



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MAÍRA PEREIRA DE FARIAS COSTA

**EFETIVIDADE DO GLUCONATO DE CLOREXIDINA A
1% ASSOCIADO À PASTA DE HIDRÓXIDO DE
CÁLCIO (CALEN), COMO MEDICAÇÃO
INTRACANAL, NO COMBATE AO *Enterococcus
faecalis***

**ARACAJU
2006**

MAÍRA PEREIRA DE FARIAS COSTA

**EFETIVIDADE DO GLUCONATO DE CLOREXIDINA A
1% ASSOCIADO À PASTA DE HIDRÓXIDO DE
CÁLCIO (CALEN), COMO MEDICAÇÃO
INTRACANAL, NO COMBATE AO *Enterococcus
faecalis***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Núcleo de Pós-Graduação em Medicina
da Universidade Federal de Sergipe para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
da Saúde.

Área de Concentração: Estudos Clínicos
e Laboratoriais em Saúde.

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. RITA DE CÁSSIA TRINDADE

**ARACAJU
2006**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da Saúde/UFS

-
-
- C837e Costa, Maíra Pereira de Farias
Efetividade do gluconato de clorexidina a 1% associado à pasta de hidróxido de cálcio (Calen), como medicação intracanal, no combate ao *Enterococcus faecalis* / Maíra Pereira de Farias Costa. -- Aracaju, 2006. 107 f.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Trindade
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Núcleo de Pós-Graduação e Pesquisa em Medicina.
1. Tratamento endodôntico 2. Canal radicular 3. Medicação intracanal
4. Hidróxido de Cálcio 5. Clorexidina 6. *Enterococcus faecalis* 7. Endodontia 8. Odontologia I. Título

CDU 616.314.18-08

MAÍRA PEREIRA DE FARIAS COSTA

EFETIVIDADE DO GLUCONATO DE CLOREXIDINA A 1% ASSOCIADO À PASTA DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO (CALEN), COMO MEDICAÇÃO INTRACANAL, NO COMBATE AO *Enterococcus faecalis*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Sergipe, Núcleo de Pós-Graduação de Medicina, para defesa pública, junto ao Curso de Mestrado em Ciências da Saúde, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

APROVADA EM: 04/08/2006

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Rita de Cássia Trindade

Prof. Dr. Antônio Carlos Bombana

Profª Drª Alaíde Hermínia de Aguiar Oliveira

Ofertas de Aninha

*Eu sou aquela mulher
a quem o tempo
muito ensinou.*

*Ensinou a amar a vida.
Não desistir da luta.
Recomeçar na derrota.
Renunciar a palavras e pensamentos negativos.
Acreditar nos valores humanos.
Ser otimista.*

*Creio na solidariedade humana.
Creio na superação dos erros
e angústias do presente.
Creio nos milagres da ciência
e na descoberta de uma profilaxia
futura dos erros e violências
do presente.*

*Aprendi que mais vale lutar
do que recolher dinheiro fácil.
Antes acreditar do que duvidar.*

Cora Coralina.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ruti e Urandy,

*Que são dotados de uma força extraordinária para o trabalho e para a vida.
Ensinaram-nos, a mim, a Maycira e a Urandy Jr., meus irmãos, a superarmos todos
os obstáculos, até mesmo aqueles que muitas vezes nos pareciam insuperáveis.
Deram-nos o mais importante, o caminho para a conquista da liberdade, mesmo que
muitas vezes eles tivessem sofrido privações por isso.
Lembrem-se que nós, seres humanos, temos o livre arbítrio e podemos optar
sempre pela felicidade.*

Obrigada.

AGRADECIMENTOS

A Ana Carolina Morais Apolônio, que ensinou, com tanta paciência, as minhas primeiras atividades laboratoriais dentro da Microbiologia. Carol, serei sempre grata por tudo! Saudades...

Ao Prof. Dr. Antônio Paulino Sobrinho agradeço a oportunidade de ter estado na UFMG; isso foi fundamental para o meu crescimento.

Arivaldo Chagas, o que seria de mim se você não tivesse a fórmula mágica para que eu conhecesse o Dr. Siqueira Jr. e a Dra. Isabella Rôças? Obrigada por seu empenho em me ajudar, meu amigo!

Cândida, obrigada! Mesmo tendo invadido todo o seu espaço no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário, você ainda assim era tão doce!

Agradeço a Felipe Piedade e Gustavo Zelotti que foram tão atenciosos comigo no Rio de Janeiro e responderam a todos os meus "e-mails", esclarecendo-me grande parte das minhas dúvidas! A ajuda de vocês foi muito importante!

A Prof^a. Flávia, obrigada pelo carinho. Você é a energia necessária no mundo acadêmico. Com seu apoio incondicional, conseguiu realmente me levantar. Muito mais que obrigada!

Aos amigos Hermenegildo Jr., Yvana Goes, Hortência Aragão, Valdira Freitas e Paula Frassinetti, a grande ajuda na seleção dos casos; isso foi fundamental para realização deste projeto. Agradeço mais ainda pela força que me deram, fazendo-me acreditar que seria possível concluir tudo isso!

Meu amigo Hyder Aragão, agradeço-lhe por tudo o que me ensinou com tanta tranquilidade. Você parece nunca se cansar de fazer o bem. Admiro-te muito!

À Prof^a. Dra. Isabella Rôças. Obrigada pela disponibilidade em me receber e muito mais em me responder com tanto conhecimento e tanta paciência todas as minhas dúvidas. Devo-lhe a concretização do meu projeto que, mesmo não sendo grande, é o início de algo muito bom!

À Prof^a. Dra. Maria Jésia Vieira, por tanta responsabilidade e respeito por nós, alunos. A sua presença no Mestrado foi muito importante para mim. O meu particular agradecimento por sua orientação, por ter me acolhido tantas vezes quanto precisei nessa trajetória árdua.

À Prof^a. Maria Auxiliadora Roque e ao Prof. Dr. Luís Macedo Farias, por terem confiado em meu interesse, e me permitido frequentar o laboratório de Microbiologia Oral da Universidade Federal de Minas Gerais, obrigada.

Dr. Mário Leonardo, sempre acreditamos ser difícil o acesso aos grandes mestres. Que engano! Quando os homens carregam em seus corações tanta simplicidade tudo é possível. Obrigada pela orientação! Sempre que precisei, seu telefone estava ligado! Tenho profunda admiração por sua pessoa e por sua capacidade profissional.

À Prof^a. Dra. Maycira Costa e ao Prof. Dr. Kevin Telmer por terem me incentivado a iniciar algo novo, e pela colaboração nas correções desta dissertação com tanta paciência!

Ao amigo Mirabeau Ramos. Sempre terei a agradecer, pois a minha vida profissional passará sempre pelos seus ensinamentos, pela vontade de começar a cada dia, de aprender o novo, de ser atemporal!

Ao Prof. Dr. Murilo Marchioro, por sua dedicação; que aulas fantásticas! Quanta seriedade nesse compromisso! Enquanto alguns pareciam tão ocupados em suas atividades, você estava igualmente ocupado, mas dedicava muita atenção ao nosso momento. Fiquei encantada!

Ao Prof. Dr. Ricardo Gurgel, obrigada! Parece que é realmente necessária muita renúncia para o acontecimento da ciência. O seu empenho em nos proporcionar a oportunidade desse conhecimento é grandioso. Parabéns!

Prof^a. Dra. Rita de Cássia, minha orientadora. Obrigada por ter acreditado no meu projeto e ter-me dado a oportunidade de executá-lo no Laboratório de Microbiologia Aplicada. Obrigada por ter conseguido tanto para nossa Universidade; com seu empenho pessoal equipou o nosso laboratório de maneira tal, que tornou possível a realização desta pesquisa e de muitas outras.

Sandra, obrigada pela paciência em preparar tão organizadamente o material para as coletas e por ter me auxiliado a fazê-las até o fim; mesmo quando parecia que não íamos mais agüentar, você estava lá!

À minha amiga Sílvia Machado. Agradeço a grande ajuda na seleção dos casos, por ter me escutado esses dois anos, por ter tornado a minha carga de trabalho mais amena durante os nossos intervalos de trabalho quando podíamos, um pouco, sonhar e sorrir!

Tony e Patrícia. Agradeço-lhes a paciência que tiveram em tentar diminuir as minhas dificuldades e dúvidas dentro do laboratório. A contribuição de vocês foi muito importante!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A determinação associada à ética parece ser o pré-requisito necessário para a conquista dos nossos sonhos. Conviver com pessoas que acreditam nisso é uma dádiva. Durante a minha trajetória nesse novo mundo acadêmico, tive a oportunidade de conhecer uma pessoa excepcional, meu amigo Antônio Barreto Alves.

Toinho, necessidades básicas como educação, algumas vezes nos é tirada, pelas contingências dessa sociedade inoportuna em que vivemos. Mas o desejo do saber, esse ninguém nos rouba, e isso você tem, até de sobra! Você é admirável, superou todas as dificuldades e aqui está, em uma Universidade Pública, desejo de muitos, direito de poucos. Mas sei que para você isso não é o bastante e seus sonhos transcendem! Agradeço a sua participação incondicional neste projeto, realmente eu e você fizemos muito! Contudo, agradeço mais ainda por você ter-me permitido te conhecer! Você é realmente grande!

Obrigada, meu amigo.

À Prof^a. Dra. Guiomar Bahia, a quem profundamente admiro. Que inteligência notável! Obrigada por toda a sua dedicação em tornar minha estada na Universidade Federal de Minas Gerais a mais proveitosa possível dentro do mundo da pesquisa e da Endodontia. Obrigada por seu empenho incansável em nos ajudar. Realmente me sinto privilegiada de ter tido a oportunidade de tê-la como mestra.

RESUMO

Este estudo investigou a presença de *Enterococcus faecalis* em espécimes clínicos obtidos de canais radiculares de 25 dentes cuja terapia endodôntica fracassou e 10 casos de necrose pulpar, ambos associados a lesões perirradiculares assintomáticas. Assim como, avaliou a ação antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio (Calen) e dessa pasta associada à clorexidina a 1% , tanto *in vivo*, quanto *in vitro* nos casos em que foi possível resgatar a bactéria. Para análise microbiológica efetuou-se coleta dos canais radiculares em três etapas do tratamento endodôntico: antes do preparo químico-mecânico (primeira coleta), após a utilização da medicação intracanal (segunda coleta) e decorridas 72 horas da remoção da medicação (terceira coleta), período em que os canais permaneceram vazios. Dos 25 casos resistentes à terapia endodôntica, 18 apresentaram *E. faecalis*. Já nos 10 casos de necrose pulpar com lesão perirradicular, apenas em dois foi possível isolar o microrganismo. Os dados obtidos demonstraram que o percentual de ocorrência de *E. faecalis* foi mais elevado nos dentes que apresentavam tratamento resistente à terapia endodôntica do que nos casos de necrose pulpar associada à lesão perirradicular assintomática (72% X 20% respectivamente). Do total de casos contaminados por *E. faecalis*, nove foram medicados com pasta de hidróxido de cálcio (Calen) e 11 foram tratados com pasta de hidróxido de cálcio (Calen) associada à clorexidina a 1%. Dos nove casos medicados com hidróxido de cálcio, seis apresentaram *E. faecalis* após a medicação. Na terceira coleta, todos os nove casos apresentaram contaminação por *E. faecalis*. Dos 11 casos medicados com pasta de hidróxido de cálcio (Calen) associada à clorexidina a 1%, em três, isolou-se a bactéria na segunda coleta

microbiológica. Na terceira coleta, apenas em dois casos foi possível resgatar *E. faecalis*. Os resultados para a investigação *in vivo*, quanto à eficácia das medicações, não são conclusivos, mas sugerem que a associação da clorexidina a 1% à pasta de hidróxido de cálcio apresenta uma melhor eficácia no combate ao *E. faecalis*. Para que seja feita qualquer inferência nessa direção, devemos considerar um maior *n* amostral.

Amostras de *E. faecalis* de 21 dentes foram utilizadas no teste por exposição direta (*in vitro*). Os dois medicamentos apresentaram ação antimicrobiana sobre o *E. faecalis*, não havendo diferença estatística significativa entre as pastas.

PALAVRAS-CHAVE: Clorexidina; *Enterococcus faecalis*; Hidróxido de cálcio; Canal radicular.

ABSTRACT

This study investigated the occurrence of *Enterococcus faecalis* in clinical specimens obtained from 25 cases in which endodontic treatment failed and 10 cases of primary endodontic infection, both of which are associated with asymptomatic apical periodontitis. As well, in cases in which it was possible to recover this bacterium, the antibacterial actions of two medications (i) calcium hydroxide based paste (Calen), and (ii) the same mixed with 1% chlorhexidine, were evaluated both *in vivo* and *in vitro*. Microbiological analysis was performed on the samples collected in the root canal in three phases of the root canal treatment, as follows: (1) before the chemomechanical instrumentation; (2) after using the intracanal dressing; and (3) after 72 hours of having removed the intracanal dressing, at this period the root canals were empty. The samples were treated according to standard microbiological procedures. The results show that of the twenty-five cases of endodontic re-treatment, *E. faecalis* occurred in eighteen, and in ten cases of asymptomatic primary endodontic infection, *E. faecalis* occurred in only two. Also, the results show a higher percentage of occurrence of *E. faecalis* in teeth in which endodontic treatment failed (72%) compared with cases of primary endodontic infection associated with asymptomatic apical periodontitis (20%). Of the total cases contaminated with *E. faecalis*, nine were treated with calcium hydroxide based paste (Calen). Of these, six showed the occurrence of *E. faecalis* on the second sampling, and all the nine cases showed occurrence of this bacterium on the third sampling. Of the total cases contaminated with *E. faecalis*, eleven were treated with calcium hydroxide based paste (Calen) mixed with 1% chlorhexidine. Of these, three showed occurrence of *E. faecalis* on the second sampling, and two showed

occurrence of this bacterium on the third sampling. These results are not conclusive for *in vivo* experiments, but suggest that calcium hydroxide based paste mixed with 1% chlorhexidine combats *E. faecalis* more effectively than calcium hydroxide alone; however, more certainty will require a larger sample size.

For the direct exposure experiment (*in vitro*), samples of 21 teeth were analyzed. The results show effective antibacterial actions of the two medications to combat *E. faecalis* -Statistically similar at 95% confidence level.

KEY WORDS: Chlorhexidine; *Enterococcus faecalis*; Calcium hydroxide; Root canal.

ABREVIATURAS

ACE - Adhesin of collagen from enterococci

ASA - Aggregation substance gene

BHI - Brain heart infusion

Ca (OH)₂ - Hidróxido de cálcio

CCCP - M.clorofenildazona carbonilcianida

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

GEL- gelatinase

IKI - Iodeto de potássio iodetado

IRM- Material restaurador intermediário

LPS - Lipopolissacarídio

LAP- L-leucina-β-naftilamida

NaCl - Cloreto de sódio

NaOCl - Hipoclorito de sódio

NNIS - National Nosocomial Infection Surveillance

PCR - Polymerase chain reaction

PCR q - Qualitative polymerase chain reaction

PRP - Paramonoclorofenol, rinosoro e polietilenoglicol

PYR- L-pirrolidonil-β-naftilamida

SPR - Protease serina

TCLC- Termo de concordância livre e consciente

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Coleta do espécime clínico.....	61
Figura 2. Teste de exposição direta.....	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Ocorrência de <i>E. faecalis</i> nos casos de necrose pulpar com lesão perirradicular e casos de tratamento endodôntico resistente à terapia endodôntica (reintervenção).....	70
Gráfico 2. Avaliação percentual da atividade antimicrobiana segundo o tipo de pasta na avaliação com 7 dias de exposição.....	79
Gráfico3. Avaliação percentual da atividade antimicrobiana segundo o tipo de pasta na avaliação com 14 dias de exposição.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência de <i>E. faecalis</i> em casos de necrose pulpar associada à lesão perirradicular.....	68
Tabela 2. Ocorrência de <i>E. faecalis</i> nos casos resistentes à terapia endodôntica.....	69
Tabela 3. Resultados após as três coletas realizadas no grupo medicado com pasta Calen.....	71
Tabela 4. Resultados obtidos após as três coletas realizadas no grupo medicado com pasta de hidróxido de cálcio (Calen) associada à clorexidina a 1% como medicação intracanal.....	73
Tabela 5. Efeito antimicrobiano da pasta Calen e da associação dessa pasta à clorexidina a 1% com sete dias de exposição.....	74
Tabela 6. Efeito antimicrobiano da pasta Calen e da associação dessa pasta à clorexidina a 1% com 14 dias de exposição.....	75
Tabela 7. Resultados do grupo controle.....	76
Tabela 8. Avaliação da ocorrência de <i>E. faecalis</i> segundo o tipo de amostra.....	78
Tabela 9. Avaliação da positividade de <i>E. faecalis</i> segundo o tipo de pasta com 7 dias de exposição.....	79
Tabela 10. Avaliação da ocorrência de atividade antimicrobiana segundo o tipo de pasta com 14 dias de exposição.....	80

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 Microbiota endodôntica.....	23
2.1.1 O Gênero <i>Enterococcus</i>	31
2.2 Medidas de controle da infecção.....	33
2.3 Relação hospedeiro x parasita: explicando o insucesso.....	41
2.4 Clorexidina.....	45
3 OBJETIVOS.....	53
3.1 Objetivo geral.....	53
3.2 Objetivos específicos.....	53
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	54
4.1 Casuística.....	54
4.1.1 Seleção de pacientes.....	54
4.1.2 Critérios de inclusão.....	54
4.1.3 Critérios de exclusão.....	55
4.2 Métodos.....	55
4.2.1 Procedimentos clínicos.....	55
4.2.1.1 Coletas de espécimes clínicos.....	57
4.2.1.2 Instrumentação dos canais radiculares.....	58
4.2.1.3 Medicação intracanal.....	58
4.2.2 Procedimentos laboratoriais.....	61
4.2.2.1 Isolamento.....	61
4.2.2.2 Testes para caracterização do gênero <i>Enterococcus</i>	62

4.2.2.3 Testes para identificação da espécie <i>E. faecalis</i>	63
4.2.2.4 Validação dos testes convencionais adotados nos experimentos:	
Identificação automatizada.....	64
4.2.2.5 Método de exposição direta (<i>in vitro</i>).....	64
5 RESULTADOS	68
5.1 Ocorrência de <i>Enterococcus faecalis</i>	68
5.2 Eficácia do tratamento.....	70
5.2.1 Tratamento com pasta de hidróxido de cálcio (grupo 1).....	71
5.2.2 Tratamento com pasta de hidróxido de cálcio associado à Cloroxidina a 1% (grupo 2).....	72
5.2.3 Teste de exposição direta.....	73
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
6.1 Métodos Estatísticos.....	77
6.2 Resultados.....	77
6.2.1 Avaliação da ocorrência de <i>E. faecalis</i> segundo o tipo de amostra.....	77
6.2.2 Avaliação da positividade de <i>E. faecalis</i> segundo o tipo de pasta (<i>in vitro</i>).....	78
7 DISCUSSÃO	82
8 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	98

1 INTRODUÇÃO

A estrutura dental possui uma complexa anatomia interna. Compõe-se de um sistema de canais radiculares que aloja em seu interior a polpa dental, tecido conjuntivo frouxo permeado por vasos sangüíneos e fibras nervosas que se encontra confinado em um ambiente de baixa complacência. Essa particularidade dificulta o suprimento sangüíneo adequado e o recrutamento de células de defesa após a agressão a esse tecido, tornando qualquer processo fisiopatológico diferente dos demais tecidos do organismo e colocando em situação crítica sua capacidade de reagir. A consequência, quase sempre inevitável, é a falência do órgão pulpar, levando à completa necrose tecidual que, na maioria das vezes, será acompanhada pela colonização microbiana. A vasta quantidade de microrganismos existentes na cavidade oral encontra-se em uma relação de caráter anfibiótico com o hospedeiro. A partir do momento em que esses microrganismos adentram a cavidade pulpar, encontram um ambiente favorável para desenvolver a sua patogenicidade. Se medidas terapêuticas não são instituídas, uma infecção se instala.

A terapia endodôntica tem como objetivo debelar a infecção intracanal, consistindo de um preparo biomecânico do sistema de canais radiculares associado a substâncias químicas dotadas de propriedades bactericidas, medicação intracanal e posterior obturação desse sistema de canais. A chave do tratamento bem sucedido é a remoção desse reservatório de infecção (WALTON; TORABINEJAD, 1997).

Entretanto, na prática clínica, nem sempre esse objetivo é completamente alcançado, devido à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares, que limita a penetração dos agentes terapêuticos em todas as áreas do sistema. Como resultado, alguns microrganismos podem permanecer nos túbulos dentinários ou em outras irregularidades do sistema de canais (BIFFI; RODRIGUES, 1989).

A permanência de espécies microbianas no sistema de canais radiculares após a terapia endodôntica pode contribuir para a manutenção da infecção perirradicular, e por consequência gerar o insucesso. Análise da microbiota persistente nos casos de insucesso endodôntico tem sido realizada criteriosamente, não só por meio de métodos de cultura tradicional, como também por modernos métodos moleculares.

Resultados de recentes pesquisas sugerem que o *Enterococcus faecalis*, desempenha papel preponderante nos casos de tratamentos endodônticos resistentes à terapia endodôntica. Assim, acredita-se que um melhor esclarecimento da microbiota existente nesses casos pode fornecer subsídios para combatê-la com mais eficiência, aproximando o profissional do sucesso desejado.

O hidróxido de cálcio é a medicação intracanal mais amplamente utilizada na Endodontia, porém, no combate ao *E. faecalis*, não tem apresentado resultados satisfatórios. Atuais investigações têm demonstrado que a clorexidina parece atuar mais efetivamente sobre essa espécie bacteriana do que o hidróxido de cálcio. Sendo a redução ou eliminação da carga microbiana existente no interior do sistema de canais radiculares condição *sine qua non* para o bom êxito do tratamento

endodôntico, faz-se importante a avaliação da eficácia desses produtos em relação a esse microrganismo resistente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microbiota endodôntica

Relatos da associação microbiana à patologia pulpar advêm do final do século XIX, quando Miller (1894), a partir de material coletado de cavidades pulpares de dentes portadores de polpa necrótica, encontrou três tipos morfológicos básicos de células bacterianas: cocos, bacilos e espirilos.

Muitos anos depois é que Kakehashi, Stanley e Fitzgerald (1965) estabeleceram a associação entre microrganismos e a etiologia das doenças de natureza endodôntica. Esses pesquisadores expuseram ao meio bucal as polpas dentais de ratos que nasceram e foram criados em ambiente que permitiu o contato com microrganismos e animais da mesma espécie, entretanto gnotobióticos. Após certo período, os primeiros animais não só apresentaram necrose pulpar, como também desenvolveram abscessos e lesões perirradiculares. Já os gnotobióticos apresentavam, na região de exposição pulpar, reparo tecidual com neoformação dentinária. Concluiu o estudo que a presença ou a ausência de microrganismos é fator determinante para o estabelecimento das doenças de natureza endodôntica. Indubitavelmente, microrganismos e seus produtos tóxicos estão associados à indução ou a perpetuação das doenças pulpares e perirradiculares (SIQUEIRA JR; RÔÇAS; LOPES, 2004b).

Até meados dos anos 70, a maioria dos estudos microbiológicos das infecções endodônticas indicava o predomínio de bactérias anaeróbias facultativas e

aeróbias. Com a evolução das técnicas de cultivo em anaerobiose, foi possível entender melhor a microbiota constituinte do sistema de canais radiculares. Aplicando as novas técnicas, Sundqvist¹ (1976 apud SIQUEIRA JR.; RÔÇAS; LOPES, 2004a) pesquisou a microbiota endodôntica de 32 dentes com necrose pulpar, desvitalizados por trauma. Em 18 deles, todos associados à lesão perirradicular, foi possível resgatar 90% de bactérias anaeróbias estritas, confirmando o papel importante desempenhado por bactérias na etiopatogenia dessas lesões.

Fabricius et al. (1982) expuseram ao meio bucal, por uma semana, a cavidade pulpar de 24 dentes de três macacos e, subsequente, selaram essas cavidades. Para analisar a evolução da infecção pulpar, foi realizada coleta microbiológica nos dentes dos animais ao final de 90, 180, e 1060 dias. Os autores constataram que as bactérias anaeróbias facultativas estavam em maior proporção nas fases iniciais da infecção, porém, a partir dos 180 dias, havia uma predominância de bactérias anaeróbias estritas. Na coleta final, após os 1060 dias, 85% a 98% dessa microbiota era composta por bactérias anaeróbias estritas. Os resultados aclararam que com o passar do tempo decorrem mudanças ecológicas no sistema de canais radiculares condicionando alterações na microbiota.

Para verificar a microbiota oriunda de 65 canais radiculares que apresentavam necrose pulpar e lesão perirradicular, Sundqvist (1992) coletou amostras de 65 canais radiculares. Nessas amostras, a espécie bacteriana mais isolada foi *Fusobacterium nucleatum*, presente em 48% dos casos. Também foram

¹ Sundqvist, G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps (Dissertation). Umea, Sweden: University of Umea, 1976.

resgatadas *Prevotella intermedia* (34%), *Peptostreptococcus micros* (34%), *Peptostreptococcus anaerobius* (31%), *Eubacterium alactolyticum* (34%), *Wolinella recta* (25%) e *Eubacterium lentum* (31%). O crescimento de uma população bacteriana de natureza mista pode depender de uma cadeia alimentar cujos produtos metabólicos de uma determinada espécie suprem as necessidades nutricionais de outros membros dessa população. Essas interações bacterianas funcionam, também, como determinantes ecológicos importantes na constituição da microbiota endodôntica. Nesse mesmo estudo, foi possível observar uma forte inter-relação positiva entre algumas espécies bacterianas, mais notavelmente entre, *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas endodontalis*, *Wolinella recta* e *Selenomonas Sputigena*. Também foram observadas relações positivas entre *Prevotella intermedia* e *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius* e *Eubacteria*. A *Prevotella endodontalis*, que é uma espécie bacteriana especificamente relacionada à infecção endodôntica, encontrava-se associada ao *F. nucleatum*, *E. alactolyticum*, *Wolinella ssp* e *Lactobacillus ssp* anaeróbio. *Eubacteria* estava associada positivamente ao *Peptostreptococcus ssp* e *P. intermedia*. Esses resultados indicam que, durante o curso da infecção, fortes interações se desenvolvem entre as diferentes espécies, e mudanças na microbiota ocorrem como resultado dessa interação.

Mais recentemente, Lana et al. (2001), investigando a microbiota de 31 canais com necrose pulpar, *in vivo*, observaram que os gêneros mais freqüentemente recuperados foram *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* e *Peptostreptococcus*. Quanto às leveduras, as mais isoladas foram a *Candida* e a *Saccharomyces*. Corroborando os achados anteriores

(SUNDQVIST, 1992), o *Fusobacterium nucleatum* também foi a espécie mais prevalente, estando presente em 35% dos casos.

As pesquisas realizadas sobre a microbiota endodôntica de dentes com necrose pulpar tornam evidente a natureza polimicrobiana dessa infecção, havendo um predomínio de bactérias anaeróbias (FABRICIUS et al., 1982; LANA et al., 2001; LE GOFF et al., 1997; SUNDQVIST, 1992). A infecção endodôntica que ocorre durante a necrose pulpar é denominada de infecção endodôntica primária. De fato, a composição da microbiota endodôntica varia de acordo com os diferentes tipos de infecção, daí a sua natureza semi-específica (SIQUEIRA JR.; RÔÇAS; LOPES, 2004a).

A despeito da realização adequada das medidas de controle da infecção durante a terapia endodôntica, uma infecção persistente pode se desenvolver. Microrganismos causadores de tal tipo de infecção usualmente estão presentes em áreas do canal inacessíveis aos procedimentos de desinfecção; são resistentes aos efeitos dos agentes químicos empregados, ou esses agentes são neutralizados pelas condições ambientais na região do canal onde os microrganismos estão alojados. Um outro fator a ser considerado é a possibilidade de uma infecção que pode ocorrer durante a intervenção endodôntica, por falhas na manutenção da cadeia asséptica, entre as sessões do tratamento, ou mesmo após a conclusão da terapia endodôntica. Sendo assim, microrganismos podem adentrar no canal radicular e, se conseguirem sobreviver, instala-se uma infecção, que pode ser de difícil tratamento (SIQUEIRA JR.; RÔÇAS; LOPES, 2004a).

Com o objetivo de investigar a microbiota primária e persistente de canais radiculares infectados, por meio de métodos de cultura, Gomes et al. (2004) selecionaram 60 dentes de pacientes com diagnóstico de lesões resistentes à terapia endodôntica e necrose pulpar com lesão perirradicular. Os canais com infecção primária (41/60) apresentaram bactérias dos gêneros *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Gamella*, *Porphyromonas* e *Lactobacillus*. Dos casos de reintervenção endodôntica (19/60), isolaram-se *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Prevotella* e *E. faecalis*. Dos 13 dentes que se isolaram microrganismos, nos casos de reintervenção, *E. faecalis* estava presente em 46% dos dentes, em cultura pura. Encontrou-se clara diferença na composição microbiana entre os casos de infecção primária e persistente. A microbiota primária apresentou-se mista, com bactérias Gram negativas e Gram positivas, a maioria anaeróbia, com permanência de mais de três espécies por canal. Já nos casos submetidos à reintervenção endodôntica, houve predominância de bactérias anaeróbias facultativas e bactérias Gram positivas, e esses canais eram colonizados normalmente por uma ou duas espécies.

Nos últimos vinte anos, a Endodontia preocupou-se mais com a microbiota anaeróbia estrita, especialmente com as bactérias Gram negativas, devido a seu predomínio nos casos de infecções endodônticas primárias (CHÁVES DE PAZ et al., 2003). No entanto, os casos de tratamento resistente à terapia endodôntica têm apresentado uma realidade diferente. A microbiota desses canais tem sido atualmente analisada mais incisivamente para melhor esclarecer as causas do insucesso do tratamento endodôntico (MOLANDER et al., 1998; SUNDQVIST et

al., 1998 PECIULIENE et al., 2001; PINHEIRO et al., 2003; SIQUEIRA Jr.; RÔÇAS, 2004; RÔÇAS et al., 2004).

Nesse sentido, investigando os aspectos microbiológicos de dentes com persistência de lesão perirradicular apesar do tratamento endodôntico, Sundqvist et al. (1998) constataram na microbiota uma composição diferente daquela vista em dentes com necrose pulpar; constituía-se de um número menor de espécies microbianas, com proporções aproximadamente iguais de bactérias facultativas e anaeróbias estritas, ou mesmo se compunha de uma só espécie (monoinfecção). Esse mesmo estudo observou a presença de *E. faecalis* em 38% (9 de 24) dos dentes colonizados por microrganismos.

Nessa mesma ordem de idéias, Molander et al. (1998) investigaram 100 casos de tratamentos endodônticos concluídos há mais de quatro anos, com persistência de periodontite apical. A presença de microbiota intracanal foi demonstrada em 68 dos 100 dentes estudados, havendo predominância de 69% de bactérias anaeróbias facultativas, dentre elas o *Enterococcus ssp.* isolado em 32 dentes.

Ao realizarem uma investigação microbiológica em 25 dentes com periodontite apical assintomática cujo tratamento endodôntico fracassou, Peciulienė et al. (2000) observaram que 20 apresentavam colonização microbiana e 14 (70%) deles apresentavam-se colonizados por *E. faecalis*. Essa bactéria foi encontrada também em cultura pura em cinco dentes, ou como maioria dos componentes da microbiota endodôntica daqueles canais.

Ainda pesquisando a ocorrência de *E. faecalis* em canais com periodontite apical, previamente tratados endodonticamente, Peciulene et al. (2001) investigaram a microbiota de 40 dentes, e recuperaram microrganismos de 33 espécimes clínicos. *E. faecalis* estava presente em 64% dos casos, sendo 33% em cultura pura. Em 4,4% dos casos constatou-se a presença de *Candida albicans*.

Pinheiro et al. (2003) investigando também canais já tratados com persistência de periodontite apical, isolaram microrganismos em 51 dos 60 dentes estudados: 57,4% eram anaeróbios facultativos e 83,3%, Gram positivos. A espécie prevalente foi o *E. faecalis*, encontrado em 52,94% dos canais. Em 18 dentes, essa bactéria foi isolada em cultura pura. Anaeróbios obrigatórios foram recuperados em 42,6% dos casos, sendo o gênero *Peptostreptococcus* o mais isolado.

Métodos moleculares utilizados, atualmente, para a detecção e identificação de microrganismos, têm oferecido resultados mais precisos que os métodos de cultivo tradicionais, ajudando no esclarecimento da microbiota endodôntica. A utilização desses métodos permitiu ao pesquisador observar maior incidência de *E. faecalis* nos casos de infecções primárias e persistentes (SIQUEIRA Jr. et al., 2002; RÔÇAS; SIQUEIRA Jr.; SANTOS, 2004; SIQUEIRA Jr.; RÔÇAS, 2004).

Por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*-PCR), Siqueira Jr. et al. (2002) constataram a prevalência de *Actinomyces*, *Streptococcus* e *E. faecalis* no sistema de canais radiculares de 53 dentes. Vinte e sete deles apresentavam diagnóstico de abscesso perirradicular agudo. Foram detectados *Streptococcus* em 22,6% das amostras, *Actinomyces* em

9,4% e *E. faecalis* em 7,5% .Considerando as lesões assintomáticas, as espécies mais prevalentes foram as seguintes: *Streptococcus intermedius* em 11,5% dos casos, *E. faecalis* em 11,5% e *Streptococcus anginosus* em 7,7%.

Já em 2004, Siqueira Jr. e Rôças, ainda utilizando a PCR, verificaram a natureza da microbiota do sistema de canais radiculares de dentes previamente tratados endodonticamente com lesão persistente e constataram que as 22 unidades dentárias examinadas apresentavam bactérias. O *E. faecalis* foi detectado em 77% dos casos. O exame da microbiota endodôntica por meio de técnicas moleculares permitiu estreitar a associação entre o fracasso endodôntico e a presença de microrganismos, uma vez que foi possível detectar microrganismos em todos os dentes em estudo.

Rôças, Siqueira Jr. e Santos (2004) realizaram uma análise microbiológica usando *nested* PCR em diferentes tipos de infecção endodôntica, para averiguar as possíveis associações entre essas infecções e a presença do *E. faecalis*. Para tal, investigaram 21 dentes com necrose pulpar e lesão perirradicular assintomática e detectaram esse microrganismo em sete amostras. Dos 10 dentes que apresentavam necrose pulpar com lesão perirradicular aguda, apenas em uma amostra detectou-se o *E. faecalis*. Também foram examinados 19 dentes com abscesso perirradicular agudo e só foi possível detectar essa bactéria em um dos casos. Contudo, quando 30 dentes já tratados endodonticamente com presença de lesão perirradicular assintomática, foram analisados, 20 apresentaram *E. faecalis*. Os resultados desse estudo indicam que o referido microrganismo está significativamente mais associado a casos de infecções endodônticas primárias assintomáticas que àqueles casos de sintomatologia clínica presente. Porém, a

maior probabilidade de encontrá-lo é, realmente, nos casos de fracasso da terapia endodôntica.

2.1.1 O Gênero *Enterococcus*

Os membros do gênero *Enterococcus* são cocos Gram positivos que se organizam tanto isoladamente quanto aos pares ou em cadeias curtas. Algumas vezes, as células apresentam formas cocobacilares, quando a coloração de Gram é realizada a partir de colônias crescidas em meio sólido, mas tendem a ser ovóides quando crescem em caldo tioglicolato. Os *Enterococcus* são bactérias anaeróbias facultativas e apresentam um ótimo crescimento a 35° C. Entretanto, podem crescer a temperatura de 10° a 45° C (TEIXEIRA; FACKLAM, 2003).

Esses microrganismos são capazes de tolerar concentrações elevadas de sais (6,5% de NaCl), hidrolizam esculina em presença de 40% de sais biliares, L-leucina- β -naftilamida (LAP) e a maioria hidroliza o L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) ; algumas espécies são móveis. Apesar de não possuírem a enzima citocromo, às vezes, o teste da catalase é positivo. Isso se deve à produção de uma pseudocatalase, que caracteriza uma ligeira liberação de oxigênio quando a colônia é colocada em contato com o peróxido de hidrogênio. Glicose e outros carboidratos são metabolizados por fermentação e o ácido láctico é o principal produto final desse metabolismo. A maioria das amostras apresenta glicerol associado à parede celular. Esse antígeno de ácido teicóico é identificado como o antígeno do grupo D de Lancefield. O conteúdo G+C do DNA varia de 37 mol% a 45 mol% (TEIXEIRA; FACKLAM, 2003).

Atualmente compondo o gênero *Enterococcus* são reconhecidas 22 espécies. Teixeira e Facklam (2003) separaram essas espécies em cinco grupos fisiológicos baseados na produção de ácidos a partir de manitol e sorbose, e na capacidade de decarboxilar a arginina. O *E. faecalis* se encontra no grupo II, juntamente com quatro outras espécies. As cinco espécies apresentam como características fenotípicas comuns a formação de ácido em caldo manitol e a hidrólise da arginina, porém não formam ácido em caldo sorbose e possuem ainda variações quanto à utilização do sorbitol. *E. faecalis* é o único membro que não fermenta arabinose, mas tolera telurito e utiliza piruvato.

Espécies do gênero *Enterococcus* podem ser encontradas em diversos ambientes, tais como solo, alimentos, água, plantas, e animais. Em humanos, assim como em outros animais, essa bactéria coloniza predominantemente o trato gastrointestinal e é menos comum em outros sítios, sendo o *Enterococcus faecalis* a espécie enterocócica isolada com mais frequência dentre os espécimes clínicos humanos, representando 80 a 90% dos isolados (TEIXEIRA; FACKLAM, 2003).

De acordo com os relatos do *National Nosocomial Infections Surveillance System* (NNIS, 1986-1997), *Enterococcus ssp.* é um dos cinco patógenos nosocomiais mais comumente isolados dos maiores sítios de infecção em unidades de terapia intensiva nos Estados Unidos. Essa bactéria se encontra presente em 12,8% das infecções sangüíneas, em 14,1% das infecções do trato urinário, e é o patógeno mais isolado dos sítios de infecções cirúrgicas, encontrado em 15,3% dos casos.

O *Enterococcus ssp.* também ocorre em vários sítios da cavidade oral (SEDGLEY; GWENDOLYN; APPELBE, 2006). Essa bactéria parece ocupar um lugar de destaque na microbiota endodôntica, principalmente nos casos de fracasso do tratamento endodôntico associado à presença de lesões perirradiculares (MOLANDER et al. 1998; SUNDQVIST et al., 1998; PECIULIENE et al., 2001; RÔÇAS; SIQUEIRA JR.; SANTOS, 2004; SEDGLEY et al., 2006).

Reconhecendo o papel potencial do *E. faecalis* no insucesso do tratamento endodôntico, alguns estudos têm investigado uma estratégia de controle da infecção causada por essa bactéria (FERRAZ et al., 2001; BAKER et al., 2004; HEMS et al., 2005; PORTENIER et al., 2006).

2.2 Medidas de controle da infecção

A infecção endodôntica difere de outras que acometem as demais regiões do organismo. A partir do momento em que se instala, ela não é passível de remissão espontânea pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. Isso ocorre dado o fato de que após a necrose pulpar o sistema endodôntico fica desprovido de circulação sanguínea que possa levar à região células de defesa necessárias ao combate do processo infeccioso. Devido à localização anatômica da infecção, ela apenas pode ser tratada por meios químicos e mecânicos. Para tal fim, realiza-se um preparo químico-mecânico, que tem por objetivo promover a limpeza, modelagem e desinfecção do canal radicular, por meio do emprego de substâncias ou soluções químicas auxiliares (SIQUEIRA JR.; RÔÇAS; LOPES, 2004c).

Com o objetivo de avaliar a resistência de cinco espécies bacterianas ao preparo químico mecânico, Möller et al. (2004) contaminaram 24 canais radiculares de macacos com *Streptococcus milleri*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Prevotella oralis*, *Fusobacterium nucleatum* e *E. faecalis*. Após 8 a 12 meses, observou-se evidência radiográfica de lesão perirradicular e executou-se tratamento endodôntico nos dentes. Quatro coletas microbiológicas foram realizadas: a primeira, logo após a abertura coronária; a segunda, depois do preparo químico-mecânico; a terceira, decorrido um período de 14 dias sem medicação; a quarta, após um novo preparo. Na primeira coleta, isolou-se *E. faecalis* em todos os dentes, *S.milleri* em 96%, anaeróbios estritos em 88-96%. Nas três coletas subseqüentes isolaram-se as bactérias anaeróbias facultativas e as anaeróbias estritas em 87,5% e 75%, 83% e 70%, 75% e 71%, respectivamente. O *E. faecalis* foi a bactéria isolada em maior número de canais nas últimas três coletas, 87,5% (2ª coleta), 83% (3ª coleta) e 75% (4ª coleta). Concluiu o estudo que o preparo químico-mecânico diminuiu, mas não eliminou o número de cepas bacterianas, e que as bactérias anaeróbias facultativas são mais resistentes ao preparo que as anaeróbias estritas.

Mesmo após o preparo químico-mecânico, é necessária a utilização de uma medicação intracanal, visando auxiliar a eliminação de bactérias remanescentes (SIQUEIRA JR.; RÔÇAS; LOPES, 2004c). Uma grande variedade de agentes antimicrobianos tem sido utilizada com essa finalidade. Entretanto, o hidróxido de cálcio, - $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -, introduzido por Hermann em 1920, é a medicação intracanal mundialmente mais empregada em Endodontia. Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar as suas propriedades (ESTRELA et al., 2001; HOLLAND et al., 2003; SAFAVI; NICHOLS, 1993).

O hidróxido de cálcio é uma base forte (pH 12,5) pouco solúvel em água. Para que essa substância atue com eficiência como medicação intracanal, deve haver dissociação em íons cálcio e íons hidroxila, e esses últimos devem se difundir através da dentina modificando, assim, o pH desse meio. Essa mudança de pH exerce uma drástica pressão seletiva, e só microrganismos com mecanismos de adaptação ao meio são capazes de proliferar. A maioria das proteínas e outras moléculas biologicamente importantes realizam suas atividades em uma estrita faixa de pH, que gira em torno da neutralidade (SIQUEIRA Jr.; LOPES, 1999).

Examinando o pH em várias regiões do tecido dentário de macacos, após a colocação da pasta de hidróxido de cálcio (pH 12, 5) no canal radicular, Tronstad et al. (1981) observaram uma variação nas diferentes áreas do sistema de canais radiculares. Dentro do canal radicular, o pH variou de 10 a 12,2. Entretanto, na dentina adjacente ao canal, o pH foi de 8,0 a 11,1. Já na dentina periférica, foi observada uma variação de 7,4 a 9,6. Torna-se evidente que o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ não atua em toda extensão com o mesmo pH, tendo assim a sua eficácia diminuída nas regiões mais periféricas da dentina.

Avaliando, mediante estudo *in vitro*, o pH necessário para eliminar o *E. faecalis*, McHugh et al. (2004) observaram que houve crescimento bacteriano quando essas bactérias se encontravam em meio com pH de 9,5; 10,0; 10,5 e 11. Quando submetidas a um meio com pH de 11,5 e 12 não mais se constatou crescimento.

O equilíbrio do pH citoplasmático celular bacteriano é obtido pelo controle da permeabilidade da membrana celular aos prótons, o que se consegue pelo

controle da atividade do sistema de transporte de íons, que facilita a entrada de prótons. Dois fatores causam perturbação no pH: o movimento passivo de prótons através da membrana citoplasmática e a produção de ácidos e bases no citoplasma. A maioria das bactérias possui uma bomba ligada à membrana, que provoca extrusão de prótons do citoplasma para gerar um gradiente eletroquímico transmembrana. Quando o pH do ambiente sobe, bactérias tentam preservar o pH intracelular bombeando prótons pela membrana citoplasmática para manter o pH do citoplasma (BOOTH, 1985).

Para determinar se a bomba de prótons se encontrava envolvida na resistência do *E. faecalis* a ambientes com pH alcalino, Evans et al. (2002) expuseram células dessa bactéria ao hidróxido de cálcio em pH 11,1 na presença de um inibidor do funcionamento dessa bomba, o m. cloronofenildazona carbonilcianida (CCCP). A ausência do mecanismo de ação da bomba levou a uma drástica redução no número de células viáveis do meio, já o meio não exposto ao CCCP, apresentou uma maior quantidade de células viáveis. Concluiu-se que o funcionamento intracelular da bomba de prótons foi o fator primário na resistência do *E. faecalis* ao alto pH.

Trabalhando *in vitro*, Estrela et al. (1999) observaram a ação do Ca(OH)_2 em dentes previamente instrumentados, autoclavados e posteriormente infectados com *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*. Esses dentes permaneceram incubados com os contaminantes por um período de 28 dias, durante o qual foram reinfetados a cada 72 horas. Em seguida, os canais foram preenchidos com hidróxido de cálcio e avaliados em 0, 48 e 72 horas, e após sete dias. A cada

período mencionado, os canais foram analisados para que fosse possível definir se havia células viáveis depois do uso da medicação intracanal. Os resultados demonstraram que todas as bactérias resistiram ao tratamento até mesmo após os sete dias de medicação. Concluíram os autores que, quando é necessária uma ação à distância, ou seja, a atuação da medicação no interior dos túbulos dentinários, esse medicamento não é eficaz.

Dahlén et al. (2000) verificaram a persistência de *Enterococcus ssp.* em 29 amostras de dentes que estavam sendo submetidos a tratamento endodôntico. 17 amostras foram obtidas a partir de dentes medicados com hidróxido de cálcio, 4 com tintura de iodo e 8 com medicação não informada. Das amostras avaliadas, 26 apresentavam *E. faecalis* e, três *Enterococcus faecium*. Testes de susceptibilidade a antibióticos revelaram resistência a benzilpenicilina, ampicilina, clindamicina, metronidazolona e tetraciclina. As amostras foram sensíveis a eritromicina e a vancomicina.

Avaliando a eficácia do preparo químico-mecânico e da medicação intracanal (hidróxido de cálcio) sobre a microbiota de dentes que apresentavam necrose pulpar, Lana et al. (2001) constataram que nenhuma bactéria anaeróbia estrita foi recuperada após a terapêutica endodôntica instituída, porém, foi possível isolar bactérias anaeróbias facultativas e leveduras, mostrando que a infecção pode persistir mesmo depois do tratamento, e que esses microrganismos podem ser resistentes a essa terapêutica.

Ao coletarem amostras de 200 canais radiculares de dentes que já haviam sido submetidos ao preparo químico-mecânico e medicados com Ca(OH)_2

ou iodeto de potássio iodetado, Chávez de Paz et al. (2003) observaram que 107 desses dentes ainda apresentavam contaminação após o preparo e a medicação intracanal. Foram recuperadas, em maior prevalência, bactérias Gram positivas, que representavam 85% das cepas isoladas, sendo que dessas cepas o *Lactobacillus* encontrava-se presente em 22% dos casos, *Streptococcus* do grupo não *mutans* em 18%, e *Enterococcus ssp.* em 12%. As bactérias anaeróbias Gram negativas foram isoladas esporadicamente, sugerindo que os procedimentos realizados no tratamento endodôntico, especialmente nos casos de necrose pulpar, foram mais efetivos contra os microrganismos Gram negativos. Esses resultados parecem apoiar a hipótese de que os procedimentos endodônticos são seletivos para as bactérias Gram positivas. Ainda foi possível constatar que as primeiras amostras após o preparo e a medicação intracanal apresentavam *Enterococcus ssp.* em 26 (24%) dentes. Após a repetição da medicação, já na segunda coleta, ainda foi possível isolar 15 dentes contaminados por essa bactéria. Na comparação com os outros microrganismos isolados na segunda coleta, observou-se que o *Enterococcus* quase dobrou sua percentagem sobre o número de cepas isoladas na primeira, enquanto os outros tiveram apenas um leve aumento ou até desapareceram completamente.

Ferrari, Cai e Bombana (2005) examinaram 25 canais com infecção endodôntica de natureza primária e com lesão perirradicular assintomática. Dos dentes examinados, 23 apresentavam-se contaminados por microrganismos: sendo isolados *Enterococcus* em 13% (3) dos casos, bactérias entéricas associadas ao *Enterococcus* em 4% (1), e leveduras em 4% (1). Depois do preparo químico-mecânico, fez-se uma segunda coleta microbiológica e nenhum desses

microrganismos pôde ser isolado; contudo, outras espécies bacterianas estavam presentes em cinco canais. Após sete dias sem medicação intracanal, realizou-se uma terceira coleta e em 100% dos casos observou-se contaminação. *Enterococcus* estava presente em 36% (9) dos canais, *Enterococcus* associado a bactérias entéricas em 4% (1), *Enterococcus* e levedura em 4% (1) e *Enterococcus*, bactérias entéricas e leveduras em 4% (1). Utilizou-se como medicação intracanal a associação de paramonoclorofenol, Rinosoro, e polietilenoglicol (PRP) e, depois de sete dias, uma nova avaliação microbiológica foi realizada. Apenas 36% dos casos se encontravam, ainda, colonizados por microrganismos; três dos canais apresentavam contaminação por *Enterococcus*. As amostras foram identificadas como *E. faecalis* e *E. faecium*. É interessante notar que, na primeira coleta realizada, o *Enterococcus* foi isolado em apenas quatro canais; após o período sem medicação, ele foi isolado em 12 canais. Esses achados sugerem que tais microrganismos estavam provavelmente presentes em pequeno número na primeira coleta não oferecendo condições favoráveis ao resgate. A mudança de ambiente, em razão do preparo químico-mecânico, pode ter promovido melhores condições para o crescimento dessa bactéria; outra hipótese é a contaminação por infiltração marginal dos fluidos orais na interface do material restaurador provisório e da estrutura dental.

Visando a comparar os resultados obtidos por PCRq em Tempo Real e métodos tradicionais de cultura, Sedgley et al. (2006) investigaram espécimes clínicos coletados de 88 canais de um total de 81 dentes — 40 amostras eram de infecção endodôntica primária e 48 de dentes que estavam sendo submetidos a retratamento. Pelos métodos de isolamento tradicional, recuperou-se o *E. faecalis*

em apenas 10,2% do total das amostras, porém nesse estudo a maioria dos casos já havia sido submetida à medicação intracanal antes da coleta microbiológica; já através de PCRq em Tempo Real, detectou-se a bactéria em 89,6% dos espécimes clínicos coletados de retratamento, e 67,5% daquelas amostras provenientes de dentes com infecção primária.

Em síntese, as pesquisas realizadas têm demonstrado a prevalência de bactérias anaeróbias facultativas e Gram positivas quando se investiga a microbiota persistente após as manobras de preparo químico-mecânico, e de medicação intracanal e em casos de canais previamente tratados endodonticamente, com persistência de lesão perirradicular (CHÁVEZ DE PAZ et al., 2003; DAHLÉN et al., 2000; FERRARI; CAI; BOMBANA, 2005; MOLANDER et al., 1998; PECIULIENE et al., 2000; RÔÇAS; SIQUEIRA JR.; SANTOS, 2004; SUNDQVIST et al., 1998). Nos casos de fracasso da terapia endodôntica o *E. faecalis* tem sido a espécie mais freqüentemente isolada e algumas vezes apresentando-se em culturas puras (PECIULIENE et al., 2000; PINHEIRO et al., 2003). O risco de a microbiota ser dominada por Gram positivos depois do tratamento, e vários serem facultativos, conduz à necessidade de se esclarecer se o resultado do tratamento depende da completa eliminação dessas bactérias. A mudança na microbiota endodôntica em casos de infecções persistentes se faz evidente. É indiferente se o *E. faecalis* está presente já nas infecções primárias ou se ele se tornou seletivo durante o processo de instrumentação e medicação (CHÁVEZ DE PAZ et al., 2003). No entanto, há uma tendência a acreditar que essa bactéria apresenta-se em pequena percentagem na microbiota infecciosa original e pode ser favorecida pela mudança ecológica dessa microbiota, estabelecendo uma infecção de difícil tratamento (FERRARI; CAI; BOMBANA, 2005; PINHEIRO et al., 2003).

2.3 Relação hospedeiro x parasita: explicando o insucesso

Alguns estudos têm-se dirigido para demonstrar a capacidade de células bacterianas invadirem os túbulos dentinários nas mais variadas profundidades (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987; LOVE, 2001; PETERS et al., 2001;). Consequentemente essas células podem permanecer nesse sistema de canais, sobreviver ao preparo químico-mecânico e também resistir à medicação intracanal utilizada.

Nesse sentido, Love (2001) concluiu, em estudo *in vitro*, que o *E. faecalis* tem a capacidade de invadir e permanecer viável no interior dos túbulos dentinários e reinfectar um canal radicular já obturado. Para que isso ocorra, é preciso que o microrganismo apresente alguns fatores de virulência que permita a sua sobrevivência às condições alteradas do meio, importante característica para a patogênese da bactéria. Os fatores determinantes da patogenicidade do *E. faecalis* parecem ainda incertos. A aderência bacteriana às células hospedeiras é conhecida como o evento inicial na patogênese de muitas infecções. Algumas pesquisas têm tentado elucidar os fatores de virulência que permitem ao *Enterococcus* a colonização e sua capacidade de adesão à dentina (HUBBLE et al., 2003; SEDGLEY et al., 2005; SEDGLEY; LENNAN; APPELBE, 2005). O estudo desses potenciais fatores de virulência é de grande utilidade para esclarecer seu papel nas infecções de natureza endodôntica.

Figdor, Davies e Sundqvist (2003), estudando a resposta do *E. faecalis* quando submetido a condições de limitada disponibilidade de fosfato, glicose e aminoácidos, observaram que ele é capaz de resistir a prolongados períodos de

restrição nutricional e as células que permanecem viáveis se encontram em um estado de metabolismo mínimo com uma atividade celular limitada. A partir do momento em que essas células são expostas novamente ao soro humano, elas são capazes de se recuperar. Se algumas células sobrevivem ao preparo químico-mecânico e à medicação durante o tratamento, elas podem se multiplicar em presença de nutrientes derivados do soro, mantendo a lesão perirradicular. A nutrição necessária para sustentar essa microbiota persistente no sistema de canais radiculares provavelmente vem dos fluidos teciduais periapicais. Embora esse fluido não esteja bem caracterizado, é provável que se componha de uma substância como o soro, derivada do tecido ósseo circundante e do tecido conjuntivo (LOVE, 2001).

Para o entendimento do papel do *Enterococcus* nas infecções endodônticas, tem-se realizado investigações dos potenciais fatores de virulência expressados por esse microrganismo, tendo como objetivo o esclarecimento do mecanismo de adaptação e sobrevivência do mesmo às adversidades do meio (SEDGLEY et al., 2005). A capacidade de aderência do *E. faecalis* à dentina foi avaliada por Hubble et al. (2003) e para tal, utilizou-se uma cepa que apresentava genes codificadores de fatores de virulência envolvidos na adesividade da célula bacteriana aos tecidos hospedeiros. Os fatores de virulência observados foram: a collagenase (Ace), a protease serina (Spr) e a gelatinase (Gel). Além dessa cepa, foram utilizadas três derivações mutantes de *E. faecalis* que não codificavam todos os três fatores de virulência. Por meio da microscopia eletrônica de varredura, analisou-se a adesão das células bacterianas à dentina. Comparou-se uma das amostras mutantes que codificava gelatinase com outras amostras que codificavam

gelatinase e collagenase; observou-se que não houve diferença significativa na adesão dessas células às paredes dentinárias. Já a amostra que apresentava genes codificadores dos três fatores de virulência, ou seja, aquela que não era mutante apresentou maior adesividade às paredes dentinárias. Esses dados indicam que a collagenase e a protease serina desempenham um papel importante na capacidade de adesão do *E. faecalis* à dentina, enquanto o papel da gelatinase parece incerto.

Sedgley et al. (2005) analisaram as características fenotípicas e genotípicas de 33 amostras de *Enterococcus ssp.* de canais radiculares de pacientes que se encontravam em tratamento endodôntico. Das 33 amostras, duas eram de *E. faecium* e 31 de *E. faecalis*. Através de PCR, os autores observaram que todas as amostras apresentavam os genes Efa A, ace e asa. O gene esp e o gene Cyl A foram detectados, respectivamente, em 18 e em seis isolados. O gene gel A se encontrava em todas as amostras de *E. faecalis*, porém, considerando suas características fenotípicas, pôde-se constatar que apenas 23 cepas estavam expressando atividade da gelatinase. Demonstraram os achados que, apesar de o gene codificador da gelatinase estar presente em todas as cepas de *E. faecalis* o mesmo não se encontrava em atividade de expressão em todas elas. Das oito amostras que não apresentaram expressão dessa enzima, seis apresentaram deleção cromossômica no *locus fsr*.

Em um estudo *ex vivo* Sedgley, Lennan e Appelbe (2005) infectaram dentes, após instrumentação endodôntica, com cepas isogênicas de *E. faecalis* OG1-S, produtoras de gelatinase e resistentes à estreptomicina, ou com *E. faecalis* OG1-X, uma cepa mutante com capacidade reduzida de produção de gelatinase. Esses dentes foram então, obturados e armazenados por um período de seis a 12

meses. Após esse período de incubação, ainda foi possível isolar células viáveis de todos os dentes obturados. Considerando a quantidade de células viáveis, não houve diferença estatística entre o grupo colonizado por *E. faecalis* OG1-S e aquele colonizado por *E. faecalis* OG1-X, indicando que a produção de gelatinase não influenciou a sobrevivência das células. Os resultados mostraram que o *E. faecalis* pode permanecer viável no interior do canal mesmo após a obturação endodôntica por um longo período de tempo, levando a uma possível subsequente reinfecção do sistema de canais radiculares.

Kayaoglu, Ertan e Ørstavik (2005) avaliaram, *in vitro*, o efeito da aderência do *E. faecalis* ao colágeno tipo I (principal componente orgânico da dentina) e à albumina bovina, submetendo essa bactéria a um crescimento em pH que variava de 7,1 a 9,5. A aderência ao colágeno foi significativamente maior no grupo que cresceu em pH 8,0 a 8,5 que naquele que cresceu em pH 7,1. Esses resultados podem representar um mecanismo crítico à permanência do *E. faecalis* em infecções endodônticas persistentes, já que a medicação normalmente utilizada entre sessões permite ao meio o estabelecimento desse pH.

Diante do exposto, terapêuticas alternativas ao uso do hidróxido de cálcio têm sido avaliadas na tentativa de eliminar essa população bacteriana resistente (BASRANI et al., 2003; DAMETTO et al., 2005; LENET et al., 2000, LIMA; FAVA; SIQUEIRA Jr., 2001, PAISANO et al. 2004, SIRÉN et al., 2004).

2.4 Clorexidina

A clorexidina é um potente antimicrobiano utilizado há mais de 50 anos. É eficaz contra bactérias, leveduras e vírus. Sua atividade antibacteriana deriva da ligação de sua molécula catiônica à parede celular da bactéria (aniônica) por meio de reação eletrostática. A parede bacteriana é alterada, o equilíbrio osmótico é perdido, ocasionando a ruptura da mesma e permitindo a saída de componentes intracelulares, tais como íons de potássio e fósforo. Em baixas concentrações, a ação da clorexidina é bacteriostática, enquanto em concentrações mais elevadas seu efeito é bactericida, obtido por meio da precipitação ou da coagulação do conteúdo citoplasmático, com rompimento de membrana e morte celular. A clorexidina apresenta um efeito antimicrobiano prolongado, a substantividade, propriedade que confere a essa substância a capacidade de ser adsorvida reversivelmente à mucosa bucal, à película dentária, às proteínas salivares e à hidroxiapatita, sendo liberada da cavidade bucal em até 24 horas (LEONARDO; SILVA, 2005).

Comparando a substantividade da clorexidina a 2% e a 0,12% como irrigante em um experimento *in vitro*, White, Hays e Janer (1997) instrumentaram dentes unirradiculares; a cada mudança de instrumento, eles foram irrigados com uma das soluções de clorexidina em teste. Já no grupo controle a irrigação se fez com água destilada. A irrigação final foi realizada nos três diferentes grupos com água destilada, pontas de papel absorvente foram utilizadas para a secagem dos canais. Cada dente foi preenchido novamente com água destilada e se retirou a amostra desse fluido com o auxílio de pontas de papel absorvente nos períodos de

6, 12, 24, 48 e 72 horas, após o tratamento. Nos 23 dentes tratados com clorexidina a 2%, a atividade antibacteriana foi observada de 6 a 72 horas após o uso do irrigante. Nos 21 dentes irrigados com clorexidina a 0,12%, observou-se atividade antibacteriana de 6 a 12 horas após o tratamento. Na comparação dos dois grupos, observou-se que a substantividade da clorexidina a 2% foi significativamente maior do que no percentual de 0,12%.

Com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana e a substantividade do gluconato de clorexidina a 2%, *in vivo*, Leonardo et al. (1999) selecionaram dentes que apresentavam necrose pulpar e lesão periapical crônica para observar a atuação desse medicamento na microbiota presente nesses canais. A primeira coleta microbiológica realizou-se após a abertura coronária. Os dentes foram, então, instrumentados, a clorexidina a 2% foi usada como irrigante e os canais foram selados por 48 horas. Depois desse período, efetuou-se uma segunda coleta e as amostras foram submetidas à análise microbiológica. Os resultados mostraram que, na segunda coleta, houve uma redução de 77,78% dos microrganismos presentes. O *Streptococcus mutans*, que fora isolado inicialmente em dez casos, foi completamente eliminado após os procedimentos de preparo químico-mecânico, o que demonstra a ação da clorexidina, mesmo depois de 48 horas.

Também, Lenet et al. (2000) buscaram avaliar a substantividade da clorexidina em estudo com 60 dentes de bovinos. Os dentes tiveram coroas e ápices seccionados, resultando em espécimes de 10 mm de comprimento, o cimento foi removido e o diâmetro dos canais ampliados com brocas esféricas. Para remoção da *smear layer* foi utilizado EDTA a 17% e NaOCl a 0,5%. Executou-se esterilização dos espécimes radiculares, quando então foram divididos em quatro grupos. Em

cada grupo, tratamentos distintos foram utilizados: um veículo de liberação controlada, que continha 25% de clorexidina, imerso em solução salina; clorexidina a 2% em gel e pasta de hidróxido de cálcio. Um grupo controle foi preenchido com solução salina. A medicação intracanal permaneceu durante sete dias em todos os grupos; terminado esse prazo, a medicação foi removida e os canais foram infectados com *E. faecalis* por 21 dias. Após esse período, raspas de dentina foram removidas em diferentes profundidades e incubadas em tubos de ensaio contendo BHI (Brain Heart Infusion) para que se observasse crescimento bacteriano. A leitura foi realizada por meio de espectrofotômetro. O grupo em que se utilizou o dispositivo de liberação controlada de clorexidina apresentou valores de densidade óptica mais baixos que os do grupo que recebeu hidróxido de cálcio. Entretanto, os melhores resultados foram obtidos com a clorexidina a 2% em gel, sugerindo os achados que a utilização dessa medicação intracanal por sete dias, adquire propriedades antimicrobianas por pelo menos 21 dias.

Lima, Fava e Siqueira Jr. (2001) avaliaram a efetividade de medicamentos à base de clorexidina a 2% e clindamicina a 2% em forma de gel (natrozolona a 2%), em eliminar biofilme formado por *E. faecalis*. Quando se associou clindamicina à metronidazolona o número de células em um dia de biofilme diminuiu significativamente. Entretanto de todos os medicamentos testados, só aqueles que eram à base de clorexidina a 2% foram capazes de eliminar a maioria do biofilme formado tanto em um quanto em três dias.

Lin et al. (2003), analisando em dentes de bovinos contaminados por *E. faecalis*, o efeito da clorexidina a 0,2% como irrigante por um período de 7 minutos e seu uso como medicação intracanal a 5% inserida em um dispositivo de liberação

controlada (Activ point), por um período de sete dias, observaram que nenhuma bactéria foi detectada nos túbulos dentinários após a sua utilização como medicação. Porém quando utilizada apenas como irrigante e em menor concentração, constatou-se a permanência de bactérias no interior dos túbulos dentinários.

Paisano et al. (2004) avaliaram, *in vitro*, o efeito antimicrobiano de bacteriófagos específicos sobre o *E. faecalis*. Para tal, foram utilizadas vinte raízes de dentes humanos unirradiculares, divididas eqüitativamente em quatro grupos. Em três raízes de cada grupo foram inoculados *E. faecalis* e bacteriófagos. As demais raízes foram utilizadas como controles positivos e negativos. Os três primeiros grupos receberam uma suspensão do vírus obedecendo as seguintes proporções bactéria-fago: Grupo I- 1:1; Grupo II- 1:10; Grupo III- 10:1. Após três horas de incubação na presença dos fagos, nenhum crescimento bacteriano foi observado no grupo I e II. No grupo III os resultados mostram uma redução de 98% do crescimento bacteriano em duas raízes e em outra não se constatou crescimento. O grupo IV recebeu tratamento diferenciado. A suspensão bacteriana foi inoculada nas raízes e estas permaneceram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Durante os seis dias seguintes, inoculou-se nos espécimes meio de cultura diariamente, objetivando a manutenção de condições adequadas para penetração das bactérias nos túbulos dentinários. Após este período, suspensões de fagos foram inoculadas nas raízes e estas foram novamente incubadas a 37 °C por 24 horas. Decorridas 24, 48, e 72 horas de tratamento com os fagos, não foi constatado crescimento bacteriano, indicando o resultado que os bacteriófagos são capazes de suprimir o crescimento do *E. faecalis*.

Sirén et al. (2004), analisaram o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio, da associação desse medicamento ao iodeto de potássio iodetado (IKI) ou à clorexidina a 0,5%, sobre o *E. faecalis* em dentes de bovinos infectados por essa bactéria. As medicações foram utilizadas por períodos de um e sete dias. Os melhores resultados apresentados foram após sete dias. A associação do Ca(OH)_2 à clorexidina a 0,5% e ao iodeto de potássio iodetado se mostrou mais eficiente que a utilização do hidróxido de cálcio sozinho. Quando se utilizou Ca(OH)_2 como medicação quase todos os espécimes permaneceram infectados. A pesquisa concluiu que a combinação dessas substâncias com o hidróxido de cálcio parece promover benefícios no tratamento endodôntico de infecções primárias e, particularmente, nos casos de retratamento em que o *E. faecalis* é comumente isolado.

Nageshwar, Ridiyoor e Hedge (2004) compararam *in vitro* a eficácia do hidróxido de cálcio puro e desse produto associado à clorexidina a 2% como medicação intracanal. Foram utilizados para o estudo 30 incisivos centrais superiores extraídos. Os dentes foram devidamente esterilizados e, logo após, submetidos à contaminação por *Enterococcus*. Os canais receberam as respectivas medicações e um grupo controle permaneceu sem medicação. Os dentes foram armazenados por um período de sete dias. O grupo controle apresentou uma diferença estatística muito grande quando comparado com os outros dois grupos. Entretanto, o grupo medicado com hidróxido de cálcio associado à clorexidina a 2% foi mais efetivo contra o *E. faecalis* que o grupo onde só foi utilizado o hidróxido de cálcio.

A ação bactericida do hidróxido de cálcio se deve a sua alta alcalinidade. É importante que substâncias associadas a essa base não modifiquem o seu pH para que o medicamento exerça sua propriedade bactericida com eficácia. Alguns estudos têm mostrado que a associação do hidróxido de cálcio à clorexidina não interfere no pH desta composição (BASRANI; CHANEN; TJADERHANE, 2004; SIRÉN et al., 2004).

O *E. faecalis*, quando submetido a prolongados períodos de carência nutricional, desenvolve mudanças fisiológicas e genéticas, resistindo aos mais diversos ambientes de estresse (GIARD et al., 1997; FLAHAUT et al., 1997; RINCÉ et al., 2003; KAYAOGLU; ERTEN; ORSTAVIK, 2005). O ambiente endodôntico oferece condições adversas a essas bactérias, que podem não exibir o mesmo perfil de susceptibilidade a medicamentos quando são realizados experimentos *in vitro* nos quais são cultivadas em meio que oferece suprimentos nutricionais. Sendo assim, Portenier et al. (2005) testaram a susceptibilidade do *E. faecalis* ao hidróxido de cálcio, ao hipoclorito de sódio e ao digluconato de clorexidina em diferentes estágios fisiológicos da bactéria. As células na fase de crescimento exponencial se mostraram mais sensíveis a todos os três medicamentos testados e morreram entre 3 segundos e 10 minutos. Já na fase estacionária, elas foram menos sensíveis e células viáveis foram recuperadas em até 10 minutos de exposição. Na fase de declínio, apresentaram-se mais resistentes e não foram completamente eliminadas pelos medicamentos durante os 10 minutos testados. A utilização de células na fase de declínio para os experimentos provavelmente simularia melhor as condições *in vivo* do canal radicular.

Qualquer material destinado a uso biológico deve ser biocompatível aos tecidos, ou seja, não apresentar citotoxicidade, para que não ocorra interferência negativa no reparo tecidual. Tanomaru Filho et al. (2002), testando a biocompatibilidade da clorexidina a 2% e do hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5% mediante injeção intraperitonal em ratos, concluíram que o NaOCl a 0,5% causou irritação tecidual e mostrou uma resposta inflamatória elevada; já a clorexidina foi biocompatível, sugerindo os resultados que essa pode ser uma alternativa ou complemento à irrigação com NaOCl.

Já Delgado (2002) avaliou a biocompatibilidade da pasta de hidróxido de cálcio (Calen), dessa mesma pasta associada ao digluconato de clorexidina a 1%, e da solução de clorexidina a 2% em tecido subcutâneo de patas traseiras de ratos, em diferentes períodos de tempo. Pelos resultados histológicos, concluiu que a clorexidina a 2% apresentou resultados insatisfatórios, não permitindo o reparo tecidual; entretanto, quando se utilizou a pasta Calen e essa associada à clorexidina a 1%, houve biocompatibilidade e reparo tecidual.

De Rossi et al. (2005), em um estudo *in vivo*, em cães, avaliaram a ação da associação de clorexidina a 1% ao Ca(OH)_2 , como medicação intracanal, nos dentes desses animais. Em um dos grupos foi realizada a terapia endodôntica de rotina e, após sua execução, os dentes foram imediatamente obturados. O outro grupo recebeu a medicação intracanal proposta por um período de 14 dias, até que fosse removida e a obturação realizada. Fez-se uma avaliação histológica e radiológica da região periapical desses dentes 30, 75 e 120 dias após a obturação. Houve significativa redução no tamanho das lesões periapicais naqueles dentes cuja medicação intracanal foi utilizada quando se comparou com o outro grupo. Concluiu-

se que a atuação da medicação durante o período de 14 dias contribuiu para o processo de cura das lesões perirradiculares, evidenciando processo de reparo tecidual.

A literatura recente tem relatado que a clorexidina é mais efetiva que o Ca(OH)_2 no combate ao *E. faecalis* (EVANS et al., 2003; GOMES et al., 2003; LENET et al., 2000; LIN; MICKEL; CHOGLÉ, 2003; NAGESHWAR; KIDIYOOR; HEDGE, 2004; PODBLIESKI; SPAHR; HALLER, 2003; SIRÉN et al., 2004). Porém, a microbiota endodôntica primária é de natureza polimicrobiana com predominância de bactérias anaeróbias Gram negativas, e o Ca(OH)_2 é bastante efetivo contra essa microbiota. Essa medicação tem a capacidade de neutralizar o lipopolissacarídeo (LPS), endotoxina bacteriana encontrada na parede celular das bactérias Gram negativas (SAFAVI; NICHOLS, 1993). A utilização da clorexidina em diferentes concentrações associada ao hidróxido de cálcio, vem sendo analisada e demonstra ser bastante eficaz quando o *E. faecalis* se encontra presente (EVANS et al., 2003; GOMES et al., 2003). Sendo assim, essa associação seria uma alternativa, como medicação intracanal, no combate a essa bactéria.

A proposta do presente estudo é investigar a efetividade do gluconato de clorexidina a 1% associado a uma pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen), como medicação intracanal no combate ao *Enterococcus faecalis*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar, *in vivo* e *in vitro*, a efetividade do gluconato de clorexidina a 1% associado a uma pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen), como medicação intracanal, no combate ao *Enterococcus faecalis*.

3.2 Objetivos Específicos

A - Isolar amostras de *E. faecalis* do material coletado das unidades dentárias em estudo;

B - Verificar a prevalência dessa bactéria nos casos de tratamento resistente à terapia endodôntica e nos dentes com necrose pulpar, ambos associadas à lesão perirradicular assintomática;

C - Comparar, *in vivo*, a efetividade da pasta de hidróxido de cálcio (Calen) e da associação dessa pasta ao gluconato de clorexidina a 1% ,como medicação intracanal, em dentes que foi possível isolar *E. faecalis*.

D - Comparar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio (Calen) e da pasta de hidróxido de cálcio (Calen) associado à clorexidina a 1% sobre os isolados obtidos de uma das coletas microbiológicas de cada dente.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Casuística

4.1.1 Seleção de pacientes

Para a realização deste estudo foram atendidos 28 pacientes voluntários de ambos os sexos com idade entre 16 e 60 anos. Desses pacientes, foram selecionados através de exame radiográfico, 25 dentes apresentando resistência à terapia endodôntica com lesão perirradicular persistente, e 10 dentes com necrose pulpar associada à lesão perirradicular assintomática. Os dentes (incisivos, pré-molares e molares) foram identificados numericamente de 1 a 35. Os pacientes foram encaminhados ao consultório particular da mestranda por demanda espontânea. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe envolvendo seres humanos (PROCESSO nº. 0044. 0.107.000-05). Todos os pacientes receberam explicações sobre o estudo e foram instruídos a assinar o termo de concordância livre e consciente – TCLC, para participarem da pesquisa.

4.1.2 Critérios de inclusão

A - Dentes com tratamentos resistentes à terapia endodôntica com lesão perirradicular persistente por um período superior a quatro anos (REIT, 1987), sem exposição do material obturador ao meio bucal.

B - Dentes com diagnóstico de necrose pulpar associada à lesão perirradicular assintomática sem exposição da câmara pulpar ao meio bucal.

4.1.3 Critérios de exclusão

A - Pacientes com presença de bolsa periodontal.

B - Presença de fraturas radiculares.

C - Presença de comunicação entre a lesão perirradicular e o meio bucal.

D - Pacientes com manifestação de alterações sistêmicas importantes.

E - Pacientes em tratamento ou submetidos a qualquer tipo de terapia antibiótica nos três meses anteriores ao início dos procedimentos.

4.2 Métodos

4.2.1 Procedimentos clínicos

Todos os procedimentos clínicos foram realizados dentro das condições necessárias à manutenção da cadeia asséptica. Inicialmente, os dentes a serem tratados foram submetidos à profilaxia objetivando diminuir possíveis contaminantes no ato da coleta microbiológica. Aqueles que apresentavam coroas protéticas e pinos metálicos tiveram os mesmos removidos com o auxílio de saca-prótese e extrator de pino intra-radicular. Em seguida, foram isolados com dique de borracha. Realizou-se a anti-sepsia do campo operatório com peróxido de hidrogênio a 3% (Farmô-Sergipe) e solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (Officinalis-Farmácia de

Manipulação - São Paulo). Para a inativação dessas soluções, utilizou-se tiosulfato de sódio a 5% (Farmô-Sergipe) previamente esterilizado (RÔÇAS; SIQUEIRA Jr.; SANTOS, 2004).

A cirurgia de acesso aos canais radiculares foi executada, sem a utilização de água, com brocas devidamente esterilizadas em autoclave. Após a abertura coronária, procedeu-se a nova anti-sepsia do campo operatório. A câmara pulpar também foi cuidadosamente limpa com bolinhas de algodão esterilizadas embebidas em hipoclorito de sódio a 2,5% neutralizado por tiosulfato de sódio a 5% (RÔÇAS; SIQUEIRA JR.; SANTOS, 2004). Já os dentes que foram submetidos à remoção dos pinos intra-radicares, sofreram assepsia do espaço protético e em seguida do campo operatório.

Para controle da desinfecção do campo, bolinhas de algodão autoclavadas foram esfregadas na coroa dentária ou no campo operatório (caso os dentes não possuíssem coroa), logo em seguida, transferidas para tubos contendo 4 ml de caldo azida dextrose (Difco-Detroit-MI-USA).

Nos casos em que os dentes já apresentavam tratamento endodôntico, o material obturador foi removido inicialmente com brocas de Peeso (Maillefer Instruments-Ballaigues-Suíça) e/ou brocas Gates Glidden (Maillefer Instruments-Ballaigues-Suíça); e o material localizado na região mais apical foi retirado com o auxílio de limas tipo K e Hedström (Maillefer Instruments-Ballaigues-Suíça) (RÔÇAS; SIQUEIRA JR.; SANTOS, 2004). Toda a remoção do material obturador foi executada sem o auxílio de solventes químicos, pois eles podem exercer atividade bactericida, com possíveis interferências, no resultado da coleta (MOLANDER et al.,

1998). Exame radiográfico registrou esse procedimento. A partir desse momento, tanto os dentes que apresentavam diagnóstico de necrose quanto aqueles que apresentavam tratamento resistente à terapia endodôntica foram submetidos aos mesmos procedimentos de coleta e instrumentação.

4.2.1.1 Coletas de espécimes clínicos

Os canais foram inundados com tiosulfato de sódio a 5% acondicionado em seringa estéril. Foi introduzida uma lima endodôntica até 1 mm do ápice radiográfico e realizou-se ligeira instrumentação nas paredes do canal para obtenção de maior quantidade de espécime clínico. Para coleta desse espécime foi utilizada uma pinça de algodão esterilizada e flambada na ponta, portando um cone de papel autoclavado (DENTSPLY-RJ) que foi levado ao interior do canal, permanecendo por um período de 1 minuto. Realizou-se essa seqüência quatro vezes (RÔÇAS; SIQUEIRA JR.; SANTOS, 2004). O primeiro e o quarto cone foram transferidos para tubos que continham 4ml de caldo azida dextrose (Difco-Michigan-USA). O segundo e o terceiro cone foram armazenados em criotubos contendo Tris EDTA (tris-HCL 10 mM e EDTA 0,1mM; pH 7.6). Os espécimes clínicos obtidos nessa primeira coleta (coleta **A**) foram nomeados como **A/1** quando provinham da coleta a partir do primeiro cone, e **A/4**, quando oriundos do quarto cone. Já aqueles provenientes do segundo e terceiro cone foram acondicionados em criotubos.

4.2.1.2 Instrumentação dos canais radiculares

Na sessão em que se efetuou a coleta, deu-se prosseguimento às manobras de odontometria, preparo químico-mecânico e medicação intracanal. Todos os canais foram instrumentados manualmente com a técnica *crowndown*, pelo mesmo operador, respeitando os procedimentos para a manutenção de patência apical, com o uso de hipoclorito de sódio 2,5%. Após a conclusão da instrumentação, a remoção da *smear layer* foi realizada com a utilização da solução de EDTA (Biodinâmica Quimfarm-São Paulo) aplicada no interior do canal por 3 minutos e neutralizada pela irrigação de hipoclorito de sódio a 2,5 % . Por fim, irrigou-se o canal com soro fisiológico estéril, e procedeu-se à secagem do canal por meio de cânulas de aspiração e pontas de papel absorvente autoclavadas. A partir daí, os 35 dentes foram aleatoriamente divididos em dois grupos: grupo 1 e grupo 2 e receberam medicações distintas.

4.2.1.3 Medicação intracanal

No grupo 1, constituído de 15 dentes, utilizou-se a pasta Calen (SS White - Artigos Dentários Ltda. - RJ), cujos componentes são hidróxido de cálcio, óxido de zinco, colofônia e polietilenoglicol 400.

No grupo 2, constituído de 20 dentes, empregou-se a associação da pasta Calen (SSWHITE-Artigos Dentários Ltda. - RJ) à solução de gluconato de

clorexidina a 20% (Officinalis-Farmácia de Manipulação – São Paulo), em uma concentração final de clorexidina na pasta de 1%. Executou-se o preparo da medicação, especialmente para esse experimento, de acordo com Pazzeli (2002), a saber:

Pasta Calen.....	4,8 g
Solução de gluconato de clorexidina a 20%.....	0,24 ml

Com seringa rosqueável (seringa ML-Rio de Janeiro), acoplada à agulha descartável 27 G longa (Becton-Dickson Ind.Cirúrgica Ltda - Minas Gerais) a pasta Calen foi vagarosamente dispensada em uma placa do tipo Petri, obtendo-se por meio de balança analítica de precisão (Quimis) uma quantidade de 4,8 g da pasta. Adicionou-se, com o auxílio de pipeta graduada, 0,24 ml da solução de gluconato de clorexidina a 20% e as substâncias foram espatuladas até apresentarem uma consistência homogênea; em seguida, a pasta obtida foi acondicionada em tubetes anestésicos previamente autoclavados. Todo o procedimento de preparo da medicação foi realizado dentro de câmara de fluxo laminar (Veco-Campinas-São Paulo) sob condições assépticas rigorosas no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Sergipe. Os tubetes foram mantidos em recipiente fechado ao abrigo da luz até o seu uso.

O mesmo protocolo foi utilizado para a aplicação da medicação intracanal nos dois grupos: A pasta foi transferida para o canal radicular por meio de seringa rosqueável, acoplada a uma agulha longa 27G. Colocou-se um cursor de silicone (Maillefer-Ballaigues-Suíça) na agulha com a finalidade de nortear o comprimento de trabalho. Dispensou-se na câmara pulpar uma bolinha de algodão esterilizada, e aplicou-se cimento ionômero de vidro como material obturador temporário (Ketac C-

Fil Plus; M - ESPE, A.GSEEFIELD, Alemanha). Esse cimento foi selecionado com base em estudos anteriores, que relataram a sua capacidade seladora por longos períodos de tempo (BARTHEL et al., 1999). A medicação intracanal permaneceu nos dentes, nos dois grupos, por um período de 14 a 16 dias (Figura 1).

Na segunda consulta dos pacientes, após assepsia do campo operatório e da coroa dental, foram removidas as restaurações temporárias e retirou-se a medicação intracanal com irrigação de tiosulfato de sódio a 5%. Introduziu-se uma lima até o limite estabelecido pela odontometria e pequenos movimentos de limagem foram executados nas paredes dos canais. Os espécimes clínicos foram coletados (2ª coleta ou coleta B) adotando os mesmos procedimentos rigorosamente seguidos na primeira coleta. O material obtido nessa coleta foi nomeado como B/1 quando provinha da coleta a partir do primeiro cone, e B/4, quando do quarto cone. Ao final dessa sessão realizou-se secagem dos canais e selamento coronário, permanecendo os dentes sem medicação intracanal por um período de 72 horas.

Após esse prazo, os pacientes retornaram para execução da terceira coleta microbiológica (coleta C), realizada segundo o mesmo protocolo. Os espécimes clínicos dessa coleta foram nomeados como C/1 quando obtidos da coleta a partir do primeiro cone, e C/4 do quarto cone.

A cada coleta (A, B e C) no máximo de até quatro horas todo o material foi levado para o Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Sergipe. Aquele material que se encontrava em tubos contendo caldo azida dextrose foi armazenado em estufa a 37 °C e aquele acondicionado em criotubos foi

transferido para um freezer a -20°C para armazenamento e utilização em experimentos futuros.

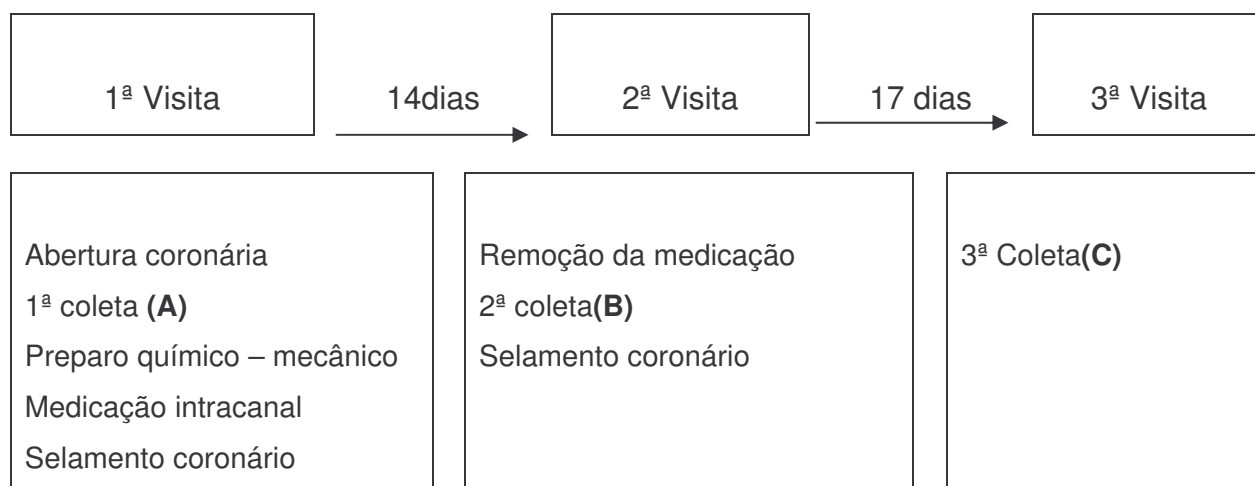


Figura 1 – Coleta do espécime clínico

Encerradas as coletas microbiológicas necessárias para este estudo, todos os pacientes receberam tratamento endodôntico conclusivo das unidades dentárias em questão.

4.2.2 Procedimentos laboratoriais

4.2.2.1 Isolamento

O material coletado permaneceu em caldo azida dextrose, devidamente incubado em estufa a 37°C , até 72 horas. Após esse período, a presença de turbidez no meio era indicativa de crescimento microbiano. Semeou-se, então, uma alçada desse material em placas do tipo Petri contendo ágar bile esculina (Difco Labs, Sparks, MD, USA) por meio da técnica de esgotamento. A seguir, as placas

foram incubadas a 37 °C por 18 a 24 horas. De cada placa onde havia crescimento e escurecimento do meio, em função da hidrólise da esculina em esculetina, um máximo de cinco colônias morfológicamente semelhantes foram selecionadas e transferidas para tubos de ensaio que continham três ml de caldo BHI-*Brain heart infusion* (Oxoid, Basingstoke, UK). Em seguida esses tubos foram incubados a 37 °C por um período de 12 a 24 horas, findo o qual se semeou uma alçada do caldo em placas do tipo Petri com ágar BHI para a obtenção de biomassa. As placas permaneceram incubadas a 37 °C por 24 horas. Decorrido esse período as células foram ressuspensas em solução salina em uma concentração de aproximadamente 3×10^8 células ml^{-1} , à semelhança do tubo nº1 da escala de Macfarland. A partir daí, testes fisiológicos convencionais para caracterização do gênero *Enterococcus* e identificação da espécie *E. faecalis* foram realizados, baseados em suas características fenotípicas (TEIXEIRA; FACKLAM, 2003). As amostras provenientes do quarto cone, ou seja, A/4, B/4 e C/4 só foram utilizadas em testes bioquímicos quando eventualmente as amostras A/1, B/1 e C/1 não apresentavam turbidez no caldo azida dextrose, permanecendo estocadas sob congelamento.

4.2.2.2 Testes para caracterização do gênero *Enterococcus*

A - Coloração de Gram

Das amostras que se encontravam em solução salina (NaCl 0,85%), foi feito esfregaço com uma alçada da solução em lâmina de vidro e esse material foi

corado pelo método de Gram, e observado ao microscópio óptico em objetiva de 100X (imersão).

B - Crescimento em 6,5% de cloreto de sódio

A tolerância a altas concentrações de sal foi verificada pelo crescimento bacteriano em três ml de BHI acrescidos de cloreto de sódio a 6,5% (Labsynth-São Paulo-Brasil), 0,1% de solução alcoólica de púrpura de bromocresol a 1,6% (Labsynth-São Paulo-Brasil), e 0,1% de D - glicose (Labsynth-São Paulo-Brasil). Após incubação a 35 °C durante 18-24h, a turvação do meio, acompanhada ou não da mudança de coloração de púrpura para amarelo, é indicativo de reação positiva.

4.2.2.3 Testes para Identificação da espécie *E. faecalis*

A - Utilização do piruvato de sódio

A utilização do piruvato de sódio a 1% (Isofar-Rio de Janeiro-Brasil) foi verificada a partir da inoculação de uma gota de suspensão salina da amostra em três ml de caldo piruvato. A leitura é feita até o 7º dia de incubação a 35 °C. A mudança da coloração do meio para amarelo é indicativa de reação positiva

B - Tolerância ao telurito de potássio

As amostras em solução salina foram semeadas em ágar BHI, acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro e telurito de potássio a 0,04% (Sigma-

Japão), e incubadas a 35 °C. A leitura é feita em 24 horas e durante sete dias. O crescimento de colônias negras é indicativo de reação positiva.

4.2.2.4 Validação dos testes convencionais adotados nos experimentos:

Identificação automatizada

Foi selecionada, dos dentes, uma amostra de cada fase da coleta microbiológica (A, B e C) que positivou em todos os testes convencionais realizados. Essas amostras foram submetidas à leitura automatizada. O sistema de identificação por meio de painéis MicroScan Gram positivos têm demonstrado uma excelente especificidade para as espécies mais comuns do gênero *Enterococcus*, entre elas o *E. faecalis* (d'AZEVEDO et al., 2001; IWEN et al., 1999). Neste estudo foram utilizados painéis tipo Pos Combo 21 MicroScan para bactérias Gram positivas (Dade Behring, California, USA). A leitura dos painéis foi realizada em aparelho Auto-Scan 4 (Dade Behring, California, USA) no laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.

4.2.2.5 Método de exposição direta (*in vitro*)

Com o objetivo de investigar *in vitro* a ação antimicrobiana, da pasta de hidróxido de cálcio (Calen) e desse medicamento associado à clorexidina a 1% sobre os isolados obtidos nas coletas microbiológicas, foram utilizadas 21 amostras de *E. faecalis* oriundas de uma das três fases da coleta de cada dente. Para tal, foi realizado o teste de exposição direta de acordo com Estrela et al. (2001).

Os isolados foram semeados em ágar BHI, para obtenção de biomassa, incubados a 37 °C por um período de 24 horas. Decorrido esse período, as células bacterianas foram ressuspensas, em solução salina em uma concentração de aproximadamente 3×10^8 células ml^{-1} , à semelhança do tubo nº1 da escala de Macfarland.

A solução salina foi transferida para placas de Petri e pontas de papel absorventes autoclavadas de nº 50 (Tanari, Tanarium Indústria Ltda., Manacaru, Am, Brasil) foram imersas por 5 minutos nessa solução, para que ocorresse a contaminação. Após esse período, as pontas de papel foram removidas da solução contaminante e colocadas em placas do tipo Petri, divididas equitativamente em dois grupos. Um grupo teve as pontas de papel expostas à pasta de hidróxido de cálcio (Calen) e o outro, a essa pasta associada à clorexidina a 1%. O grupo controle foi composto de solução salina e 1% de ágar-ágar (Difco-MD, USA). Todo esse material permaneceu em estufa a 37 °C durante sete e 14 dias. Decorrido o intervalo de tempo do estudo, as pontas foram removidas do contato dos medicamentos e transportadas individualmente para tubos de ensaio com 5 ml de caldo Letheen (Difco-MD, USA), um meio contendo neutralizantes e recomendado para esses testes. Os tubos foram, então, incubados a 37 °C por um período de 48 horas. Após o tempo requerido, um inóculo de 0,1ml foi obtido a partir do caldo Letheen e transferido para 5 ml de caldo BHI. Os tubos com caldo BHI foram incubados nas mesmas condições anteriores. Observou-se crescimento bacteriano pela turvação do meio. Quando o caldo BHI apresentava-se positivo ao crescimento bacteriano, uma alçada era transferida para ágar bile esculina para confirmação final dos

resultados. Todos os testes foram realizados em triplicata e em estritas condições assépticas (Figura 2).

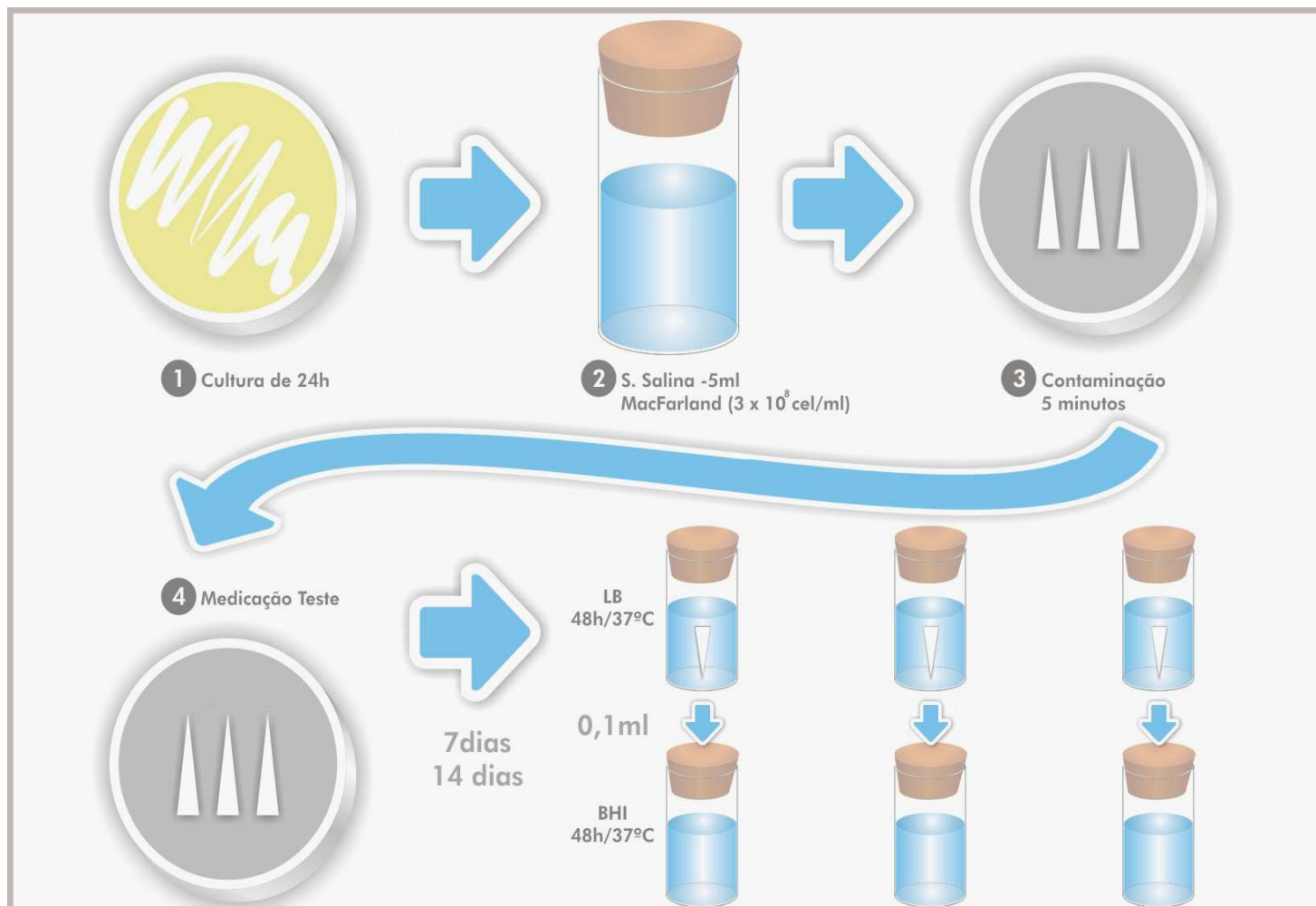


FIGURA 2. Teste de exposição direta (ESTRELA et al., 2001).

5 RESULTADOS

5.1 Ocorrência de *Enterococcus faecalis*

Nas amostras dos 10 casos com diagnóstico de necrose pulpar, apenas em duas foi possível isolar o *E. faecalis* antes do preparo químico-mecânico (Tabela 1). Nos 25 casos restantes foi possível isolar *E. faecalis* em 18 amostras (Tabela 2). Esses resultados demonstram que houve uma maior presença de *E. faecalis* nos canais radiculares dos dentes que apresentavam tratamento resistente à terapia endodôntica que naqueles cujo diagnóstico era de necrose pulpar com lesão perirradicular assintomática (Figura 3). No controle da desinfecção do campo operatório, duas amostras apresentaram contaminação, porém não se tratava de *E. faecalis*, e nesses dentes, não isolamos *E. faecalis* em nenhuma das coletas.

TABELA 1. Ocorrência de *E. faecalis* em casos de necrose pulpar associada à lesão perirradicular.

Dentes	1ª amostra microbiológica (A)
1	-
2	-
5	-
6	-
15	-
19	+
22	-
24	-
30	+
32	-

(+) resultado positivo=presença de *E. faecalis*

(-) resultado negativo=ausência de *E. faecalis*

TABELA 2. Ocorrência de *E. faecalis* nos casos resistentes à terapia endodôntica.

Dentes	1ª Amostra microbiológica(A)
3	-
4	+
7	+
8	+
9	+
10	+
11	+
12	+
13	+
14	+
16	-
17	+
18	+
20	+
21	-
23	-
25	-
26	+
27	-
28	+
29	+
31	+
33	+
34	+
35	-

(+) resultado positivo=presença de *E. faecalis*

(-)resultado negativo=ausência de *E. faecalis*

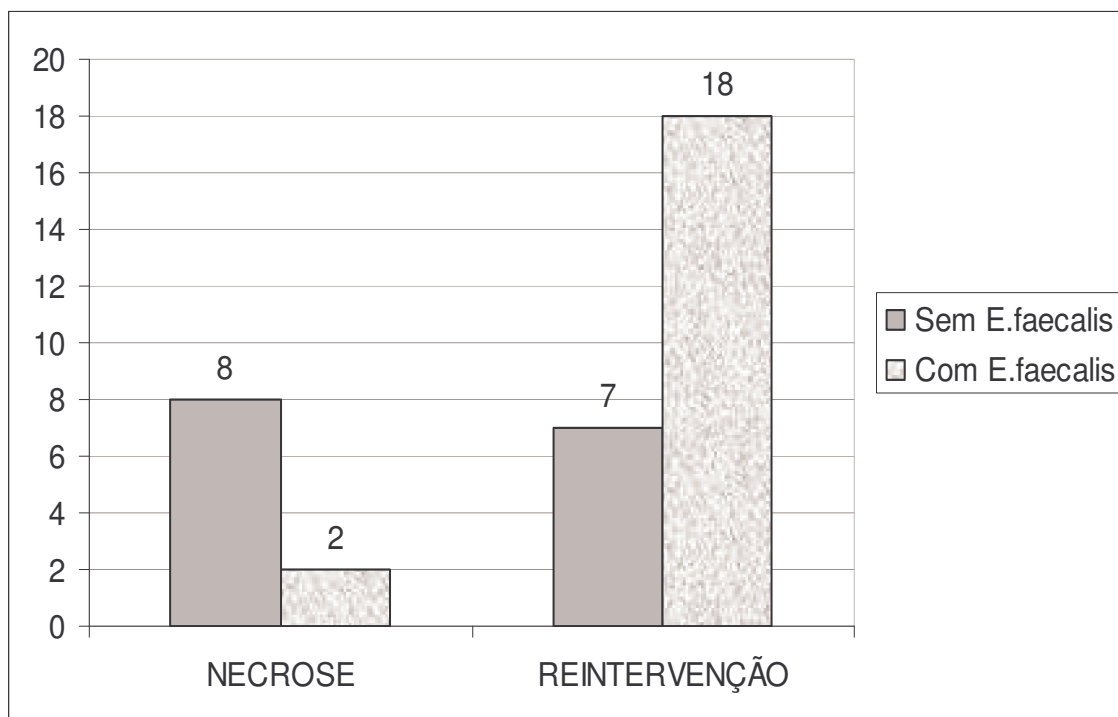


GRÁFICO 1. Ocorrência de *E. faecalis* nos casos de necrose pulpar com lesão perirradicular e casos de tratamento resistente à terapia endodôntica (reintervenção).

5.2 Eficácia do tratamento

Dos trinta e cinco dentes investigados, um grupo de 15 (grupo 1) foi medicado com a pasta de hidróxido de cálcio (Calen) e um grupo de 20 (grupo 2) com a associação dessa pasta ao gluconato de clorexidina a 1% . Foi possível isolar *E. faecalis* na primeira coleta (A), em 9 e 11 dentes do grupo 1 e do grupo 2, respectivamente.

5.2.1 Tratamento com pasta de hidróxido de cálcio (grupo 1)

Na primeira coleta do grupo 1 (A), de um total de 15, foi isolado *E. faecalis* em nove dentes. Em um dos pacientes, não foi possível realizar as duas últimas coletas, pois, nesse caso, ocorreu *flare-up* e o protocolo foi interrompido. Na segunda coleta, obtida após a medicação intracanal, dos nove dentes, seis apresentaram contaminação por *E. faecalis*, sendo que um daqueles cujo crescimento bacteriano foi negativo na primeira coleta (número 3), apresentou a bactéria na segunda coleta. Quando os canais permaneceram três dias sem medicação, pôde-se observar a presença de *E. faecalis*, nas amostras da terceira coleta, em 10 dos casos (Tabela 3).

TABELA 3. Resultados após as três coletas realizadas no grupo medicado com Calen.

Dentes	1ª Amostra (A) Antes do Preparo Químico-mecânico	2ª Amostra (B) Após a medicação	3ª Amostra (C) Após o período sem medicação
2	-	-	-
3	-	+	+
4	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+
10	+	-	+
11	+	+	+
12	+	-	+
13	+	+	+
17	+	+	+
21	-	-	-
24	-	-	-
32	-	●	●
34	+	-	+
35	-	-	-

(+) → resultado positivo = presença de *E. faecalis*

(-) → resultado negativo = ausência de *E. faecalis*

(●) → *Flare-up*

5.2.2 Tratamento com pasta de hidróxido de cálcio (Calen) associado à clorexidina a 1% (Grupo 2)

Dos vinte dentes medicados com a pasta de hidróxido de cálcio (Calen) associado à clorexidina a 1%, em onze foi possível isolar *E. faecalis* na primeira coleta microbiológica. Nas segundas amostras (coleta B), pôde-se observar a presença de *E. faecalis* em três casos. Na terceira coleta, essa bactéria estava presente em três casos. Em um dos casos dessa terceira coleta, o *E. faecalis* não foi isolado nas duas coletas anteriores, esse paciente retornou para a coleta final 10 dias após a consulta anterior modificando o protocolo estabelecido (número 27). Em outro caso (número 30) a bactéria foi isolada nas duas primeiras coletas (A e B), porém não foi possível recuperá-la na terceira (coleta C). A Tabela 4 descreve os resultados das três coletas realizadas nesse segundo grupo.

TABELA 4. Resultados após as três coletas realizadas no grupo medicado com pasta de hidróxido de cálcio (Calen) associada à clorexidina a 1% como medicação intracanal.

Dentes	1ª Amostra (A) Antes do Preparo Químico- mecânico	2ª Amostra (B) Após a medicação	3ª Amostra (C) Após o período sem medicação
1	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
9	+	-	-
14	+	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
18	+	-	-
19	+	-	-
20	+	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
25	-	-	-
26	+	-	-
27	-	-	+*
28	+	-	-
29	+	+	+
30	+	+	-
31	+	+	+
33	+	-	-

(+) → resultado positivo = presença de *E. faecalis*

(-) → resultado negativo = ausência de *E. faecalis*

(*) → paciente retornou 10 dias após a 2ª coleta

5.2.3 Teste de exposição direta (*in vitro*)

Por meio do teste de exposição direta, *in vitro*, por períodos de sete dias e 14 dias, foi avaliada a ação antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio (Calen) e dessa medicação associada à clorexidina a 1% sobre os isolados obtidos de uma das três coletas microbiológicas, de 21 dos dentes em estudo, identificados como *E.*

faecalis. As tabelas 5 e 6 apresentam os resultados após esses períodos, respectivamente. Um grupo controle foi utilizado, nos mesmos períodos, para que fosse confirmada a viabilidade das células (Tabela 7).

TABELA 5. Efeito antimicrobiano da pasta Calen e da associação dessa pasta à clorexidina a 1% com 7 dias de exposição.

Amostras	Calen	Calen+Clorexidina1%
03/B/1/2	-	-
04/A/1/3	-	-
07/A/1/1	+	-
08/A/1/3	-	-
09/A/1/2	-	-
10/A/1/3	-	-
11/A/1/1	-	-
12/A/1/1	-	-
13/A/1/1	+	-
14/A/1/1	-	-
17/A/1/1	+	-
18/A/4/1	-	-
19/A/1/1	-	-
20/A/4/1	-	-
26/A/1/1	-	-
27/C/4/1	-	-
28/A/1/1	-	-
29/A/1/1	-	-
30/A/1/1	-	-
31/A/1/2	-	-
33/A/1/2	-	-

(+) → resultado positivo = presença de *E. faecalis*

(-) → resultado negativo = ausência de *E. faecalis*

TABELA 6. Efeito antimicrobiano da pasta Calen e da associação dessa pasta à clorexidina a 1% com 14 dias de exposição.

Amostras	Calen	Calen+Clorexidina1%
03/B/1/2	-	-
04/A/1/3	-	-
07/A/1/1	-	-
08/A/1/3	-	-
09/A/1/2	-	-
10/A/1/3	-	-
11/A/1/1	-	-
12/A/1/1	+	-
13/A/1/1	-	-
14/A/1/1	-	-
17/A/1/1	-	-
18/A/4/1	-	-
19/A/1/1	-	-
20/A/4/1	-	-
26/A/1/1	-	-
27/C/4/1	-	-
28/A/1/1	-	-
29/A/1/1	-	-
30/A/1/1	-	-
31/A/1/2	-	-
33/A/1/2	-	-

(+) → resultado positivo = presença de *E. faecalis*

(-) → resultado negativo = ausência de *E. faecalis*

TABELA 7. Resultados do grupo controle.

Amostras	7dias	14 dias
03/B/1/2	+	+
04/A/1/3	+	+
07/A/1/1	+	+
08/A/1/3	+	+
09/A/1/2	+	+
10/A/1/3	+	+
11/A/1/1	+	+
12/A/1/1	+	+
13/A/1/1	+	+
14/A/1/1	+	+
17/A/1/1	+	+
18/A/4/1	+	+
19/A/1/1	+	+
20/A/4/1	+	+
26/A/1/1	+	+
27/C/4/1	+	+
28/A/1/1	+	+
29/A/1/1	+	+
30/A/1/1	+	+
31/A/1/2	+	+
33/A/1/2	+	+

(+) → resultado positivo = presença de *E. faecalis*

(-) → resultado negativo = ausência de *E. faecalis*

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

6.1 Métodos estatísticos

Para análise dos dados utilizaram-se técnicas de estatística descritiva e estatística inferencial. As técnicas de estatística descritiva envolveram as distribuições absolutas e percentuais e como técnica de estatística inferencial foi utilizado Teste Exato de Fisher desde que as condições para utilização do teste Qui-quadrado não foram verificadas (ALTMAN; HALL; CHAPMAN, 1991; ZAR, 1999).

A margem de erro utilizada para a decisão dos testes estatísticos foi de 5,0% (0,05).

6.2 Resultados

6.2.1 Avaliação da ocorrência de *E. faecalis* segundo o tipo de amostra

Da Tabela 8 verifica-se que o percentual de amostras positivas foi mais elevado entre os casos de tratamento resistentes à terapia endodôntica do que entre os casos de necrose pulpar associada à lesão perirradicular (72,0% x 20,0% respectivamente) e por meio do teste Exato de Fisher comprovou-se diferença significativa entre os dois casos ao nível de significância considerado de 5,0% ($p < 0,05$).

TABELA 8. Avaliação da ocorrência de *E. faecalis* segundo o tipo de amostra.

Amostras	Ocorrência de <i>E. faecalis</i>						Valor de p
	Positivo		Negativo		TOTAL		
	N	%	N	%	N	%	
•Necrose pulpar associada à lesão perirradicular.	2	20,0	8	80,0	10	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,0082*
•Casos de tratamento resistentes à terapia endodôntica.	18	72,0	7	28,0	25	100,0	
Grupo total	20	57,1	15	42,9	35	100,0	

(*) – Diferença significativa em nível de 5,0%.

(1) – Por meio do teste Exato de Fisher.

6.2.2 Avaliação da positividade de *E. faecalis* segundo o tipo de pasta (*in vitro*)

Na Tabela 9 analisam-se os resultados, *in vitro*, da pasta utilizada após sete dias de exposição. Dessa tabela verifica-se que das 42 amostras analisadas pelas duas pastas, com exceção de três amostras positivas para *E. faecalis* quando foi utilizada a pasta Calen, todas as demais amostras foram negativas. Há diferença percentual entre os dois medicamentos em relação ao resultado da positividade do *E. faecalis* (Gráfico 2), embora não haja diferença estatística significativa verificada pelo teste Exato de Fisher em nível de significância de 5,0 ($p > 0,05$).

TABELA 9. Avaliação da positividade de *E. faecalis* segundo o tipo de pasta com 7 dias de exposição.

Pastas	Ocorrência de <i>E. faecalis</i>				TOTAL		Valor de p
	Positivo N	%	Negativo n	%	N	%	
• Calen	3	14,3	18	85,7	21	100,0	$p^{(1)} = 0,2317$
• Calen + clorexidina a 1%	-	-	21	100,0	21	100,0	
Grupo total	3	7,1	39	92,9	42	100,0	

(*) – Diferença significativa em nível de 5,0%.

(1) – Por meio do teste Exato de Fisher.

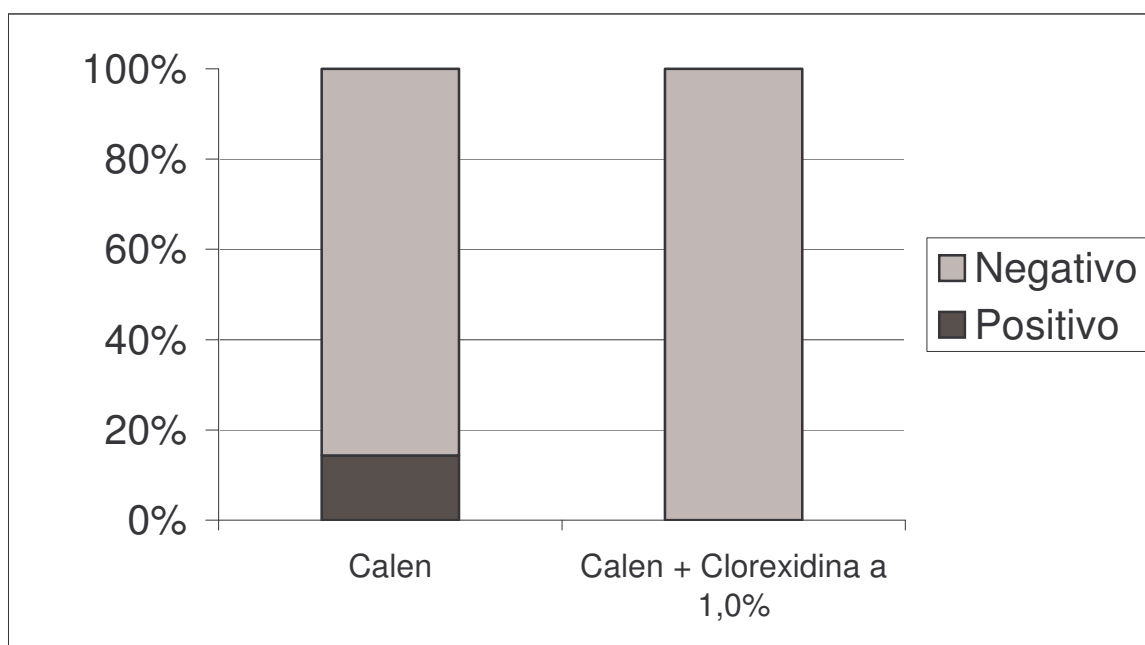


GRÁFICO 2. Avaliação percentual da atividade antimicrobiana segundo o tipo de pasta na avaliação com 7 dias de exposição.

Na Tabela 10 analisam-se os resultados na avaliação com 14 dias. Nessa tabela verifica-se que das 42 amostras analisadas pelas duas pastas, com exceção de uma amostra positiva quando foi utilizada a pasta Calen todas as demais amostras foram negativas (Gráfico 3) e pelo teste Exato de Fisher não se comprova diferença significativa entre os dois tipos de pasta em relação aos resultados da positividade com 14 dias ($p > 0,05$).

TABELA 10. Avaliação da ocorrência de atividade antimicrobiana segundo o tipo de pasta com 14 dias de exposição.

Pastas	Atividade antimicrobiana						Valor de p
	Positivo		Negativo		TOTAL		
	N	%	n	%	N	%	
• Calen	1	4,8	20	95,2	21	100,0	p ⁽¹⁾ = 1,000
• Calen + Clorexidina a 1%	-	-	21	100,0	21	100,0	
Grupo total	1	2,4	41	97,6	42	100,0	

(*) – Diferença significativa em nível de 5,0%.

(1) – Por meio do teste Exato de Fisher

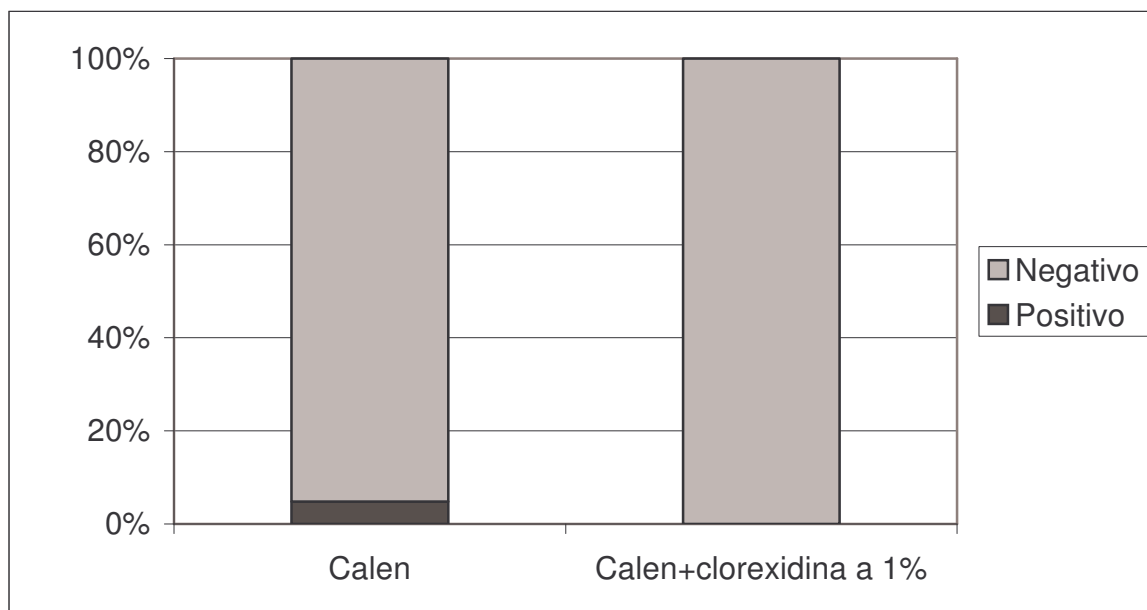


GRÁFICO 3. Avaliação percentual da atividade antimicrobiana segundo o tipo de pasta na avaliação com 14 dias de exposição.

7 DISCUSSÃO

A participação de microrganismos na etiopatogenia das lesões perirradiculares é inquestionável (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERLD, 1965; SUNDQVIST², 1976 apud SIQUEIRA JR.; RÔÇAS; LOPES, 2004b). O tratamento dessas lesões consiste na erradicação desses microrganismos ou na redução substancial da carga microbiana, prevenindo que ocorra, após a terapia endodôntica, a reinfecção do canal e conseqüentemente o insucesso (NAIR, 2006).

Na última década, deu-se mais atenção à microbiota endodôntica de casos cujo tratamento endodôntico fracassou. Um microrganismo em especial, o *E. faecalis*, tem sido isolado com maior prevalência nesses casos. Por métodos de cultivo tradicional, observou-se uma variação na prevalência dessa bactéria de 32% a 70% dos casos investigados (GOMES et al., 2004; HANCOCK et al., 2001; MOLANDER et al., 1998; PECIULIENE et al., 2000, PINHEIRO et al., 2003; SUNDQVIST et al., 1998) enquanto nas técnicas moleculares, dois estudos detectaram a presença de *E. faecalis* em 67% e 77% dos casos analisados (RÔÇAS, SIQUEIRA Jr., SANTOS, 2004; SIQUEIRA Jr; RÔÇAS, 2004).

No nosso estudo investigamos, por meio de técnicas de cultivo tradicional, a presença de *E. faecalis* em 25 casos de tratamentos resistentes à terapia endodôntica, onde foi isolada a bactéria em 18 (72%) dos casos. Os resultados confirmam os achados da literatura que demonstram uma alta ocorrência de *E.*

² Sundqvist, G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps (Dissertation).Umea, Sweden: University of Umea, 1976.

faecalis em tratamentos resistentes à terapia endodôntica, quando comparados com os casos de infecção endodôntica de natureza primária.

Divergindo dos nossos resultados, Cheung e Ho (2001), por meio de métodos de cultura, não isolaram *Enterococcus* dos casos de tratamentos resistentes à terapia endodôntica, assim como Rolph et al. (2001), utilizando métodos moleculares, também não detectaram a bactéria. Dois estudos detectaram essa bactéria, em casos resistentes à terapia endodôntica associados à lesão perirradicular, em uma menor prevalência, em 5,5% (KAUFMAN et al., 2005) e 22% (FOUAD et al., 2005), essas variações podem ser atribuídas, não só à técnica de identificação utilizada, como também possivelmente as dificuldades concernentes à técnica de amostragem (RÔÇAS; SIQUEIRA Jr.; SANTOS, 2004).

Na investigação da microbiota endodôntica primária, a literatura demonstra que essa bactéria se apresenta em um percentual menor, diferindo bastante dos resultados obtidos em casos resistentes à terapia endodôntica. Sjögren et al. (1991) isolaram *E. faecalis* em 3 (10%) dos 30 dentes que apresentavam necrose associada à lesão perirradicular. Ferrari, Cai e Bombana (2005) isolaram *Enterococcus ssp.* em 16% de 25 dentes que apresentavam infecção endodôntica primária assintomática. Siqueira Jr. et al. (2002), através de métodos moleculares, detectaram em casos assintomáticos de infecção primária *E. faecalis* em 11,55% dos dentes, já em casos de abscesso agudo, 3,7%. Rôças, Siqueira e Santos (2004) analisando, por meio de *nested* PCR, a prevalência de *E. faecalis* em dentes com infecção de natureza primária observaram que os canais radiculares associados a lesões perirradiculares assintomáticas apresentaram a bactéria em 33% dos casos,

nos canais associados à periodontite apical aguda, 10% e nos casos de abscesso perirradicular agudo, em 5%. Em se tratando de infecções primárias, os casos associados a lesões assintomáticas apresentavam um percentual de *Enterococcus* um pouco mais elevado do que os casos em que a sintomatologia clínica está presente.

Analizamos um total de 10 casos de necrose associados à lesão perirradicular assintomática; desses, dois (20%) apresentaram a ocorrência de *E. faecalis*. Concluímos que o percentual de amostras positivas para o *E. faecalis* foi mais elevado nos casos de tratamento resistente à terapia endodôntica do que entre os casos de necrose pulpar associada à lesão perirradicular assintomática (72% X 20% respectivamente), comprovando-se diferença estatística significativa entre os dois casos, o que corrobora os trabalhos consultados na literatura (FERRARI; CAI; BOMBANA, 2005; GOMES et al., 2004; MOLANDER et al., 1998; PECIULIENE et al., 2000; 2001; PINHEIRO et al., 2003; RÔÇAS; SIQUEIRA JR.; SANTOS, 2004; SIQUEIRA Jr. et al., 2002; SJÖGREN et al., 1991; SUNDQVIST et al., 1998).

O *Enterococcus* apresenta características peculiares que o possibilitam sobreviver por longos períodos em ambientes com escassez nutricional (FIGDOR; DAVIES; SUNDQVIST, 2003; SEDGLEY et al., 2005), invadir túbulos dentinários (HAAPASALO; ØRSTAVIK, 1987; LOVE, 2001), expressar proteínas com a capacidade de unirem-se à dentina, tais como protease serina, gelatinase e collagenase (HUBBLE et al., 2003; SEDGLEY et al., 2005); ele tem ainda a capacidade de sobreviver em monoinfecção, sem necessitar de inter-relações sinérgicas entre outras bactérias, sendo isolado muitas vezes em cultura pura

(PECIULIENE et al., 2001; PINHEIRO et al., 2003) e suporta ambientes com pH elevado (BYSTRÖM; CLAEISSON; SUNDQVIST, 1985; EVANS et al., 2003; McHUGH et al., 2004), conferindo-lhe resistência à terapia endodôntica a base de hidróxido de cálcio.

Utilizamos neste estudo como medicação intracanal uma pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen) e essa mesma pasta associada à clorexidina a 1%, com o objetivo de avaliar a efetividade das duas pastas *in vivo*. Do total de 15 dentes (grupo 1) medicados com pasta de hidróxido de cálcio, nove dentes evidenciaram amostras positivas para *E. faecalis* na primeira coleta antes do preparo químico – mecânico; após o período com a medicação intracanal, seis desses nove dentes ainda apresentavam amostras positivas na segunda coleta. Um dos 15 dentes que não apresentou *E. faecalis* na primeira coleta (dente 3) apresentou a bactéria na segunda, esse caso tratava-se de uma reintervenção endodôntica. Esse resultado pode ser explicado devido às limitações de técnicas de amostragem e às próprias restrições físicas do sistema de canais radiculares, que tornam algumas vezes a obtenção de uma amostra representativa um objetivo não muito fácil. Essa dificuldade ainda é maior quando a coleta é feita de reintervenção, no qual o número de microrganismos é reduzido e algumas células podem ser perdidas durante o procedimento de remoção do material obturador. Como consequência, o número de células na amostra pode estar aquém do limite de detecção dos métodos de cultura (SIQUEIRA Jr; RÔÇAS, 2004).

Alguns estudos *in vitro* somam-se aos nossos resultados, demonstrando que o hidróxido de cálcio não apresenta uma efetividade satisfatória sobre o *E.*

faecalis. Haapasalo e Ørstavik (1987) infectaram dentes com *E. faecalis* e os medicaram com Calasept, uma pasta à base de hidróxido de cálcio; após 10 dias, ainda era possível observar a presença dessa bactéria nos espécimes medicados. Resultados similares foram observados por Siqueira Jr. e Uzeda (1996). Estrela et al. (1999) e Lin et al. (2005) também obtiveram a mesma constatação, pois dentes infectados por essa bactéria e medicados com uma pasta de hidróxido de cálcio, após sete dias ainda evidenciavam contaminação. Na realização de estudo “*in vivo*”, Dahlén et al. (2000) isolaram cepas de *Enterococcus ssp.* de 29 dentes que já haviam sido submetidos ao preparo químico-mecânico e à medicação intracanal; desses dentes, 17 haviam sido medicados com hidróxido de cálcio. Os resultados sugerem que a terapia não foi eficiente em eliminar essa bactéria. Após a identificação das espécies, constatou-se que 26 amostras eram de *E. faecalis* e três de *E. faecium*: em 23 amostras, o *E. faecalis* foi a única bactéria isolada.

Os resultados obtidos por Lana et al. (2001) concluíram que a infecção endodôntica pode persistir mesmo depois do tratamento com hidróxido de cálcio e que o tratamento é mais efetivo sobre a microbiota anaeróbia estrita do que sobre os anaeróbios facultativos. Assim como, Chávez de Paz et al. (2003) apresentaram resultados sugestivos segundo os quais os procedimentos endodônticos são mais efetivos contra bactérias Gram negativas anaeróbias e menos efetivos contra as Gram positivas, das quais várias são facultativas. Esses autores isolaram *Enterococcus* em 26 dentes de uma primeira amostra; esses dentes já haviam sido medicados anteriormente com hidróxido de cálcio ou com iodeto de potássio iodetado, após a repetição da medicação intracanal, numa segunda coleta, ainda foi possível recuperar *Enterococcus* em 15 (57,69%). Esses resultados *in vivo*

contribuem para confirmar os nossos resultados, tornando questionável o uso do hidróxido de cálcio como medicação intracanal no combate a essa bactéria.

No presente estudo, como resultado da terceira coleta microbiológica, aquela que foi realizada três dias após a permanência dos dentes sem medicação intracanal, observou-se em todos os casos que se isolou *E. faecalis* na primeira coleta, a presença de *E. faecalis* na terceira coleta; o dente 3 que só apresentou o *E. faecalis* na segunda coleta, também exibiu a bactéria na terceira, sendo um total de 10 dentes contaminados. Os canais foram deixados sem medicação por três dias, para permitir que possíveis bactérias remanescentes no sistema de canais radiculares, após a terapia endodôntica, pudessem se multiplicar a um nível que fosse possível recuperá-las (SUNDQVIST et al., 1998). Alguns estudos relataram resultados semelhantes quanto à recuperação de microrganismos, após um período sem medicação, novos casos aparecem em amostras subseqüentes, apesar do preparo químico-mecânico e da medicação intracanal, sugerindo a presença de condições para seu crescimento e sobrevivência nos canais (CHÁVEZ DE PAZ et al, 2003; FERRARI; CAI; BOMBANA, 2005; GOMES; LILEY; DRUCKER, 1996).

A capacidade antimicrobiana da clorexidina nas infecções endodônticas vem sendo avaliada, tanto como irrigante, quanto como medicação intracanal, principalmente frente ao *E. faecalis* (BASRANI et al., 2003; DUNAVANT et al., 2006; FAVA; SIQUEIRA Jr. 2001; FERRAZ et al., 2001; GOMES et al., 2003; LIMA; LIN et al., 2003; PORTENIER et al., 2006). Entretanto, a microbiota endodôntica é de natureza mista, e faz-se necessário que a medicação intracanal utilizada seja efetiva em face dessa diversidade microbiana. O hidróxido de cálcio tem atividade

antimicrobiana, por apresentar um alto pH; além disso, atua na inativação do LPS, componente tóxico da parede celular das bactérias Gram negativas (SAFAVI; NICHOLS, 1993). Esse componente representa um expressivo fator de virulência, determinando efeitos biológicos que resultam na amplificação das reações inflamatórias, sendo capaz de ativar o sistema complemento, as plaquetas, os mastócitos, os basófilos, as células endoteliais, assim como ativam macrófagos a secretarem substâncias capazes de causar reabsorções ósseas nas lesões perirradiculares (ESTRELA; HOLLAND, 2004). A permanência do LPS no sítio de infecção promoveria a manutenção da lesão perirradicular. Portanto, a medicação intracanal deve não só ter ação antimicrobiana, mas também ter a capacidade de inativar o lipopolissacarídeo.

Resultados apresentados por Buck et al. (2001) demonstraram que a clorexidina não apresenta a capacidade de detoxificar o lipídio A, a região específica do lipopolissacarídeo que confere toxicidade ao mesmo. Alguns estudos *in vitro* têm avaliado a associação de diversas substâncias ao hidróxido de cálcio, na tentativa de se obter resultados mais favoráveis à eliminação da população microbiana resistente à terapêutica endodôntica (LIMA; FAVA; SIQUEIRA Jr, 2001; MOLANDER; DAHLÉN, 2003; SIRÉN et al., 2004). Avaliações *in vitro* da associação do hidróxido de cálcio à clorexidina, em dentes infectados por *Enterococcus*, têm constatado uma maior eficácia da associação quando comparada ao hidróxido de cálcio (EVANS et al., 2003; GOMES et al., 2003; NAGESHWAR; KIDIYOOR; HEDGE, 2004; SIRÉN et al., 2004).

Almyroudi et al. (2002) observaram que a clorexidina a 1% em gel e a clorexidina em gel associada ao hidróxido de cálcio foram eficientes em eliminar *E. faecalis*, quando utilizadas como medicação por 3, 8 e 14 dias, mostrando que clorexidina a 1% é ligeiramente mais eficiente do que associada ao hidróxido de cálcio. Basrani et al. (2003) obtiveram, em dentes infectados por *E. faecalis*, resultados favoráveis ao uso da clorexidina em concentrações de 2% e 0,2%, ou a associação dessa ao Ca(OH)_2 , quando comparados ao uso do hidróxido de cálcio. Essa mesma autora observa em outro estudo que a associação dos dois medicamentos resulta em uma medicação com propriedades físico-químicas satisfatórias, não alterando o pH do hidróxido de cálcio e presumivelmente o seu efeito antimicrobiano (BASRANI; GHANEM; TJADERHANE, 2004). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Sirén et al. (2004), que concluíram não haver modificação no pH do hidróxido de cálcio, devido à associação à clorexidina.

Na análise dos resultados obtidos no nosso estudo, nos dentes medicados com a associação da pasta de hidróxido de cálcio (Calen) à Clorexidina a 1%, a efetividade foi diferente da observada com o uso da pasta de hidróxido de cálcio (Calen). Dos 20 dentes em que se utilizou essa medicação, em 11 evidenciou-se *E. faecalis* antes do preparo químico-mecânico e da colocação da medicação. Após a medicação, na segunda coleta microbiológica, foi possível recuperar *E. faecalis* em 3 (27,27%) dentes. Os resultados são sugestivos de que associação desse medicamento à pasta de hidróxido de cálcio favoreceu a eliminação dessa população bacteriana, quando comparamos aos resultados obtidos com a pasta à base de hidróxido de cálcio, mas não a eliminou completamente.

Como a maioria dos estudos tem sido realizada *in vitro*, com simulação limitada da realidade clínica da infecção endodôntica, uma comparação dos nossos resultados a outros estudos torna-se difícil por não haver trabalhos *in vivo* que tenham utilizado essa associação focando exclusivamente o combate ao *E. faecalis*. Nossos resultados são sugestivos de que a adição da clorexidina à pasta à base de hidróxido de cálcio favoreceu a eliminação do *E. faecalis*. Corroborando esses resultados os demais dados obtidos pelos trabalhos *in vitro* (EVANS et al., 2003; GOMES et al., 2003; SIRÉN et al., 2004; NAGESHWAR; KIDIYOOR; HEDGE, 2004).

Quando analisamos os resultados da terceira coleta microbiológica, aquela realizada três dias após a permanência dos dentes sem medicação, apenas três (27,27%) dentes permaneceram infectados, sugerindo que houve uma atividade antibacteriana residual do medicamento, mesmo após a sua remoção, diferindo dos resultados obtidos pela pasta de hidróxido de cálcio. Um dos dentes (dente 27) apresentou contaminação por *E. faecalis* apenas nessa 3ª coleta, nas demais coletas não foi possível recuperar a bactéria. O tratamento desse paciente fugiu ao protocolo estabelecido, pois ele só retornou à terceira coleta microbiológica 10 dias após a segunda sessão, permanecendo mais tempo sem medicação intracanal. Isso pode explicar o fato de não termos conseguido isolá-lo nas duas primeiras coletas e na 3ª o microrganismo ter proliferado em quantidades suficientes que permitissem a sua recuperação. Há a possibilidade de infecção entre as sessões por falha do selamento coronário com material obturador temporário, levando a uma infiltração bacteriana através da interface material restaurador e paredes dentárias. Entretanto, a seleção do material obturador temporário foi realizada objetivando evitar essa

ocorrência. Analisando, *in vitro*, a infiltração bacteriana na câmara pulpar e em canais radiculares de dentes já obturados, Barthel et al. (1999), utilizando alguns cimentos provisórios como materiais obturadores temporário por um período de 30 dias em dentes expostos a meio contaminado com *Streptococcus mutans*, observaram que os melhores resultados aconteceram nos dentes em que se utilizou ionômero de vidro (Ketac Fil, Espe, Seefeld, Germany). Dos vinte dentes investigados, apenas um apresentou contaminação bacteriana. O cavit, o IRM, e mesmo o selamento duplo de cavit e Ketac Fil ou IRM e Ketac fill não foram tão eficientes. Baseado na capacidade seladora desse cimento, optamos por utilizá-lo no presente estudo.

A clorexidina apresenta uma propriedade que lhe confere poder de atuação antimicrobiana, mesmo após a sua remoção do canal radicular; devido a sua natureza catiônica, essa substância é adsorvida pela hidroxiapatita da dentina e depois liberada lentamente, levando a uma ação bactericida residual (substantividade) que pode proteger a dentina contra colonização bacteriana após o período da medicação (DAMETTO et al., 2005; LENET et al., 2000; LEONARDO et al., 1999; ROSENTHAL; SPANGBERG; SAFAVI, 2004). White, Hays e Janer (1997) observaram atividade antimicrobiana da clorexidina a 2% sobre *S. mutans*, após a remoção do medicamento por até 72 horas. Quando utilizaram uma menor concentração (0,12%), os resultados não foram os mesmos. Em um estudo *in vivo*, utilizando a clorexidina a 2% como substância irrigante, Leonardo et al. (1999) observaram que decorridas 48 horas do uso do irrigante, houve redução da microbiota em 77,78% e o *S. mutans* foi completamente eliminado. Outro estudo demonstrou que a atividade antimicrobiana residual da clorexidina sobre o *E. faecalis* pôde ser observada por um período de até 21 dias (LENET et al., 2000).

Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Komorowski et al. (2000); os autores concluíram que a clorexidina a 0,2%, quando aplicada em canais radiculares de bovinos por sete dias, pôde apresentar atividade antibacteriana residual sobre o *E. faecalis* por um período de até três semanas. Rosenthal, Spangberg e Safavi (2004) não só avaliaram a atividade residual da clorexidina a 2% como também a quantidade de clorexidina que permaneceu nos dentes durante um período de até 12 semanas após a sua utilização. Observaram que a atividade residual antimicrobiana mais elevada foi até 24 horas, diminuindo progressivamente até a 12^a semana, assim como a quantidade residual de clorexidina nos dentes também diminui com a progressão do tempo. A ação antimicrobiana residual fornecida por essa substância vem sendo considerada como uma propriedade benéfica na terapêutica endodôntica.

Um resultado interessante do nosso estudo refere-se ao dente 30, que na segunda coleta ainda havia persistência de infecção, porém na terceira não foi possível isolar mais a bactéria. Diante dos dados apresentados pela literatura podemos concluir que os bons resultados obtidos por nós na 3^a coleta microbiológica, quando no uso da associação da clorexidina à pasta hidróxido de cálcio, pode ser atribuído a essa atividade antimicrobiana residual da clorexidina.

Além da capacidade antimicrobiana, uma outra propriedade a ser considerada no material utilizado como medicação intracanal é a sua biocompatibilidade aos tecidos periapicais. Delgado (2002), analisando a biocompatibilidade da clorexidina a 2% e da pasta Calen associada à clorexidina a 1%, em tecido subcutâneo de patas traseiras de ratos, observou que, no percentual

de 2%, essa substância não apresentou biocompatibilidade aos tecidos, desenvolvendo reações diversas tais como: edema inicial seguido por inflamação intensa, predominantemente neutrofílica, até a necrose, impedindo a reparação tecidual. Nesse estudo a autora avaliou a associação da pasta Calen à clorexidina a 1%, após 14 dias em contato com o tecido conjuntivo, e pôde observar um processo de reparo tecidual, demonstrando biocompatibilidade.

De Rossi et al. (2005), utilizando a associação do hidróxido de cálcio à clorexidina a 1%, como medicação intracanal por 14 dias, em dentes de cães que apresentavam lesão periapical, constataram, através de exame histológico e radiográfico, que após 120 dias houve significativa redução no tamanho das lesões, ou seja, a medicação utilizada contribuiu para o processo de reparo das lesões periapicais. Sirén et al. (2004) realizaram teste de citotoxicidade da clorexidina a 0,5%, do hidróxido de cálcio e da associação das duas substâncias em fibroblastos de ratos e observaram que, ao ser testado pura, a clorexidina apresentou-se mais tóxica às células do que associada ao hidróxido de cálcio. Os resultados obtidos pela associação dos medicamentos sugeriram que o hidróxido de cálcio atuou, protegendo as células do efeito citotóxico da clorexidina.

Nosso estudo foi realizado *in vivo*, sendo assim acreditamos que do ponto de vista da biocompatibilidade foi mais seguro trabalhar com um percentual de clorexidina já analisado anteriormente, e que oferecia bons resultados. Estudos *in vitro* têm demonstrado uma maior efetividade da clorexidina a 2% no combate ao *E. faecalis* (BASRANI et al., 2003; DAMETTO et al., 2005; DUNAVANT et al., 2006; EVANS et al., 2003; GOMES et al., 2003; LENET et al., 2000; LIMA; FAVA;

SIQUEIRA, 2001; NAGESHWAR; KIDIYOOR; HEDGE, 2004; WHITE; HAYS; JANER; 1997). Diante do exposto, sugerimos que mais estudos sejam realizados em torno da biocompatibilidade dessa substância, para melhor definir o percentual a ser utilizado, sem causar comprometimento ao reparo tecidual.

Os resultados da nossa investigação *in vivo* sugerem uma melhor efetividade da associação da pasta de hidróxido de cálcio à clorexidina sobre o *E. faecalis*, quando comparada à pasta de hidróxido de cálcio, como medicação intracanal, além da clorexidina adicionar atividade antibacteriana residual, mesmo após a sua remoção do sistema de canais radiculares, durante o período testado neste experimento (72 horas).

O método de exposição direta é utilizado em ensaios microbiológicos, para investigar o efeito antimicrobiano de substâncias utilizadas em Odontologia. Esse método está relacionado à efetividade da substância e ao seu contato direto com o microrganismo, fornecendo informações qualitativas a respeito das substâncias (ESTRELA; PIMENTA; ESTRELA, 2001). A partir das amostras de *E. faecalis* obtidas dos pacientes, foi realizado um teste de exposição direta para verificar a eficácia desses medicamentos *in vitro* sobre os isolados. Para tal fim, uma amostra de uma das três coletas de 21 pacientes foi utilizada. Quando se comparou os resultados da exposição ao medicamento por um período de sete dias, apenas 3 (14,35%) amostras de *E. faecalis* expostas à pasta de hidróxido de cálcio apresentaram células viáveis. Na exposição à associação com a clorexidina, não se constatou crescimento bacteriano. Houve uma diferença percentual entre os dois medicamentos, porém não constatamos diferença estatística significativa. Após 14

dias de exposição, das 42 amostras expostas aos medicamentos, apenas uma (4,8%) amostra que foi tratada com a pasta de hidróxido de cálcio, apresentou células viáveis, não havendo, durante o período testado, diferença estatística significativa entre os dois medicamentos quanto à efetividade.

Os resultados do nosso trabalho *in vitro*, através do teste de exposição direta, demonstram uma eficácia superior dos medicamentos quanto à atividade antimicrobiana sobre o *E. faecalis* do que os resultados obtidos *in vivo*. Trabalhos *in vitro* utilizando dentes infectados por *E. faecalis* e medicados com hidróxido de cálcio, têm demonstrado a ineficácia desse medicamento, diferindo dos resultados obtidos pela ação dos medicamentos por meio do contato direto com o microrganismo, esses resultados confirmam os nossos achados (ESTRELA et al., 1999; 2001; SIQUEIRA; UZEDA, 1996). Considerando a invasão dos microrganismos no interior dos túbulos dentinários, torna-se importante verificar a atuação do medicamento à distância (ESTRELA; HOLLAND, 2004), bem como a sua atuação quando em contato com o tecido dentinário, pois a hidroxiapatita, componente inorgânico da dentina, tem a capacidade de inibir a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio (PORTENIER et al., 2001). A exposição direta do microrganismo ao medicamento, eliminaria todas essas variáveis, favorecendo a resultados melhores quanto à efetividade do medicamento no teste de exposição direta.

Em face dos resultados obtidos, sugere-se que mais estudos *in vivo* sejam realizados com a medicação proposta, para que se possa ilustrar melhor a eficácia do medicamento sobre o *E. faecalis*. Devido à dificuldade na seleção dos

casos, não foi possível obter um maior n amostral. Resultados conclusivos a respeito da efetividade desse medicamento devem ser considerados a partir de um maior número de amostras. É importante salientar que o trabalho foi realizado focando exclusivamente o *E. faecalis* e que uma abordagem ampla desse medicamento sobre toda a microbiota endodôntica se faz necessária.

8 CONCLUSÕES

1- Dos 35 dentes analisados, isolou-se *E. faecalis* em 22 dentes.

2- Houve uma maior prevalência de *E. faecalis* nos casos de tratamento resistente à terapia endodôntica quando comparados aos casos de necrose pulpar associada à lesão perirradicular assintomática.

3- Os resultados obtidos *in vivo* foram sugestivos de que associação do gluconato de clorexidina a 1% à pasta de hidróxido de cálcio (Calen) favoreceu a eliminação do *E. faecalis*, assim como promoveu atividade bactericida residual frente ao *E. faecalis*, por um período de 72 horas, quando se comparou com os resultados obtidos com a pasta de hidróxido de cálcio.

4- Os resultados *in vitro* demonstraram diferenças percentuais quanto à viabilidade das células quando se comparou a utilização das duas pastas. Após a exposição das amostras por 7 e 14 dias à pasta de hidróxido de cálcio, ainda recuperou-se células viáveis em 14,35% e 4,8% das amostras, respectivamente. Porém não houve diferença estatística significativa entre os dois medicamentos quanto à ação antimicrobiana, ambos demonstraram eficácia sobre o *E. faecalis*.

REFERÊNCIAS

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

ALTMAN, D.G; HALL; CHAPMAN. **Practical Statistics for Medical Research**. London: Great Britain, 1991. p. 611.

BAKER, N.E.et al. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide, iodine potassium iodine, betadine, and betadine scrub with surfactant against *E. faecalis in vitro*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.98, p.359-364, 2004.

BARTHEL, C. R. et al. Leakage in roots coronally sealed with different temporary fillings. **J. Endod.** v. 25, n. 11, p. 731-734, Nov. 1999.

BASRANI, B. et al. Efficacy of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis in vitro*. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol. Endod.**, v. 96, p. 618-624, 2003.

BASRANI, B.; GHANEM, A.; TJÄDERHANE L. Physical and chemical properties of Chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. **J. Endod.**, v. 30, n. 6, p. 413-417, June 2004.

BIFFI, J. C. G.; RODRIGUES, H. H. Ultrasound in endodontics: a quantitative and histological assessment: using human teeth. **Endod. Dent. Traumatol**, v. 5, p. 55-62, 1989.

BOOTH, I. R. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. **Microbiol. Rev.**, p. 359-378, Dec. 1985.

BUCK, R.A. et al. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide.**J. Endod.**, v. 27, n.5, p. 325-327, May. 2001.

BYSTRÖM, A.; CLAEISSON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endod. Dent. Traumatol**, v.1, p.170-175, 1985.

CHÁVEZ DE PAZ, L. E. et al. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontics treatment. **Int. Endod. J.**, v. 36, p. 500-508, 2003.

CHEUNG, G.S.P; HO, M.W.M. Microbial flora of root canal treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. **Oral Microbiol.Immunol.**v.16, p.332-337,2001.

DAHLÉN, G. et al. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 15, p.309-312, 2000.

DAMETTO, F.R. et al. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol. Endod.**, v.99, n.6, p.768-772.2005

d'AZEVEDO, P.A. et al. Evaluation of an automated system for the identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.40, p. 157-161, 2001.

DELGADO, E. M. S **Estudo da compatibilidade biológica de uma pasta à base de hidróxido de cálcio associada ao gluconato de clorexidina a 2%,no tecido conjuntivo de pata de ratos.** 2002. 118f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

DE ROSSI, A. et al. Effect of rotary or manual instrumentation with or without calcium hydroxide and 1% chlorhexidine intracanal dressing on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol. Endod.**, v. 99, n. 5, p. 628-636, May. 2005.

DUNAVANT, T.R. et al. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. **J. Endod.**, v. 32, n.6, p. 527-530, 2006.

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

_____. Control of microorganisms *in vitro* by calcium hydroxyde paste. **Int. Endod. J.**, v. 34, p. 341-345, 2001.

ESTRELA, C.; HOLLAND, R. Hidróxido de cálcio. In: **Ciência Endodôntica**. São Paulo: Artes Médicas, 2004, v.2. p. 457-538

ESTRELA, C.; PIMENTA, F.C.; ESTRELA, C.R.A. Testes microbiológicos aplicados à pesquisa odontológica. In: ESTRELA, C. **Metodologia científica**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p.195-221.

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

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

FABRICIUS, L. et al. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied time of closure. **Scand. J. Dental Res.**, v.90, p.134-144, Apr. 1982.

FIGDOR, D.; DAVIES, J.K; SUNDQVIST, G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus* in human serum. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 18, p.234-239, 2003.

FERRARI, P. H. P.; CAI, S.; BOMBANA, A. C. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. **Int. Endod. J.**, v. 33, p. 372-380, 2005.

FERRAZ, C.C.R. et al. In vitro assessment of antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **Journal of Endodontics**, v.27, n.7, p.452-455, July 2001.

FLAHAUT, S. et al. Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*: adaptation, cross-protection, and chances in protein synthesis. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 63, n. 2, p. 812-814, Feb. 1997.

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

GIARD, J. C. et al. Glucose starvation response in *Enterococcus faecalis* JH2-2: survival and protein analysis. **Res. Microbiol.**, v. 148, p. 27-35, 1997.

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.**, v. 36, n. 4, p. 267-275, Apr. 2003.

_____. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, p. 71-76, 2004.

GOMES, B.P.F.A; LILLEY, J.D; DRUCKER, D.B. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. **Int. Endod. J.**, v. 29, p. 235-241, 1996.

HAAPASALO, M.; ØRSTAVIK, D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. **J. Dent. Res.**, v. 66, n.8 p. 1375-9, Aug. 1987.

HANCOCK, H.H. et al. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol Endod.** v.91,p.579-86,2001.

HEMS, R.S. et al. An *in vitro* evaluation of ability of ozone to kill a strain of *E. faecalis*. **Int. Endod. J.**, v.38, p.22-29, 2005.

HOLLAND, R. et al. A comparasion of one versus two appointment endodontic therapy in dog's with apical periodontits. **J. Endod.**, v. 29,n.2 p. 121-124, Feb, 2003.

HUBBLE, T. S. et al. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, ace, on adhesion to dentin. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 18, p. 121-126, 2003.

IWEN, P. C. et al. Evaluation of the revised MicroScan dried overnight gram-positive identification panel to identify *Enterococcus* Species. **J. Clin. Microbiol.**, p. 3756–3758, Nov. 1999.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FITZGERLD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in *germ-free* and conventional laboratory rats. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol.**, v. 20,n.3 p. 340-349, 1965.

KAUFMAN, B. et al. *Enterococcus ssp* in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. **J. Endod.**, v. 31, n.12, p.851-856, Dec.2005

KAYAOGU, G.; ERTEN, H.; ØRSTAVIK, D. Growth at high pH increases *Enterococcus faecalis* adhesion to collagen. **Int. Endod. J.**, v. 38, p. 389- 396, 2005.

KOMOROWSKI, R. et al. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. **J. Endod.**,v.26,n.6,p.315-317,2000.

LANA, M. A. et al. Microorganisms isolated from root canal presenting necrotic pulp and their susceptibility in vitro. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 16, p. 100-105, 2001.

LE GOFF, A. et al. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 12, p. 318-322, 1997.

LENET, B. J. et al. Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine Delivery Vehicles. **J. Endod.**, v. 26, n. 11, p.652-655 , Nov. 2000.

LEONARDO, M. R. et al. *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigation solution. **J. Endod.**, v. 25, n. 3, p. 167-171, Mar. 1999.

LEONARDO, M. R.; SILVA, L. A. B. "Curativo de demora" Medicação tópica entre sessões. In: LEONARDO, M. R. **Endodontia: tratamento de canais radiculares**. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas Ltda., cap. 23, 2005. p. 977-1048.

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

LIN, Y. H.; MICKEL, A. K.; CHOGLE, S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis* part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. **J. Endod.**, v. 29, n. 9, p. 565-566, Sep. 2003.

LIN, S. et al. Antibacterial efficacy of a new chlorhexidine slow release device to disinfect dentinal tubules. **J. Endod.**, v.29, n.6, p.416-418, June 2003.

_____. Effect of electrophoretically activated calcium hydroxide on bacterial viability in dentinal tubules-*in vitro*. **Dent.Taumatol.**, v.21, p.42-45, 2005.

LOVE, R. M. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. **Int. Endod. J.**, v.34, p. 399-405, 2001.

MCHUGH, C. P. et al. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in Vitro. **J. Endod.**, v. 30, p. 4, p. 218-219, Apr. 2004.

MILLER, W. D. An Introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. **Dent. Cosmos.** v. 36, n. 7, p. 505-528, 1894.

MOLANDER, A. et al. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, v. 31, n. 3, p. 1-7, Mar. 1998.

MOLANDER, A.; DAHLÉN, G. Evaluation of the antibacterial potencial of tetracycline or erytromycin mixed with calcium hydroxide as intracanal dressing against *Enterococcus faecalis in vitro*. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol Endod.** v. 96, p.744-750, 2003.

MÖLLER, A. J. R. et al. Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains. **Eur. J. Oral. Sci.** v.112, p.207-215, 2004.

NAGESHWAR, R. R.; KIDIYOOR, H. K.; HEDGE, C. Efficacy of calcium hydroxide – chlorhexidine paste against *Enterococcus faecalis* – An *in vitro* study. **Endodontology**, v. 16, p. 61-64, 2004.

NAIR, P.N.R. On the cause of persistent apical periodontitis; a review. **Int. Endod. J.**, v. 39, p. 249-281, 2006.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE – N.N.I.S. – 1997 Report, data Summary from October 1986 – April 1997, Issued May 1997 – **Am J. Infect Control**, v. 25, p. 477-87, 1997.

PAISANO, A. F. et al. *In vitro* antimicrobial effect of bacteriophages on human dentin infected with *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. **Oral Microbiol Immunol.** v. 19, p.327-330, 2004.

PAZELLI, L. C. **Prevalência de microrganismos em canais radiculares de dentes decíduos humanos com necrose pulpar e lesão periapical crônica. Efeito do curativo de demora com pasta à base de hidróxido de cálcio associado ao PMCC ou à clorexidina.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2002.

PECIULIENE, V. et al. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously, root filled canals in a Lithuanian population. **J. Endod.** v. 26, n. 10, p. 593-595, Oct. 2000.

_____. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root – filled teeth with chronic apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, v. 34, p. 429-434, 2001.

PETERS, L. B. et al. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. **J. Endod.**, v. 27, n. 2, p.76-81, Feb. 2001.

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

PODBIELSKI, A.; SPAHR, A.; HALLER, B. Additive antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on common endodontic bacterial pathogens. **J. Endod.**, v. 29, n. 5, p. 340-345, May 2003.

PORTENIER, I. et al. Inactivation of root canal medicaments by dentine,hydroxyapatite and bovine serum albumin. **Int. Endod. J.**, v. 34, p. 184-188, 2001.

_____. The susceptibility of starved, stationary phase and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontics medicaments. **J. Endod.**, v. 31, n. 5, p. 380-386, May. 2005.

_____. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in presence or absence of dentine powder or BSA. **J. Endod.**, v.32, n.2, Feb. 2006.

REIT, C. Decision strategies in endodontics on the design of a recall program: **Endod. Dent. Traumatol.**, v. 3, p. 233-239, 1987.

RINCÉ, A. et al. Physiological and molecular aspects of bile salt response in *Enterococcus faecalis*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 88, p. 207-213, 2003.

RÔÇAS, I.N. et al. Polymerase Chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a south Korean population . **J. Endod.**, v. 30, n.7 p.504-508, July, 2004.

RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA Jr., J. F.; SANTOS, K. R. N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J. Endod.**, v. 30, n. 5, p. 315-320. May 2004.

ROLPH, H.J. et al. Molecular identification of microorganisms from endodontic infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.3282-3289, 2001.

ROSENTHAL, S; SPANGBERG, L; SAFAVI, K. Chlorhexidine substantivity in root canal detin. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol Endod.** v. 98, p.488-492, 2004.

SAFAVI, K. E.; NICHOLS, F.C. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. **J. Endod.**, v. 19, n.2. p.76-78, Feb. 1993.

SEDGLEY, C. M.; GWENDOLYN, B.; APPELBE, O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in Endodontic patients using culture and PCR. **J. Endod.**, v. 32, n. 2, p.104-109, Feb. 2006.

SEDGLEY, C. M.; LENNAN, S. L.; APPELBE, O. K. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals *ex vivo* . **Int. Endod. J.**, v.38, p. 735-742, 2005.

SEDGLEY, C. M. et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* ssp. **Oral Microbiol. Immun.**, v. 20, p. 10-19, 2005.

_____. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. **J. Endod.**, v. 32, n. 3, p 173-177, Mar. 2006.

SIQUEIRA JR., J. F. et al. *Actinomyces species*, *Streptococcus* and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. **J. Endod.**, v. 28, n. 3, p. 168-172, Mar. 2002.

SIQUEIRA Jr., J.F.; LOPES, H.P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxyde:a critical review. **Int. Endod. J.**, v.32, p.361-369.1999.

SIQUEIRA Jr., J. F.; RÔÇAS, I. N. Polymerase chain reaction – based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg., Oral Méd., Oral Pathol., Oral Radiol. Endod.**, v. 97, p. 85-94, 2004.

SIQUEIRA Jr., J.F.; RÔÇAS, I.N.; LOPES, H.P. Microbiologia endodôntica. In: LOPES, H. P.; SIQUEIRA Jr., J. F. **Endodontia: biologia e técnica**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2004a. p. 223-280.

_____. Patologia pulpar e perirradicular. In: LOPES, H. P.; SIQUEIRA Jr., J. F. **Endodontia: biologia e técnica**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2004b. p. 17-77.

_____. Tratamento de dentes despolpados (Necropulpectomia). In: LOPES, H. P.; SIQUEIRA Jr., J. F. **Endodontia: biologia e técnica**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2004c, p.289-306

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

SIRÉN, E. K. et al. *In vitro* antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 112, p. 326-331, 2004.

SJÖGREN, V. et al. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. **Int. Endod. J.**, v. 24, p. 119-125, 1991.

SUNDQVIST, G. Association between microbial species in dental root canal infection. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 7, n. 5, p. 257-262, Oct. 1992.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol. Endod.**, v. 85, n. 1, p. 86-93, Jan. 1998.

TANOMARU FILHO, M. et al. Inflammatory response to different endodontic irrigation solutions. **Int. Endod. J.**, v. 35, p. 735-739, 2002.

TEIXEIRA, L.M.; FACKLAM, R. R. *Enterococcus*. In: MURRAY, P. R. et al. (Eds). **Manual of clinical microbiology**, 8th ed. Washington, DC: ASM Press. 2003. p. 422-433.

TRONSTAD, L. et al. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. **J. Endod.**, v. 7, n. 1, p. 17-21, Jan. 1981.

WALTON, R. E.; TORABINEJAD, M. **Microbiologia endodôntica. Princípios e prática em endodontia**. São Paulo: Editora Santos, 1997. p. 277-289.

WHITE, R. R; HAYS, G. L.; JANER, L. R. Residual Antimicrobial Activity after canal irrigation with Chlorhexidine. **J. Endod.**, v. 23, n. 4, p. 229-230, Apr. 1997.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. New Jersey-USA: Prentice Hall, 1999. p.929.