaminaram espécimes através de inoculações intracanal a cada 48 horas durante 30 dias. Em nosso estudo optamos pelo método de Siqueira Júnior et al. (2010) que inoculou espécimes em caldo TSB, e o meio foi renovado a cada sete dias. Nossa escolha baseou-se em permitir a estruturação da colonização bacteriana, sob o entendimento do crescimento bacteriano em meio de cultura. Acredita-se que o acréscimo de novos componentes ao meio, em intervalos muito aproximados de tempo, gera a saturação do mesmo, podendo ocasionar dano ao metabolismo bacteriano, e consequente declínio e morte celular.

Em nosso estudo utilizaram-se duas amostras analisadas por MEV, que permitiram, após 14 dias de contaminação, a observação da colonização do *E. faecalis* no interior dos túbulos dentinários, e pôde-se evidenciar a efetividade do método de contaminação dos espécimes. Os resultados obtidos após a coleta A (quantificação inicial de microorganismos) foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, e este demonstrou a distribuição homogênea do *E. faecalis,* entre os espécimes.

Apesar da alta sensibilidade e especificidade dos métodos moleculares em relação ao método de cultivo (SEDGLEY et al., 2005), estes demandam sofisticada tecnologia e alto custo, além de não detectar a viabilidade dos microorganismos. Estudos que utilizaram de técnicas de cultivo para quantificação e detecção de microoganismos obtiveram resultados satisfatórios com o uso deste instrumento (ALMYROUDI et al., 2002; DELGADO et al., 2010; DENOTTI et al., 2009; SEDGLEY; BUCK; APPELBE; 2006; VIANNA et al., 2007; WILLIANS et al., 2006). A técnica de cultivo é um método confiável, de baixo custo e permite a reprodutibilidade de resultados com viabilidade de microorganismos. Neste estudo foi possível quantificar o *E. faecalis*, através do

cultivo e verificar a ação de substâncias sobre esta bactéria, em diferentes estágios representativos do tratamento endodôntico.

A praticidade e rapidez obtida com o uso de instrumentos mecanizados somados aos relatos da literatura (CÂMARA et al., 2009; RUDDLE, 2006) justificam a escolha do uso do sistema ProTaper Universal (Dentsply/Maillefer, Suiça) neste trabalho.

De acordo com Lopes e Siqueira (2010), o NaOCl tem sido a solução irrigadora mais utilizada na endodontia, devido às suas excelentes propriedades: capacidade de dissolver tecidos orgânicos; baixa tensão superficial; ação desodorizante; clareador e efetiva ação germicida e bactericida. Diversas concentrações têm sido usadas no tratamento endodôntico (0,5%; 1%; 2,5%; 5,25% e 6%). Retamozo et al. (2010) avaliaram *in vitro* o tempo necessário para ação antimicrobiana do NaOCl nas diferentes concentrações de 1,3%; 2,5% e 5,25%, na remoção de *E. faecalis* de túbulos dentinários e concluíram que a concentração de 5,25%, no tempo de 40 minutos foi a mais efetiva. Estes autores não executaram o preparo químico-mecânico, no entanto considerou-se neste estudo que as técnicas de instrumentação mecanizadas permitem a realização em um tempo menor de trabalho, o que justifica o emprego de soluções com maior concentração. Deste modo optamos pelo uso do NaOCl 5,25% como solução irrigadora, e bons resultados foram obtidos. Conforme descrito no Gráfico 3, dos 26 espécimes avaliados, 19 apresentaram cultura negativa e sete obtiveram significativa redução da carga microbiana. Pela análise estatísticade, de acordo com a Tabela 4, é possível observar que os resultados deste grupo apresentaram um desempenho significativamente melhor em relação ao grupo controle e, apesar dos resultados obtidos no grupo experimental, podemos considerar que o preparo químico-mecânico não é suficiente em realizar a desinfecção do canal.

Mohammadi, Giardino e Mombeinipour (2012) avaliaram a ação do NaOCl 5,25%, em diferentes momentos, num período de até 28 dias e observaram a efetividade desta solução no tempo de exposição inicial, porém afirmaram que esta substância não apresenta ação residual na eliminação de microorganismos. Neste experimento não avaliamos a ação residual do NaOCl, e as amostras foram obtidas imediatamente após a instrumentação, pois nosso intuito foi

estabelecer a sequência utilizada em protocolos clínicos que utilizam medicação curativa intracanal após a instrumentação.

Estratégias de tratamento têm sido utilizadas para eliminar a infecção do sistema de canais radiculares através do uso da pasta a base de $Ca(OH)_2$ Trabalhos têm avaliado a ação do $Ca(OH)_2$ na eliminação do *E. faecalis* de túbulos dentinários. Com metodologia diferente deste estudo, Gomes et al. (2002) avaliaram a ação antimicrobiana do $Ca(OH)_2$ combinado com diferentes veículos contra vários microrganismos, inclusive *E. faecalis* e concluíram que o melhor desempenho antimicrobianofoi observado quando feita a associação com veículos viscosos e oleosos. Os resultados observados por estes autores podem ter sido favorecidos pela metodologia que garante a formação ou não do halo de inibição bacteriano mediante à susceptibilidade ao antimicrobiano. Neste estudo avaliamos *in vitro* a ação do $Ca(OH)_2$ na eliminação de*E. faecalis* de canais radiculares, a fim de observar o comportamento deste microorganismo dentro do ambiente propício dos túbulos dentinários, rico em fibras colágenas.O Gráfico 5 permite a observação dos valores quanto a viabilidade desta bactéria, detectada em cinco de 13 amostras tratadas com $Ca(OH)_2$, e de acordo com a análise estatística (teste de Kruskal-Wallis, p=0,0001) estamedicação foi efetiva em eliminar o *E. faecalis* dos canais radiculares, quando comparada ao grupo controle, conforme exposto na Tabela 5. No entanto, conhecida a capacidade de sobrevivência deste patógeno em ambientes de escassez nutricional e de recontaminar os túbulos dentinários, salientamos aqui, a necessidade de uma total remoção deste patógeno pela medicação utilizada, o que não foi observado neste trabalho.

O mecanismo de ação antimicrobiano do $Ca(OH)_2$ consiste na dissociação de íons cálcio e hidroxila, elevando o pH do meio (12,6) ao inibir a atividade enzimática (metabolismo, crescimento e divisão celular) essencial à sobrevivência microbiana. De acordo com Estrela et al. (2003), este mecanismo requer tempo necessário para efetuar a completa ação antimicrobiana, e depende do veículo utilizado. Almyroudi et al. (2002) encontraram efetividade da pasta de $Ca(OH)_2$ utilizada com solução salina na eliminação de *E. faecalis* de túbulos dentinários após oito dias de medicação, e em desacordo com este estudo, observou a contaminação por este microorganismo após um período de

14 dias. Atribuímos esta diferença ao tipo de veículo utilizado, e de diferente modo, justificamos a escolha da glicerina como veículo neste trabalho, baseado no conhecimento de sua propriedade de promover uma dissociação mais lenta do $Ca(OH)_2$, comparada aos veículos aquosos. Uma vez que buscamos intensificar a atividade antimicrobiana deste medicamento, o uso de um veículo viscoso foi pertinente, visto que avaliamos por um período maior, de 14 dias.

Após sete dias removida a medicação intracanal, nova coleta (coleta D) foi estabelecida. Os resultados obtidos nestas amostras não comprovaram a eficácia residual do $Ca(OH)_2$ na desinfecção dos canais radiculares ($p>0,05$), conforme a Tabela 9. De acordo com o Gráfico 7, dados fornecidos nesta coleta (D): de 13 espécimes, uma coleta foi perdida por contaminação, oito apresentaram positividade na cultura, e destes oito espécimes, quatro obtiveram cultura negativa na coleta C. Estes resultados podem ser compreendidos por estudos prévios de Sedgley et al. (2005) e Delgado et al. (2010), os quais salientaram que o *E. faecalis* é capaz de penetrar profundamente nos túbulos dentinários e resistir à ação de substâncias antimicrobianas usadas nos procedimentos clínicos. Ainda de acordo com estes autores este microrganismo estabelece uma condição metabólica na qual seu crescimento é interrompido no meio de cultura, não sendo cultivável, no entanto permaneça viável, (*viable but not cultivable* - VBNC). E posteriormente, em condições favoráveis o *E. faecalis* pode retornar a um estado plenamente cultivável.

Diferente de nossos resultados, Pavaskar et al. (2012) avaliaram a ação do $Ca(OH)_2$ e do linezolide em túbulos dentinários infectados com *E. faecalis* e observaram que o $Ca(OH)_2$ apresentou resultados insatisfatórios sendo efetivo somente durante 72h.

O desempenho antimicrobiano na cavidade bucal, em face à sua efetividade contra o biofilme e gengivite, tornou a clorexidina o padrão-ouro na comparação de novos produtos antibacterianos (BORGES et al., 2012). Atualmente têm-se discutido o uso da clorexidina como medicamento de escolha na endodontia, por seu amplo espectro de ação contra aeróbios; anaeróbios e espécies de *Candida* relacionadas à falhas do tratamento endodôntico. O efetivo potencial antimicrobiano aliado à substantividade, e baixa toxicidade nos tecidos tem

justificado seu uso como medicação intracanal (ALMYROUDI et al., 2002; ESTRELA et al., 2007; SPRATT et al., 2001; WANG et al., 2007).

A molécula da clorexidina é uma bisbiguanidina catiônica e seu efeito antimicrobiano é proporcionado pela atração causada por esta molécula nos componentes aniônicos de membranas celulares bacterianas, o que gera o rompimento destas estruturas e permite a infiltração dos componentes intracelulares, ou seja, ocasiona a coagulação ou precipitação destes constituintes. Uma desvantagem desta substância é a incapacidade de dissolver tecidos orgânicos, na forma líquida o que limita a sua ação como agente irrigante endodôntico (GOMES et al., 2003; ESTRELA et al., 2007; FREIRE et al., 2010; KRITHIKADATTA; INDIRA; DOROTHYKALYANI, 2007).

Neste estudo avaliamos o gel de clorexidina 2% e sua ação como medicação intracanal após o período de 14 dias. Observamos cultura positiva em apenas um espécime de 13 avaliados, conforme o Gráfico 4 e oportunamente destacamos que a forma gel dificulta a aplicação deste medicamento.Segundo Wang et al. (2007), a forma gel não apresenta boa propriedade de fluidez, o que requer adicional atenção na liberação deste gel para os canais radiculares. Possivelmente pode ocorrer o surgimento de bolhas, impedindo o acesso desta substância em toda a extensão do canal radicular. Este fator pode justificar o único resultado positivo encontrado neste grupo.

Muitos estudos têm avaliado a associação da clorexidina gel ao $Ca(OH)_2$ (EVANS et al., 2003; FREIRE et al., 2010; WANG et al., 2007), porém neste experimento não fizemos esta escolha, pois os resultados demonstrados na literatura não observaram diferenças estatisticamente significativas quando realizada esta associação.

Com metodologia semelhante a este estudo, Kritikadhatta, Indira e Dorothykalyani (2007) encontraram melhores resultados no uso do gel de clorexidina 2% em relação ao $Ca(OH)_2$ na redução de *E. faecalis* de túbulos dentinários. Os resultados com relação ao uso do gel de clorexidina 2%, observados no Gráfico 4 e Tabela 5 nos permitiu concluir que esta substância foi superior de forma estatisticamente significante (p=0,0001) quando comparada ao grupo controle, na remoção do *E. faecalis*, após 14 dias. Com resultados diferentes deste estudo, Wang et al. (2007) avaliaram a ação antimicrobiana do

gel de clorexidina 2% no preparo químico-mecânico e como medicação intracanal associada ao $Ca(OH)_2$ durante 14 dias, e concluíram que a clorexidina foi um efetivo desinfetante, porém como medicação curativa, não foi encontrada significância na redução do número de bactérias. Possivelmente esta diferença seja atribuída à avaliação proveniente de amostras clínicas obtidas de pacientes com diagnóstico de periodontite apical, possivelmente mais resistentes, todavia em nosso estudo, utilizamos amostras oriundas de canais radiculares contaminados com uma cepa padrão (ATCC 29212).

No nosso trabalho, o gel de clorexidina 2% apresentou melhores resultados em relação à pasta de $Ca(OH)_2$, como medicação intracanal durante 14 dias. Corroborando com este estudo, Delgado et al. (2010) avaliaram eficácia do hidróxido de cálcio, e do gel de clorexidina 2% e da associação destes, na eliminação do *E. faecalis* em túbulos dentinários, deixados por 21 dias, e concluíram que as duas medicações foram efetivas contra o *E. faecalis*, porém o $Ca(OH)_2$, foi menos efetivo do que outros tratamentos.

A substantividade da clorexidina no interior dos canais radiculares, foi avaliada após sete dias sem a medicação (coleta D) e pôde-se observar um aumento logarítmico considerável na contagem de colônias, conforme exposto no Gráfico 6. De 13 espécimes, apenas três não apresentaram microorganismos detectados no cultivo. Os outros espécimes apresentaram aumento significativo em relação à coleta anterior (C), o que demonstrou a recuperação dos microrganismos num período de sete dias. Evidenciamos que na prática clinica, não é recomendada a permanência destes canais sem a medicação, e que uma vez realizado o preparo químico mecânico, estas medicações devem ser introduzidas nos canais radiculares, a fim de complementar o tratamento endodôntico. No entanto, esta etapa da metodologia foi executada a fim de observar a ação residual da medicação intracanal na remoção deste microrganismo, uma vez que é possível falhas na obturação do canal radicular, a permanência bacteriana no interior destes, pode ser a causa do insucesso desta terapia. Os resultados obtidos na coleta D (ver Gráfico 8) demonstraram que nenhum foi capaz de impedir a recontaminação dos canais radiculares, após sete dias sem de medicação intracanal. Consideramos que apesar dos diferentes mecanismos de ação destas duas substâncias, ambos agem

desintegrando membranas citoplasmática e o efeito antimicrobiano é promovido por contato, ou seja, a presença destes componentes no interior do canal radicular age como barreira física.

No grupo tratado com clorexidina houve a perda de uma amostra devido à contaminação, e considerou-se um total de 12 espécimes, do mesmo modo, para o grupo medicado com $Ca(OH)_2$, também foi considerado um total de 12 espécimes pela perda de uma amostra (Tabela 9).

De acordo a análise estatística (teste de Kruskal-Wallis) os resultados demonstraram que as duas substâncias avaliadas não desempenharam ação residual na eliminação do *E. faecalis,* após sete dias (p=0,15). A falta de estudos que executaram metodologias afins com a realizada nesta etapa, não permite a comparação de nossos resultados.

Valores observados no grupo controle, (coleta D), demonstraram uma discreta redução do número de UFCs comparado à coleta C, com valores de médias: 5,89 e 4,96 para as coletas C e D respectivamente. Uma possível explicação seria o favorecimento do crescimento bacteriano já era esperado dentro de um período inicial, devido à ausência da ação antimicrobiana da salina 0,85%. No entanto, o excesso de produtos tóxicos metabólicos, e a estabilidade do meio (aparato utilizado) pode ter provocado a saturação deste ambiente, e causado morte celular, o que possivelmente explica a discreta diferença e redução dos valores obtidos nesse grupo.

O protocolo utilizado neste estudo baseou-se na literatura (DELGADO et al., 2010; WANG et al., 2007). Utilizamos previamente a coleta C, neutralizadores específicos aplicados com o intuito de garantir a interrupção da ação antimicrobiana e eliminar qualquer vestígio de medicação para o meio de cultura. Utilizamos o ácido cítrico 1% para o grupo medicado com pasta à base de $Ca(OH)_2$ e para o gel de clorexidina 2%, foi usado Tween 80 + leucitina 0,03%.

Uma das limitações que elucidamos neste trabalho, foi a dificuldade de reproduzir o ambiente intrabucal, composto em sua maioria por uma diversidade de espécies bacterianas. Destacamos que este estudo utilizou-se de um modelo *in vitro*, e as condições nutricionais oferecidas por uma monoinfecção, podem ter favorecido a sobrevivência da espécie avaliada. Friedman, Abitol e Lawrence

(2003) em um estudo de observação do êxito do tratamento endodôntico por um período de quatro a seis anos, onde foram avaliados um total 450 dentes, consideraram que a resistência sistêmica do paciente é um dos fatores importantes na obtenção de êxito do tratamento endodôntico. Uma vez que o aparato utilizado proporcionou um ambiente inerte ao microorganismo, é oportuno ressaltar que este não foi submetido a interferências do sistema imune do hospedeiro.

Portanto, os resultados obtidos na coleta D, não deve subestimar a efetividade dos medicamentos aqui avaliados, especificamente em relação ao uso do gel de clorexidina 2%, que apresentou um bom desempenho como medicação curativa intracanal, e assim evidenciamos sua aplicabilidade na prática clínica.

É importante ressaltar que este trabalho foi realizado exclusivamente com *E. faecalis* e que mais estudos são necessários para abordar este patógeno de uma forma mais ampla, mediante as condições apropriadas da complexa anatomia do canal radicular frente a natureza polimicrobiana das infecções endodônticas.

7 CONCLUSÃO

Com base na literatura pesquisada e, a partir dos resultados encontrados neste estudo, pode-se concluir que:

a) o hipoclorito de sódio 5,25%,utilizado como solução irrigadora foi eficaz na redução de *E. faecalis* no interior dos canais radiculares;

b) *E. faecalis* mostrou-se susceptível, à medicação curativa intracanal à base de hidróxido de cálcio e ao gel de clorexidina 2%, por um período de 14 dias, sendo que esta apresentou melhores resultados em relação ao $Ca(OH)_2$ quanto à redução do número de colônias;

c) decorridos sete dias sem a medicação curativa, nenhum antimicrobiano demonstrou efetividade no controle da recontaminação do canal principal e dos túbulos dentinários por este microrganismo; e

d) as duas amostras preparadas para MEV, permitiram visualizar a contaminação do canal principal e dos túbulos dentinários pelo *E. faecalis*, após um período de contaminação de 14 dias, o que demonstrou a efetividade do método.

8 REFERÊNCIAS

ALMYROUDI, A. et al. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medicaments: an *in vitro* study. **J. Endod.**, Baltimore, v. 28, n. 3, p. 163-167, 2002.

ASHLEY, M.; HARRIS, I.The assessment of endodontically treatment tooth. **Dent. Update**, Guilford, v. 28, p. 247-252, 2001.

BAUMGARTNER, J.C. Microbiologic aspects of endodontic infections. **Can. Dent. Assoc. J,** Toronto, v. 32, n. 6, p. 459- 467, 2004.

BERBER, V. B. **Verificação da redução do *Enterococcus Faecalis* no canal radicular e nos túbulos dentinários utilizando diferentes substâncias químicas auxiliares e técnicas de instrumentação: estudo *in vitro*.** 2005. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, São Paulo, 2005.

BERGENHOLTZ, G. et al. Influence of apical over instrumentation and overfilling on retreated root canals. **J. Endod.**, Baltimore, v .5, n. 10, p. 310-314, Oct. 1979.

BORGES, F. M. C. et al. Antimicrobial effect of chlorhexidine digluconate in dentin: *In vitro* and *in situ* study. **J. Conservative Dent.**, v. 15, n. 1, p. 22-26, 2012.

BRITTO, P.R.R. et al. Comparison of the effectiveness of three irrigation techniques in reducing intracanal *Enterococcus faecalis* populations: an in vitro study. **J. Endod.**, Baltimore, v. 35, n. 10, p. 1422-1427, 2009

CÂMARA, A.S. **Avaliação das alterações geométricas e dimensionais dos instrumentos de NiTi do sistema ProTaper para o sistema ProTaper Universal e o efeito destas sobre a flexibilidade e aresistência torsional.** 2008. 142 f. Tese (Doutorado em Endodontia) –Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual PaulistaJúlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2008.

CÂMARA, A. S. et al. Flexibility and torsional strength of ProTaper and ProTaper Universal rotary instruments assessed by mechanical tests. **J. Endod.**, Baltimore, v.35, n.1, p.113-116, 2009.

DAMETTO, F.R. et al.In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhxidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.**, Saint Louis, v. 99, p. 768-772, 2005.

DELGADO, R.J.R. et al. Antimicrobial effects of Calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis* .**J. Endod.**, Baltimore, v.36, n.8, p.1389-93, Aug. 2010.

DENOTTI, P. et al. In vitro evaluation of Enterococos faecalis adhesion on various endodontics medicaments**. Open Dent. J.**, Bethesda, v. 3, p. 120-124, 2009.

DISTEL, J.W.; HATTON, J.F.; GILLESPIE, M.J. Biofilm formation in medicated root canals. **J. Endod.**, Baltimore, v. 28, n. 10, p. 689-693, Oct. 2002.

ESTRELA, C. et al. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals.**Int. Endod. J.,** Oxford, v. 40, n. 2, p.83-90, 2007

ESTRELA, C. et al. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentin tubules. **J. Endod.**, Baltimore, v. 25, n. 6, p. 416- 418, June 1999.

ESTRELA, C. et al. Control of microorganisms in vitro by hydroxide of calcium pastes. **Int. Endod. J.,** Oxford, v. 34, p. 341-345, 2001.

ESTRELA, et al. Control of microorganisms in vitro by endodontics irrigants.**Braz. Dent. J.,** Ribeirão Preto, v. 14, n. 3 p. 87- 92, 2003.

ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Braz. Dent. J.,** Ribeirão Preto, v. 13, n. 2, p. 113-117, 2002.

ESTRELA, C.; HOLLAND, R. Calcium hydroxide: Study based on scientific evidences. **J. Applied Oral Sc.,** Bauru, v. 11, n. 4, p. 269-282, 2003.

EVANS, M. D. et al. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin**. J. Endod.**, Baltimore, v. 29, n. 5, p. 338-339, 2003.

EVANS, M. et al. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int. Endod. J.,** Oxford, v. 35, p. 221-228, 2002.

FERRAZ, C.C.R. et al. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorexidine gel as an endodontic irrigant. J**. Endod.**, Baltimore, v. 27, n. 7, p. 452-455, 2001.

FOUAD, F.A. et al. Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections.**Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.,** Saint Louis, v. 99, n. 1, p. 112-118, Jan 2005.

FREIRE, L.G. et al. Influence of dentin on pH of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone or combination. **Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 26, p. 276-280, 2010.

FRIEDMAN, S.; ABITOL, S.; LAWRENSE, H.P. Treatment outcomes in endodontics: The Toronto study. Phase I. **J. Endod.**, Baltimore, v. 29, p. 787-793, 2003.

GARCEZ, A. S. et al. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: A preliminary report. . **J. Endod.**, Baltimore, v. 36, n. 9, p. 1463-1466, set. 2010.

GENTTLEMAN, B.H.; RODA, R. S. Retratamento não cirúrgico. In: COHEN, S.; HARGREAVES, K.M. (Ed.). **Caminhos da Polpa**. 9. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 944-1010

GOMES, B. P. F. A. et al. In vitro antibacterial activity of several concentrations of sodium hypoclorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*.**Int. Endod. J.,** Oxford, v. 34, p. 424-428, 2001.

GOMES, B. P. F. A. et al. In vitro antibacterial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms . **Braz. Dent. J.,** Ribeirão Preto**,** v. 13, n. 3, p. 155-161, 2002.

GOMES, B.P.F.A. et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. **Int. Endod. J.,** Oxford, v. 36, p. 267-275, 2003.

GOMES, B. P. F. A. et al. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, p. 71-76, 2004.

GOMES, B.P.F.A. et al. Molecular analysis of Filifactor alocis, Tannerella forsythia and Treponema denticola associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. **J. Endod.**, Baltimore, v. 32, n. 10, p. 937-940, 2006.

GONÇALVES, L.C.O. et al. Morphometrical analyses of cleaning capacity of hybrid instrumentation in mesial flattened root canals. **Aust. Endod. J.**, Sidney, v. 37, p. 99-104, 2010.

HANCOCK, H. et al. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North american population. **OralSurg. Oral Med. Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.,** Saint Louis, v. 9, n. 5, p. 579-586, May 2001.

KAIAOGLU, G.; ORSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Crit. rev. oral biol. med**, Boca Ratonv.15, n.5, p. 308- 320, 2004.

KRITHIKADATTA, J.; INDIRA, R.; DOROTHYKALYANI, A.L. Disinfection of dentinal tubules with 2% chlorhexidine, 2% metronidazole, bioactive glass when compared with calcium hydroxide as intracanal medicaments. **J. Endod.**, Baltimore, v. 33, n. 12, p. 1473-1477, Dec. 2007.

LIMA, K. C.; FAVA, L. R. G.; SIQUEIRA Jr., J. F. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. **J. Endod.**, Baltimore**,** v. 27, n. 10, p. 616-612, Oct. 2001.

LOPES, H. L.; SIQUEIRA JR., J. F. **Endodontia**: biologia e técnica, 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

MARKVART, M. et al. Micro-CT analyses of apical enlargement and molar root canal complexity. **Int. Endod. J.,** Oxford, v. 45, n. 3, p. 273-81, 2012.

MOHAMMADI, Z.; GIARDINO, L.; MOMBEINIPOUR, A. Antibacterial substantivity of a new antibiotic-based endodontic irrigation solution. **Aust. Endod. J.**, Sidney, v. 38, p. 26-30, 2012.

MURAD, C. et al. Bacterial leakage in root canals filled with calcium hydroxide paste associated with different vehicles. **Braz. Dent. J.,** Ribeirão Preto, v. 19, n. 3, p. 232-237, 2008.

NAIR, P. N. R. Falhas endodônticas: a patobiologia da periodontite apical pós-tratamento. In: COHEN, S.; HARGREAVES, K. M. (Ed.). **Caminhos da polpa**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 918-943, 2007.

PAVASKAR, R. et al. An in vitro study comparing the effectiveness of calcium hydroxide – and linezolid-based medicaments against *Enterococcus faecalis.* **J. Endod.**, Baltimore, v. 38, n. 1, p.95 -100, 2012.

PETERS, L.B.; WESSELINK, P.R.; MOORER, W.R. Penetration of bacteria in bovine root dentine in vitro. **Int. Endod. J.,** Oxford, v.33, p.28-36, 2000.

PINHEIRO, E.T. et al. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. **Oral Microbiol. Imunol.,** Copenhagen, v. 18, p. 100-103, 2003a.

PINHEIRO, E.T. et al. Microorganisms from canals of root filled teeth with periapical lesions. **Int. Endod. J.,** Oxford, v. 36, p. 1-11, 2003b.

RETAMOZZO et al. Mimimun contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate Enterococcus faecalis. **J. Endod.**, Baltimore, v. 36, n.3, p. 520-523, 2010.

ROACH, R. P.; HATTON. J. F.; GILLEPSIE, M. J. Prevention of the ingress of a known virulent bacterium into the root canal system by intracanal medicaments. **J. Endod.**, Baltimore, v.27, n. 11, p. 657-660, Nov. 2001.

RUDDLE, C. J. Shaping for success… everything old is new again. **Dent. Today.**, v. 25, p. 120-127, 2006.

SASSONE, L. M. et al. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test .**Braz. Dent. J.,** Ribeirão Preto, v. 14, n. 2, p. 99-102, 2003.

SEDGLEY, C.M. et al. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans**. Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 50, p. 575-583, 2005.

SEDGLEY, C. et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of Enterococos faecalis in root canals. **J. Endod.**, Baltimore, v.32, n. 3, p. 173-177, Mar. 2006.

SEDGLEY, C.; BUCK, G.; APPELBE, O. Prevalence of Enterococcus faecalis at multiple oral sites in endodontic patient using culture and PCR. **J. Endod.**, Baltimore, v. 32, n. 2, p. 104-109, Feb. 2006.

SIQUEIRA, J.F.; UZEDA, M. Desinfection by Calcium hidroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. **J. Endod.**, Baltimore, v. 22, n. 12, p. 674- 676, 1996.

SIQUEIRA, J.F.; UZEDA, M.; FONSECA, M.E.F.A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anerobic bacteria. **J. Endod.**, Baltimore, v. 22, n. 6, p. 308-310, 1996.

SIQUEIRA JÚNIOR, J.F.; RICHER, F. N. S. J.; ROÇAS, I.N. Análise prospectiva do índice de sucesso da terapia endodôntica usando uma estratégia antimicrobiana. **Rev. Bras. Odontol**., Rio de Janeiro, v. 16, n.1-2, p. 133-137, 2006.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F et al. Ability of chemomechanical preparation with either rotary instruments or self-adjusting file to disinfect oval-shaped root canals. **J. Endod.**, Baltimore, v. 36, n. 11, p. 1860-1865, 2010.

SPRATT, D.A. et al. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. **Int. Endod. J.,** Oxford, n. 34, p. 300-307, 2001.

STUART, C.H. et al. Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **J. Endod.**, Baltimore, v.32, n. 2, p.93-98, Feb. 2006.

SUNDE, P.T. et al. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. **J. Endod.**, Baltimore, v. 28, n. 4, p. 304-310, Apr. 2002.

SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D.; SJGREN, U. Microbiology analyses of teeth with endodontic treatment and outcome of conservative retreatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.,** Saint Louis, v. 85, p. 86- 93, 1998.

TEIXEIRA, L.M.; TRABULSI, L.R. *Enterococcus faecalis.* In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

TOMAZINHO, L.F.; AVILA-CAMPOS, M.J. Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in chronic endodontic infection. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.,** Saint Louis**.** v. 103, p. 285-288, 2007.

VIANNA, M.E. et al. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. **Oral Microbiol.Immmunol.**, v.22, p.411-418, 2007.

VIDANA, R. et al. *Enterococcus faecalis* infection in root canals -host- derived or exogenous source. **Appl. Microbiol.**, Washington, v.52, p.109-115, 2010.

WANG, C.S. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. **J. Endod.**, Baltimore, v. 33, n. 11, p. 1283-1288, Nov. 2007.

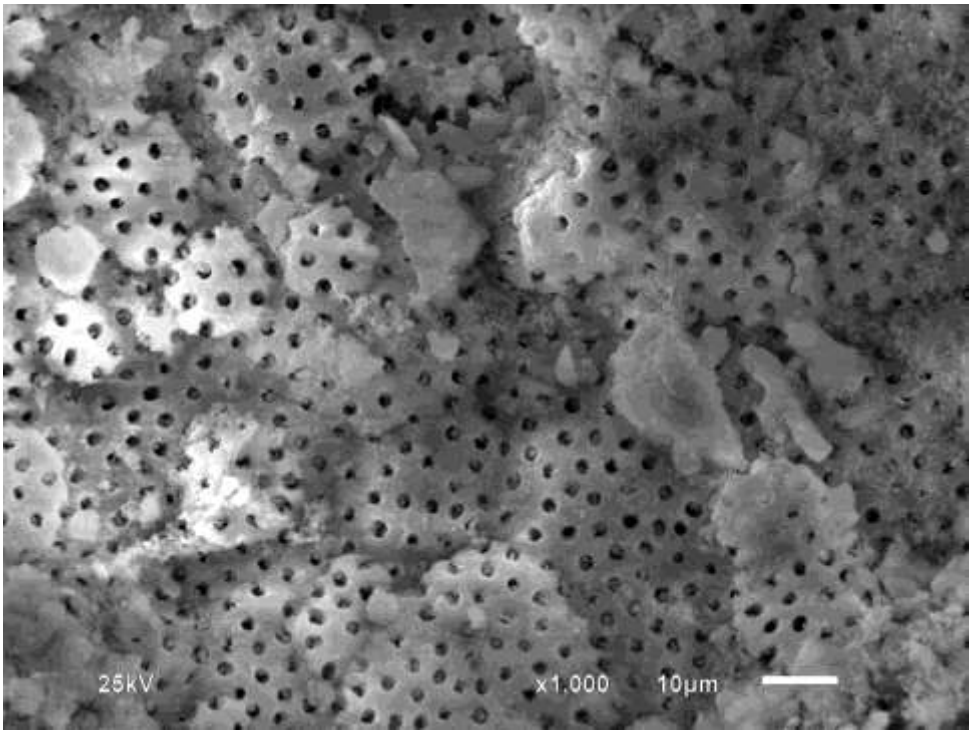
WILLIANS, J.M. et al. Detection and quantitation of *Enterococcus faecalis* by real-time pcr (qpcr), reverse transcription-pcr (rt-pcr), and cultivation during endodontic treatment. **J. Endod.**, Baltimore, v. 32, n. 8, 715-721, Aug , 2006.

ANEXO A - Caracterização morfológica das colônias -E. faecalis (ATCC 29212)

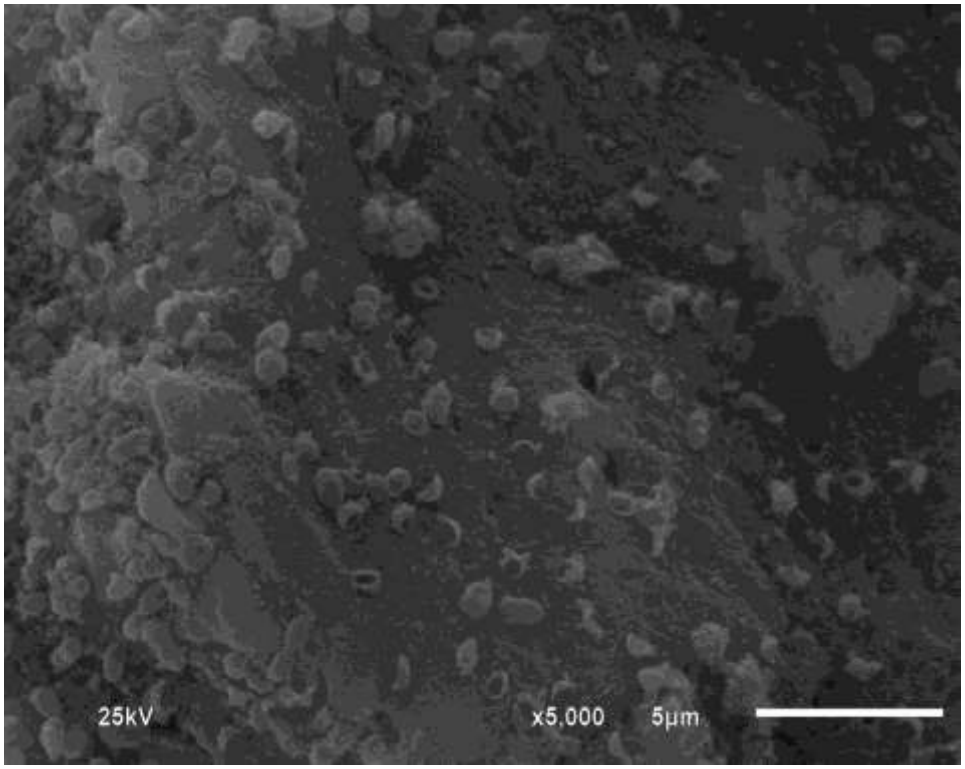
Figura 1 - Caracterização morfológica das colônias -*E. faecalis* (ATCC 29212)

ANEXO B - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura após 14 dias de contaminação dos espécimes com *E. faecalis.*

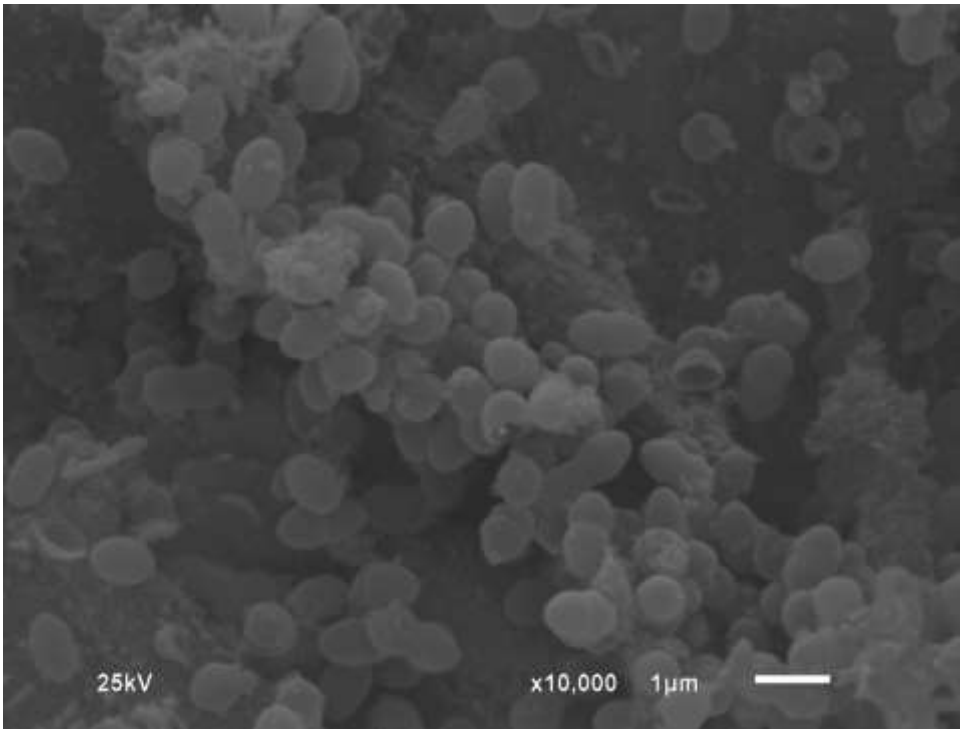
Eletromicrografia 1- aumento de 1000x.



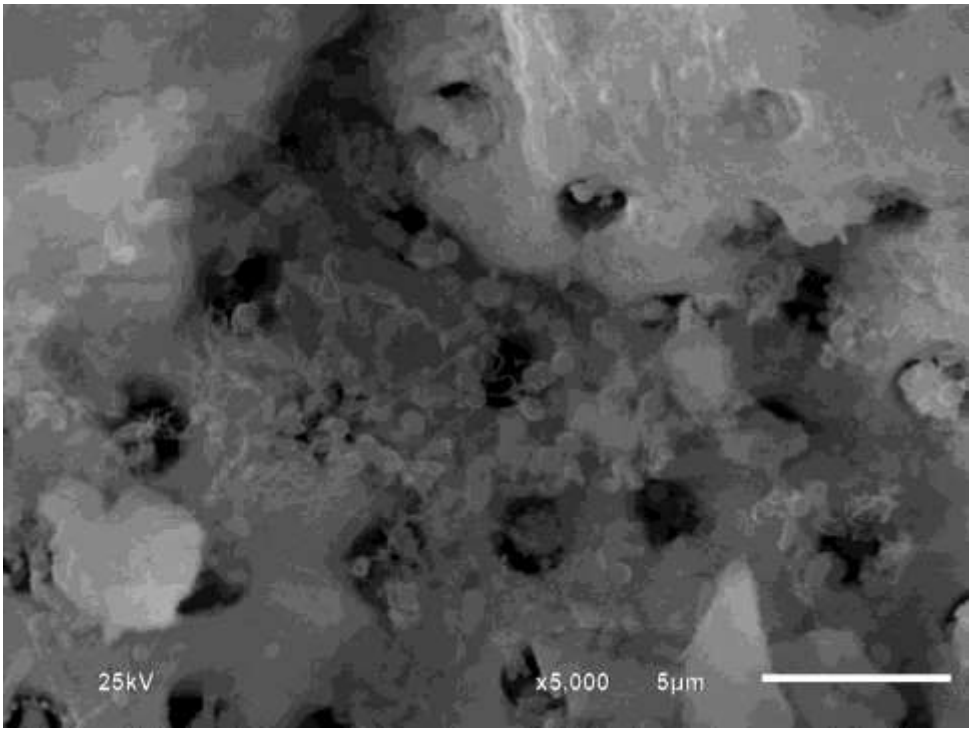
Eletromicrografia 2- aumento de 5000x



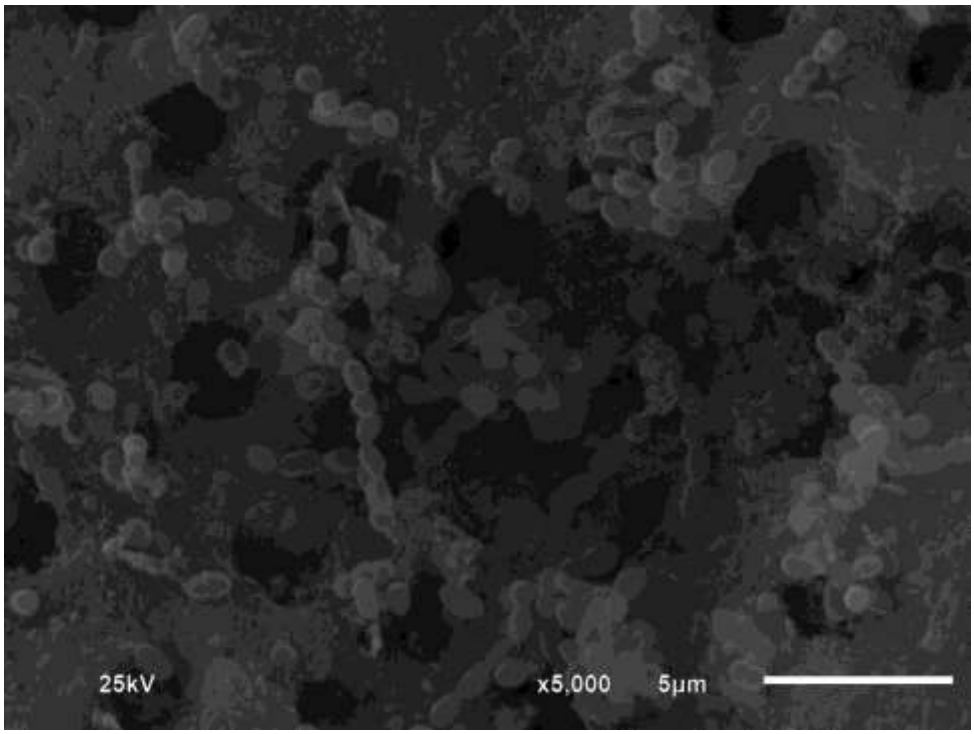
Eletromicrografia 3 -aumento de 10000x



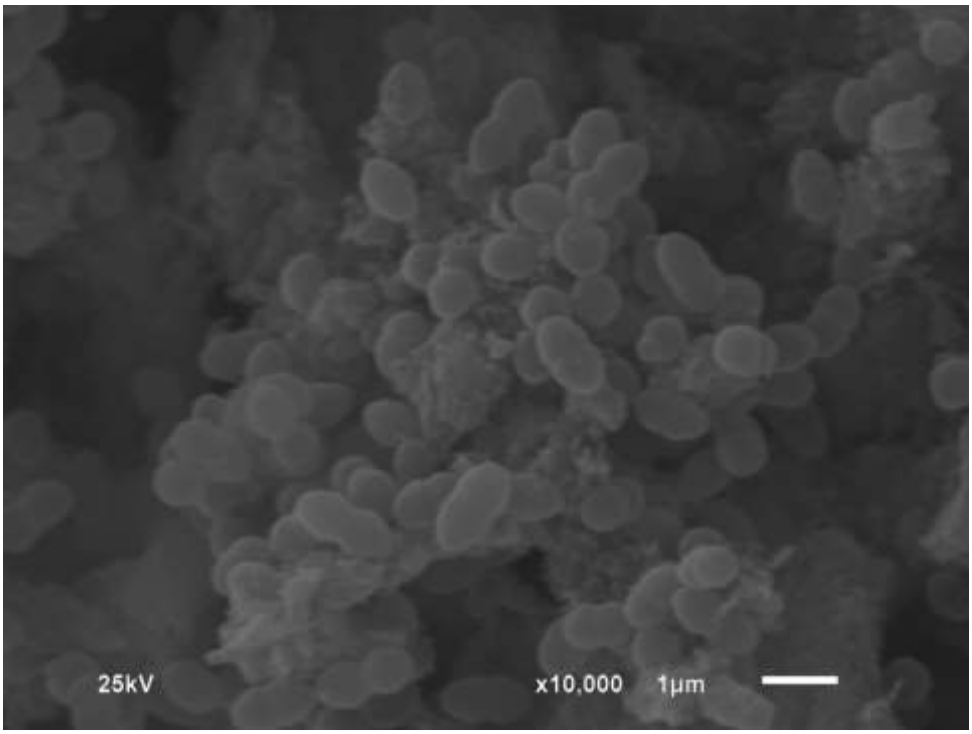
Eletromicrografia5 - aumento de 5000x.



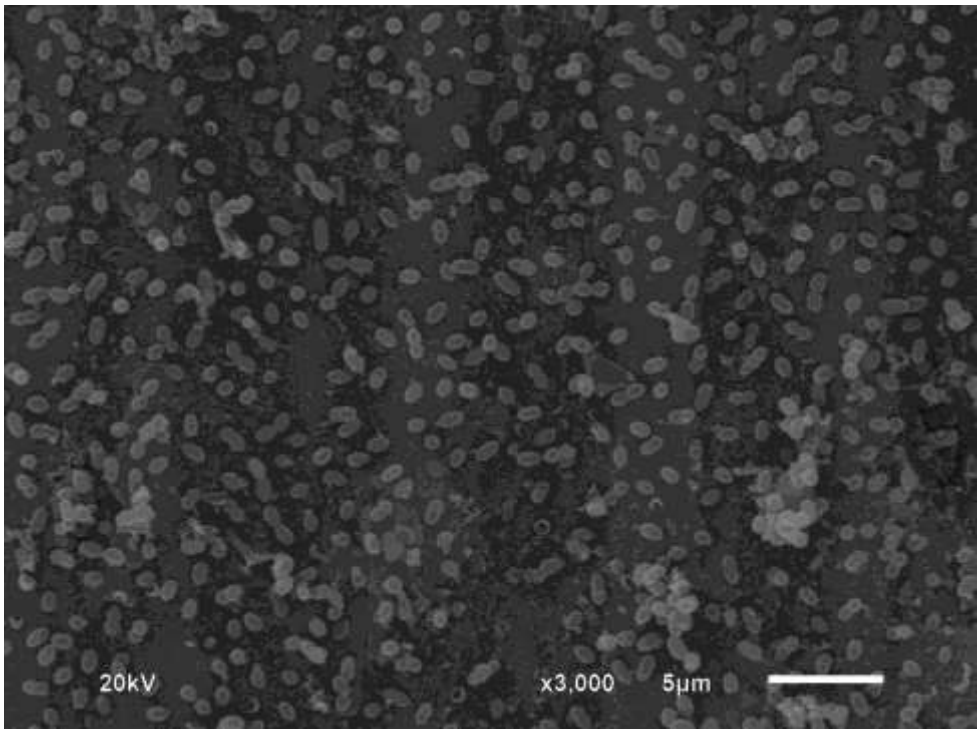
Eletromicrografia 5 - aumento de 5000x



Eletromicrografia 6 - aumento de 10000x.



Eletromicrografia7- aumento de 3000x.



ANEXO C- Valor de UFCS transformados em Log10 de todas as etapas do experimento.

Referência amostral	coleta A	coleta B	coleta C	coleta D
1	5,36	3,95	6,15	6,04
2	7,46	5,38	7,00	4,60
3	7,90	7,15	6,23	4,30
4	6,51	5,15	5,95	5,40
5	6,51	5,48	4,60	4,72
6	7,68	7,23	5,78	5,48
7	6,79	2,30	0	0
8	7,54	0	0	4,60
9	7,11	0	0	0
10	7,18	0	0	5,15
11	7,45	0	0	5,20
12	6,60	2	4,08	4,85
13	5,30	0	0	4,15
14	7,20	0	0	*
15	6,48	0	0	4,30
16	7,80	0	0	5,32
17	8,06	3,30	0	0
18	7,30	4,00	0	3,30
19	6,60	0	0	5,48
20	6,26	5,48	5,95	4,85
21	4,95	0	0	0
22	6,95	0	5,26	4,78
23	6,60	2,70	0	4,30
24	6,34	0	0	0
25	5,48	0	0	6,68
26	7,68	3,60	0	0
27	7,84	0	0	0
28	7,96	0	0	5,51
29	5,95	0	2,30	2,60
30	6,70	3,26	4,30	4,11
31	6,60	0	5,73	3,40
32	5,30	0	0	4,90
33	6,60	0	3,56	*
34	5,48	3,23	5,46	4,32

Nota: Espécimes: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 20 e 34 - grupo controle (solução salina 0,85%) Espécimes: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 - irrigação com NaOCl 5,25% + gel de clorexidina 2% como medicação intracanal.
Espécimes: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 e 33 - irrigação com NaOCl 5,25% + Ca(OH)2 como medicação intracanal. (*) Refere-se à perda amostral.