

Ação antibacteriana de diferentes medicações intracanaais frente a *Enterococcus faecalis*

ANA RITA MARQUES DA SILVA



DOUTORAMENTO EM MEDICINA DENTÁRIA

PORTO | 2013

*Aos meus Pais e
aos meus Irmãos.*



*"Morre lentamente quem passa os dias queixando-se
da má sorte ou da chuva incessante,
Desistindo de um projeto antes de iniciá-lo, não perguntando
sobre um assunto que desconhece e não respondendo
quando lhe indagam o que sabe."*

Pablo Neruda

"The only source of knowledge is experience."

Einstein

Tese submetida à Faculdade de Medicina Dentária
da Universidade do Porto para candidatura à obtenção
do grau de Doutor em Medicina Dentária

Este trabalho foi realizado sob o regime de cotutela Internacional:

FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO | PORTUGAL

ORIENTADOR | Prof. Doutor Manuel Fontes de Carvalho

COORIENTADORA | Prof.^a Doutora Irene Pina-Vaz

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA | BRASIL

ORIENTADOR | Prof. Doutor João Carlos Gomes

**DOCENTES DA FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA DA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

CONSELHO CIENTÍFICO

Prof. Doutor Afonso Manuel Pinhão Ferreira
Prof. Doutor Américo dos Santos Afonso
Prof. Doutor António Cabral Campos Felino
Prof. Doutor César Fernando Coelho Leal Silva
Prof. Doutor Germano Neves Pinto Rocha
Prof.^a Doutora Inês Alexandra Costa Moraes Caldas
Prof.^a Doutora Irene Graça Azevedo Pina Vaz
Prof. Doutor João Carlos Antunes Sampaio Fernandes
Prof. Doutor João Carlos Gonçalves Ferreira de Pinho
Prof. Doutor João Fernando Costa Carvalho
Prof. Doutor Jorge Manuel Carvalho Dias Lopes
Prof. Doutor José António Macedo Carvalho Capelas
Prof. Doutor José Carlos Reis Campos
Prof. Doutor José Mário Castro Rocha
Prof. Doutor Manuel José Fontes de Carvalho
Prof.^a Doutora Maria Cristina P. C. M. Figueiredo Pollmann
Prof.^a Doutora Maria Helena Guimarães Figueiral da Silva
Prof.^a Doutora Maria Helena Raposo Fernandes
Prof.^a Doutora Maria Lurdes Ferreira Lobo Pereira
Prof. Doutor Mário Augusto Pires Vaz
Prof. Doutor Mário Jorge Rebolho Fernandes Silva
Prof. Doutor Mário Ramalho Vasconcelos
Prof. Doutor Miguel Fernando Silva Gonçalves Pinto
Prof. Doutor Paulo Rui Galvão Ribeiro Melo
Prof. Doutor Ricardo Manuel Lobo Faria Almeida

DOCENTES JUBILADOS

Prof. Doutor Adão Fernando Pereira
Prof. Doutor Amílcar Almeida Oliveira
Prof. Doutor António Manuel Machado Capelas †
Dr. António Ulisses Matos dos Santos
Prof. Doutor Durval Manuel Belo Moreira
Prof. Doutor Francisco António Rebelo Moraes Caldas
Dr. José Maria Vaz Osório
Prof. Doutor José Serra Silva Campos Neves
Prof. Doutor Manuel Desport Marques †
Prof. Doutor Manuel Guedes de Figueiredo

DOCENTES APOSENTADOS

Prof. Doutor António Manuel Guerra Capelas
Prof. Doutor Artur Manuel Osório de Araújo
Prof. Doutor Fernando Jorge Moraes Branco
Prof. Doutor Fernando José Brandão Martins Peres †
Prof. Doutor José Albertino Cruz Lordelo
Prof. Doutor José Carlos Pina Almeida Rebelo
Prof. Doutor Manuel Pedro da Fonseca Paulo
Prof.^a Doutora Maria Adelaide Macedo Carvalho Capelas †
Prof.^a Doutora Maria Purificação Valenzuela Sampaio Tavares
Prof. Doutor Rogério Serapião Martins Aguiar Branco



ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE TABELAS.....	XVII
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	XVIII
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	XIX
AGRADECIMENTOS.....	XXI
TRABALHOS E PUBLICAÇÕES.....	XXV
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	11
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 GERAL.....	21
3.2 ESPECÍFICO.....	21
4. METODOLOGIA DO TRABALHO EXPERIMENTAL.....	23
4.1 DELINEAMENTO DO TRABALHO EXPERIMENTAL E SELEÇÃO DOS DENTES.....	23
4.2 ESTIRPE DOS MICRORGANISMOS.....	28
4.3 PREPARAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS AUXILIARES A SEREM UTILIZADAS.....	28
4.3.1 MEDICAÇÕES INTRACANAL.....	29
4.3.2 SOLUÇÕES DE IRRIGAÇÃO.....	32
4.3.3 SOLUÇÕES NEUTRALIZANTES.....	34
4.4 PRIMEIRA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL.....	36
4.4.1 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO ATRAVÉS DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM AGAR.....	36
4.4.2 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO ATRAVÉS DO MÉTODO CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	40
4.5 SEGUNDA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL.....	42
4.5.1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DIFUSÃO DA MEDICAÇÃO INTRACANAL ATRAVÉS DOS TÚBULOS DENTINÁRIOS.....	42
4.6 TERCEIRA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL.....	52

4.6.1 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO EM DENTINA INFETADA.....	52
4.7 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS.....	61
5. RESULTADOS.....	63
5.1 PRIMEIRA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL.....	63
AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO ATRAVÉS DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM AGAR.....	63
AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO ATRAVÉS DO MÉTODO DO CIM.....	67
5.2 SEGUNDA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL.....	72
AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DIFUSÃO DA MEDICAÇÃO INTRACANALAR ATRAVÉS DOS TÚBULOS DENTINÁRIOS.....	72
5.3 TERCEIRA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL.....	74
AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO EM DENTINA INFETADA	74
6. DISCUSSÃO.....	79
6.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	79
6.2 PRIMEIRA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL.....	82
6.3 SEGUNDA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL.....	86
6.4 TERCEIRA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL.....	87
7. CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS.....	93
ANEXOS.....	109

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - CRONOGRAMA DA PRIMEIRA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL.	25
FIGURA 2 - CRONOGRAMA DA SEGUNDA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL.	26
FIGURA 3 - CRONOGRAMA DA TERCEIRA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL.	27
FIGURA 4 - (A) BALANÇA E (B) AGITADOR MECÂNICO ELETRÔNICO MINI Q235.	28
FIGURA 5 - GEL BASE DE HIDROXIETILCELULOSE A 2% (NATROSOL®).....	29
FIGURA 6 - PREPARAÇÃO DAS DIFERENTES MEDICAÇÕES INTRACANAL: (A) MATERIAL UTILIZADO, (B) CLORIDRATO DE DOXICICLINA (FC 1,11G), (C) PROPILENOGLICOL, (D) DISSOLUÇÃO DO CLORIDRATO DE DOXICICLINA, 0,1% DE METABISSULFITO DE SÓDIO, PROPILENO E TWEEN 80, (E) Na_2HPO_4 , (F) NaH_2PO_4 , (G) GEL BASE NATROSOL 2%, (H) JUNÇÃO DAS DUAS PREPARAÇÕES, (I,J) HOMOGENEIZAÇÃO COM VARETA E AGITADOR MECÂNICO, (K,L) PRODUTO FINAL DA MANIPULAÇÃO DO GEL DX, (M) CHX, (N) PC, (O) NIT, (P) DX.	32
FIGURA 7 - (A) PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE EDTA A 17% COM EDTA Na_2 , NaOH 20% E ÁGUA DESTILADA. (B) FILTRAÇÃO DA SOLUÇÃO PARA GARRAFA DE PLÁSTICO APÓS DISSOLUÇÃO.	33

FIGURA 8 - PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE NACLO A 5,25% A PARTIR DA JUNÇÃO DE ÁGUA DESTILADA E NACLO COMERCIAL.	34
FIGURA 9 - PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO NEUTRALIZANTE COM A JUNÇÃO DE LECITINA DE SOJA E DE TWEEN 80 NUM BALÃO VOLUMÉTRICO.	35
FIGURA 10 - INOCULAÇÃO DAS PLACAS DE AGAR COM <i>E. FAECALIS</i> : (A,B) PREPARAÇÃO DE SUSPENSÕES DE $1,5 \times 10^8$ CÉLULAS/ML DE <i>E. FAECALIS</i> , (C) AGITADOR DE TUBOS VORTEX, (D) CONFIRMAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO NO ESPECTOFOTÓMETRO, (E) INOCULAÇÃO DA BACTÉRIA <i>E. FAECALIS</i> , (F) INCUBAÇÃO DAS PLACAS INOCULADAS.....	37
FIGURA 11 - PREPARAÇÃO DAS PLACAS DE AGAR PARA O MÉTODO DE DIFUSÃO: (A) MATERIAL UTILIZADO DURANTE O PROCEDIMENTO, (B) CONFEÇÃO DE POÇOS NAS PLACAS DE MH COM O AUXÍLIO DOS TUBOS DE VIDRO ESTERILIZADOS, (C) APLICAÇÃO DAS DIFERENTES MEDICAÇÕES NOS RESPECTIVOS POÇOS, (D) PLACA DE AGAR DE MH COM AS VÁRIAS MEDICAÇÕES.	38
FIGURA 12 - MEDIÇÃO DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>E. FAECALIS</i> QUANDO EM CONTATO COM OS DIFERENTES TIPOS DE MEDICAÇÕES MANIPULADAS.	39
FIGURA 13 - MEDIÇÃO DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE CADA MICRORGANISMO PARA OS DIFERENTES TIPOS DE MEDICAÇÕES MANIPULADAS.	40
FIGURA 14 - MÉTODO DA CIM: (A,B) ATRAVÉS DA DILUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA MEDICAÇÃO COM CALDO DE MH E SUSPENSÃO DE BACTÉRIA.	41
FIGURA 15 - DISTÂNCIA FOCO-FILME (30 CM).	43
FIGURA 16 - PROCEDIMENTO RADIOLÓGICO: (A,B) POSICIONAMENTO DOS ESPÉCIMES DENTÁRIOS NAS PELÍCULAS RADIOGRÁFICAS; (C) PROCESSADORA AUTOMÁTICA DAS PELÍCULAS RADIOGRÁFICAS.....	43
FIGURA 17 - INCIDÊNCIAS RADIOGRÁFICAS DOS CANINOS: (A) VESTIBULO-LINGUAL E (B) MESIO-DISTAL.	44
FIGURA 18 - PROCEDIMENTO DE CORTE DOS ESPÉCIMES DENTÁRIOS: (A) MÁQUINA DE CORTE COM DISCO DIAMANTADO; (B) MEDIÇÃO DOS ESPÉCIMES DENTÁRIOS; (C) CORTE DOS ESPÉCIMES; (D) ASPETO FINAL DOS ESPÉCIMES DENTÁRIOS.	45

FIGURA 19 - ESTANDARDIZAÇÃO DA CAVIDADE DE ACESSO: (A) UNIFORMIZAÇÃO DA CAVIDADE COM TURBINA E BROCA ENDO Z; (B) PREPARAÇÃO CERVICAL COM BROCAS GATES Nº 2 E 3.	46
FIGURA 20 - ESPÉCIME DENTÁRIO COM INSTRUMENTO ANATÓMICO (IA) K #25.	47
FIGURA 21 - SEQUÊNCIA DE LIMAS E BROCAS USADAS NA PREPARAÇÃO QUÍMICO MECÂNICA DOS ESPÉCIMES DENTÁRIOS.	48
FIGURA 22 - ESQUEMA DA IRRIGAÇÃO DOS ESPÉCIMES DURANTE A PREPARAÇÃO QUÍMICO MECÂNICA COM A TÉCNICA HÍBRIDA.....	49
FIGURA 23 - ESTERILIZAÇÃO DOS ESPÉCIMES DENTÁRIOS: (A,B) TUBOS DE ENSAIO COM CALDO DE BHI.	50
FIGURA 24 - DETERMINAÇÃO DAS ZONAS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICROBIANO DE CADA MICRORGANISMO, QUANDO EM CONTATO COM OS DIFERENTES TIPOS DE MEDICAÇÕES INTRACANAL..	51
FIGURA 25 - CONTAMINAÇÃO DOS ESPÉCIMES DENTÁRIOS: (A) MATERIAL UTILIZADO DURANTE O PROCEDIMENTO; (B) RECOLHA DA SUSPENSÃO DE <i>E. FAECALIS</i> ; (C) INOCULAÇÃO DA SUSPENSÃO DE <i>E. FAECALIS</i> , NOS TUBOS DE ENSAIO COM OS ESPÉCIMES ESTERILIZADOS.	53
FIGURA 26 - PROTOCOLO PARA EVITAR SATURAÇÃO DO MEIO: (A) SUBSTITUIÇÃO DE CALDO CONTAMINADO (B,C) POR CALDO FRESCO DE BHI.	54
FIGURA 27 - PROTOCOLO DA PRIMEIRA COLHEITA APÓS 21 DIAS DE CONTAMINAÇÃO: (A) COLOCAÇÃO DOS ESPÉCIMES DENTÁRIOS NA PLATAFORMA DE AÇO INOXIDÁVEL ESTÉRIL; (B) IRRIGAÇÃO COM SF; (C) CALIBRAÇÃO DO CONE DE PAPEL; (D) CONE DE PAPEL INTRODUIDO AO LONGO DO CT COM MOVIMENTOS CIRCULARES CONTRA AS PAREDES DO CANAL; (E) COLOCAÇÃO DA AMOSTRA BACTERIANA NUM EPPENDORF ESTÉRIL COM SOLUÇÃO SALINA.	55
FIGURA 28 - (A) SEMEITEIRA DAS DILUIÇÕES EM PLACAS DE AGAR BHI, (B) ESPALHAMENTO COM ALÇAS DE DRIGALSKI.	56
FIGURA 29 - APLICAÇÃO DAS DIFERENTES MEDICAÇÕES INTRACANAL.	57
FIGURA 30 - PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES DENTÁRIOS PARA A INCUBAÇÃO APÓS S1: PLACAS DE 24 POÇOS COM OS ESPÉCIMES FIXADOS E SELADOS; POÇOS PREENCHIDOS COM CALDO BHI.	58
FIGURA 31 - (A) IRRIGAÇÃO DOS ESPÉCIMES DENTÁRIOS COM SF E (B) COM SOLUÇÃO NEUTRALIZANTE.	59

FIGURA 32 - COLOCAÇÃO DE CALDO DE BHI NO INTERIOR DOS CANAIS.	60
FIGURA 33 - HALOS (MM) DE INIBIÇÃO FORMADA PELAS MEDICAÇÕES INTRACANAL TESTADAS (1, CHX; 2, PC; 3, NIT; 4, DX; E 5, GEL DE NATROSOL) FACE ÀS BACTÉRIAS (A) <i>E. COLI</i> , (B) <i>S. AUREUS</i> , (C) <i>E. FAECALIS</i> , (D) <i>P. AERUGINOSA</i> E AO FUNGO (E) <i>C. ALBICANS</i>	66
FIGURA 34 – PLACAS DE MICRODILUIÇÕES DE 96 POÇOS COM AS DILUIÇÕES DAS MEDICAÇÕES INTRACANAL TESTADAS (CHX, PC, NIT, DX) CONTRA AS BACTÉRIAS (A) <i>E. COLI</i> , (B) <i>S. AUREUS</i> , (C) <i>E. FAECALIS</i> , (D) <i>P. AERUGINOSA</i> E O FUNGO (E) <i>C. ALBICANS</i>	70
FIGURAS 35 – HALOS (MM) DE INIBIÇÃO FORMADOS PELAS MEDICAÇÕES INTRACANAL TESTADAS ATRAVÉS DOS CANALÍCULOS DENTINÁRIOS FACE À <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> : (A) 1 – CHX; 2 – SM E 5 – DX; (B) 3 – PC E 4 – NIT.	73
FIGURA 36 - ANÁLISE DAS UFC'S DE UM DENTE DO GRUPO DO GEL DX: (A) UFC DE S1, APÓS 21 DIAS DE CONTAMINAÇÃO DOS ESPÉCIMES DENTÁRIOS COM <i>E. FAECALIS</i> . (B) UFC DE S2, APÓS 14 DIAS COM A MEDICAÇÃO INTRACANALAR. (C) UFC DE S3 APÓS 7 DIAS COM MEIO BHI NO INTERIOR DOS CANAIS.	76

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - AGENTES NEUTRALIZANTES DE ACORDO COM O TIPO DE COMPOSTO.	35
TABELA 2 - DIVISÃO DOS ESPÉCIMES PELOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS.	46
TABELA 3 - DIVISÃO DOS DENTES PELOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS.	52
TABELA 4 - MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DOS DIÂMETROS DOS HALOS (MM) DE INIBIÇÃO FORMADOS PELAS MEDICAÇÕES INTRACANAL TESTADAS CONTRA AS BACTÉRIAS DE GRAM POSITIVO, GRAM NEGATIVO E A UM FUNGO.	67
TABELA 5 - MÉDIAS E DESVIO-PADRÃO DAS UFC DOS DIFERENTES GRUPOS EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	77

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - GRÁFICO DE BARRAS DA CIM DE CADA SOLUÇÃO COM AÇÃO ANTIMICROBIANA FACE À <i>E. COLI</i> (E.C.), <i>S. AUREUS</i> (S.A.), <i>E. FAECALIS</i> (E.F.), <i>P. AERUGINOSA</i> (P. A.) E O FUNGO <i>C. ALBICANS</i> (C.A.).....	71
GRÁFICO 2 - BOX-PLOT DOS VALORES DOS HALOS DAS DIFERENTES MEDICAÇÕES ATRAVÉS DOS DENTES APÓS 24H. TESTE KRUSKAL-WALLIS ($X^2=47.126$; $P<.001$).*	74
GRÁFICO 3 - QUANTIFICAÇÃO DAS UFC'S NOS GRUPOS/MEDICAÇÕES EM FUNÇÃO DO TEMPO: (S1) 1º MOMENTO – APÓS 21 DIAS DE CONTAMINAÇÃO, (S2) 2ºMOMENTO – APÓS 14 DIAS COM MEDICAÇÃO INTRACANALAR, (S3) 3º MOMENTO – APÓS 7 DIAS COM CALDO DE BHI. ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS NA ANÁLISE SO TEMPO E INTERAÇÃO TEMPO E GRUPO/MEDICAÇÃO.	78

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C	Graus <i>Celsius</i>
μL	Microlitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
atm	Atmosfera(s)
BDH	Banco de Dentes Humanos
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C. a.	<i>Candida albicans</i>
CHX	Gel de clorhexidina a 2%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
COEP	Comissão de Ética em Pesquisa
CT	Comprimento de Trabalho
DX	Gel de doxiciclina a 3%

E c.	<i>Escherichia coli</i>
E.f.	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EDTA Na₂	<i>Ethylenedinitrilo Tetraacetic Acid Disodium Salt</i>
et al.	e outros
EUA	Estados Unidos da América
Fc	Fator de correção
g	Grama(s)
h	Hora(s)
IA	Instrumento Anatômico
IL	Illinois
LPS	Lipopolissacarídeo
MH	<i>Muller Hinton</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
MTAD	Mistura de Tetraciclina (doxiciclina), Ácido cítrico e um Detergente (Tween 80)
n	Número de amostras
nº	Número
Na₂HPO₄	Fosfato de disódico anidro
NaClO	Hipoclorito de sódio
NaH₂PO₄	Fosfato de sódio monobásico anidro
NaOH	Hidróxido de sódio
NCCSL	<i>National Comittee for Clinical Laboratory Standards</i>
NIT	Gel de nitrofurantoína a 3%
p	Nível de significância
P. a.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBSC	Suspensão de penicilina, bacitracina, estreptomicina e caprilato de sódio
PC	Gel placebo
rpm	Rotações por minuto
S. a.	<i>Staphylococcus aureus</i>
S1	Primeira colheita após 21 dias de contaminação dos espécimes dentários com <i>E. faecalis</i>
S2	Segunda colheita após 14 dias com medicação intracanal
S3	Terceira colheita após 7 dias com caldo de BHI no interior do canal
SM	Sem Medicação
SF	Soro Fisiológico
SPSS	<i>Statistical package for the social sciences</i>
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UFC	Unidades Formadoras de Colónias

AGRADECIMENTOS

Começo por agradecer à minha Família, em especial aos meus Pais e aos meus Irmãos, que me apoiaram e me incentivaram de uma forma incondicional, tornando possível a conclusão deste desafio.

Três anos de muito trabalho, esforço e dedicação. Ao longo deste período, foram inúmeras as vivências e as pessoas que se cruzaram no meu percurso e que, direta ou indiretamente, me ajudaram e estimularam, viabilizando a concretização deste projeto. Realço aqui os agradecimentos:

Ao Professor Doutor Manuel Fontes de Carvalho e à Professora Doutora Irene Pina-Vaz, orientador e coorientadora da minha tese em Portugal, por me terem sugerido e incentivado para este desafio; pela amizade, paciência, dedicação,

disponibilidade e pela partilha dos conhecimentos fundamentais para a minha formação científica.

Ao Professor Doutor João Carlos Gomes, orientador da minha tese no Brasil, por me ter recebido de braços abertos, por toda amizade, carinho, confiança e ajuda mesmo nos momentos mais difíceis; sem nunca esquecer a constante presença e apoio que acabaram por se transformar numa relação mais familiar.

À Professora Doutora Osnara Mongruel Gomes, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação Stricto-Sensu em Odontologia - UEPG, por todo o seu carinho, dedicação e preocupação pelos “filhos” estrangeiros.

À Professora Doutora Elizabete Brasil dos Santos, pela sua boa disposição e alegria contagiante, pela amizade, confiança (mesmo quando as coisas não corriam bem), pela sua fantástica dedicação e preciosa ajuda, nunca esquecendo a contribuição académica dada para que pudesse concretizar todos os meus trabalhos. Acho que nunca vou ter palavras suficientes para lhe agradecer tudo o que fez por mim!

Ao Professor Doutor Fábio André dos Santos e ao Professor Doutor Paulo Vitor Farago, por terem feito com que olhasse para a investigação com outros olhos. Por me terem ajudado a construir e a fazer com que a concretização deste projeto fosse possível. Foi um orgulho poder trabalhar com eles. Muito obrigada pela paciência, dedicação e amizade.

Ao Professor Carlos Roberto Berger pela sua disponibilidade, ajuda no projeto e por me ter dado a oportunidade de assistir às suas aulas de Endodontia, podendo desta forma enriquecer os meus conhecimentos.

Aos Professores do Curso de Mestrado em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Alessandro Loguercio, Alessandra Reis, Maiza Althaus e Denise Zanon, pelo apoio e pelo conhecimento adquirido em cada aula.

À Shelon Souza e à Janaina Diniz que, juntamente com a Professora Elizabete Brasil, me ensinaram e apoiaram em praticamente todo o trabalho no laboratório. Indescritível a simpatia, alegria, companheirismo e otimismo que reinava naquele laboratório, em grande parte graças à presença destas pessoas fantásticas. Posso dizer que fiz lá verdadeiras amigas! Muito obrigada por toda a ajuda, foram incansáveis.

À Bete do laboratório de Farmacologia, que me apoiou e ajudou sempre que precisei.

Ao Milano, pela sua simpatia, amizade e por não se ter importado de partilhar comigo o seu local de trabalho (sala de radiologia) durante alguns dias.

À minha família “Pires”, por todo o apoio, ajuda e companheirismo, por terem estado ao meu lado nas alturas em que mais precisei. Sabe bem quando nos apercebemos que é preciso bem mais que um oceano para destruir os laços de uma verdadeira amizade.

Aos meus colegas e amigos da turma do Mestrado e do Doutorado, por todo o carinho e amizade.

Ao Sr. Noel Pires e ao Léo pela amizade e pelo carinho com que me trataram.

Ao Daniel Herrera, pelas dicas e ajuda para a realização do projeto.

À Cláudia Figueiredo pela amizade, carinho, paciência e por me ter dado uma enorme ajuda na análise estatística do projeto.

Aos meus Amigos por continuarem a cruzar o meu caminho com sorrisos, abraços e, acima de tudo, amizade verdadeira.

Agradeço ainda a todas as pessoas que, de alguma forma, colaboraram com a realização deste trabalho.

TRABALHOS E PUBLICAÇÕES

Com base neste trabalho experimental, foram realizados os seguintes trabalhos e publicações:

1. Posters

- ***New intracanal formulations: antimicrobial effect on the external root surface:*** Silva, A.R.; Santos, E.B.; Santos, F.A.; Gomes, J.C.; Carvalho, M.F.. *91th General Session & Exhibition of the IADR, Seattle, Washinton, USA*, Março de 2013.
- ***New intracanal formulations containing doxycycline or chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*:*** Silva, A.R.; Santos, E.B.; Farago, P.V.; Gomes, J.C.;

Carvalho, M.F.. *16th Biennial Congress of the European Society of Endodontology*, Lisboa, Setembro de 2013.

2. Publicações

Artigos

- Silva, A.R.; Pinto, S.C.S.; Santos, E.B.; Santos, F.A.; Farago, P.V.; Gomes, J.C.; Pina-Vaz, I.; Carvalho, M.F.. ***A New intracanal formulations containing doxycycline or chlorhexidine against Enterococcus faecalis***. *The Journal of Contemporary Dental Practice* – January/ February issue in 2014.

- Silva, A.R.; Santos, E.B.; Pinto, S.C.S.; Gomes, J.C.; Pina-Vaz, I.; Carvalho, M.F.. ***Antimicrobial effect and ability to diffuse through dentin of new intracanal formulations with nitrofurantoin or doxycycline***.

Submetido na revista *Brazilian Dental Journal*.

Resumos

- A.R. Silva; Santos, E.B.; Santos, F.A.; Gomes, J.C.; Carvalho, M.F.. ***New intracanal formulations: antimicrobial effect on the external root surface***. *91th General Session & Exhibition of the IADR. Abstract book*, página 115:S0946, Seattle, Washinton, USA, Março de 2013.

- Silva, A.R.; Santos, E.B.; Farago, P.V.; Gomes, J.C.; Carvalho, M.F.. ***New intracanal formulations containing doxycycline or chlorhexidine against Enterococcus faecalis***. *16th Biennial Congress of the European Society of Endodontology. Abstract book*, página 12: R32, Lisboa, Setembro de 2013.

- Silva, A.R.; Santos, E.B.; Farago, P.V.; Gomes, J.C.; Carvalho, M.F.. ***New intracanal formulations containing doxycycline or chlorhexidine against Enterococcus faecalis*** *Int. End J*, 2013; 46 (Suppl.100): 1-75.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar novas formulações de medicações intracanal e verificar a ação antimicrobiana destas em microrganismos frequentemente implicados em casos de insucesso endodôntico. As formulações estudadas continham doxiciclina a 3% (DX) ou nitrofurantoína a 3% (NIT), tendo sido usado como controlo positivo um gel de clorhexidina a 2% (CHX).

O estudo foi dividido em três fases experimentais.

Na primeira fase, foi analisado o efeito antimicrobiano das formulações DX e NIT, na presença das bactérias de Gram positivo, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, das bactérias de Gram negativo, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e do fungo *Candida albicans* através de testes de difusão em agar e da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Com base na análise

descritiva dos resultados da difusão em agar, a DX foi a que apresentou maior efeito antimicrobiano, na generalidade das bactérias estudadas. Os resultados da NIT foram inferiores aos da CHX em todas as bactérias do estudo, à exceção de *E. coli*. Tanto a DX como a NIT evidenciaram-se inativas para *C. albicans*. A análise descritiva da determinação da CIM revelou que a DX apresentou maior eficácia comparativamente com a NIT, mas resultados inferiores quando comparada com a CHX.

Na segunda fase, as novas formulações foram avaliadas pela sua ação antimicrobiana, na superfície externa radicular, contra *E. faecalis* e eventual capacidade de difusão através dos canalículos dentinários. Foram usados 50 dentes humanos (caninos), previamente instrumentados e esterilizados, distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n=10), e atribuída uma formulação diferente a cada grupo: sem medicação (**SM**), controlo negativo; gel de clorhexidina a 2% (**CHX**), controlo positivo; gel placebo (**PC**); gel de nitrofurantoína a 3% (**NIT**); e gel de doxiciclina a 3% (**DX**). Preencheu-se o interior dos canais com as respetivas formulações e fez-se a incubação dos dentes em placas de agar com *E. faecalis*. A análise dos halos dos grupos em estudo demonstrou que a DX tem maior atividade na face externa da raiz do que a CHX, e que a NIT e o PC não evidenciaram ação antibacteriana no exterior da raiz.

Na terceira e última fase, avaliou-se a ação antimicrobiana, em canais radiculares contaminados com *E. faecalis*. A formulação usada nesta fase foi a DX, uma vez que foi a que obteve melhores resultados nas duas fases anteriores. Efetuaram-se colheitas bacterianas em três períodos de tempo distintos. A primeira colheita (**S1**) realizou-se 21 dias depois da contaminação com *E. faecalis*; a segunda colheita (**S2**) foi efetuada 14 dias após a aplicação das formulações e a terceira colheita (**S3**), 7 dias depois da substituição das formulações por caldo de BHI (“*Brain Heart Infusion*”). A contagem das Unidades Formadoras de Colónias (UFC/mL) foi analisada através do teste de medidas repetidas (ANOVA) ($p < 0,05$). Todas as novas formulações diminuíram significativamente o número de células bacterianas no interior dos canais após os 14 dias (S2) sob a ação da medicação intracanal. Depois do período de 7 dias com o caldo de BHI (S3), os valores de UFC de *E. faecalis*

mantiveram-se em valores baixos nos grupos DX e CHX. No grupo SM verificou-se um aumento significativo para valores similares aos da contaminação inicial. Verificou-se, assim, que a DX foi eficaz na desinfecção dos canais, reduzindo significativamente o número de microrganismos após 14 dias e demonstrando alguma substantividade após 7 dias.

Conclusão: Das duas formulações sugeridas neste estudo, o gel DX apresentou uma eficácia maior sobre os microrganismos estudados (difusão em agar e CIM), corroborado pela ação na superfície externa da raiz e no interior dos canais radiculares. Na formulação apresentada, o gel DX pode ser considerado como uma medicação intracanal alternativa, nomeadamente nos casos de insucesso endodôntico.

Palavras-chaves

Enterococcus faecalis, Endodontia, Doxíciclina, Nitrofurantóina, Clorohexidina

ABSTRACT

The present study aimed to introduce new intracanal medications and evaluate their antimicrobial effect against endodontic microorganisms involved in most of the cases of endodontic failure. The composition of the new formulations included 3% doxycycline hydrochloride (DX) or 3% nitrofurantoin (NIT), and a 2% chlorhexidine gel (CHX) was used as a positive control.

This study was divided into three phases.

The first phase evaluated the antimicrobial effect of the formulations DX and NIT against Gram-positive bacteria, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*, Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and fungus *Candida albicans*. The formulations were tested using the traditional agar diffusion test and the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) test. Based

on the descriptive analysis of the agar diffusion test, DX presented a better antibacterial effect for most bacteria in the study. NIT values were lower than the CHX's for all bacteria, with the exception of *E. coli*. DX and NIT were found ineffective for *C. albicans*. The descriptive analysis of MIC showed that DX was more effective than NIT, but when compared with CHX, it presented a lower antimicrobial effect.

The second phase evaluated the antimicrobial effect against *E. faecalis* on the external root surface and the ability of diffusion through dentinal tubules of the new intracanal medications. Fifty human canine teeth were instrumented, sterilized and randomly divided into 5 groups of 10 teeth each, according to the formulation used as intracanal dressing: teeth sealed without medication (SM), negative control; CHX, positive control; placebo gel (PC); NIT and DX. After filling the root canals with the formulations, the teeth were incubated in the agar plates seeded with *E. faecalis*. The analysis of the halos revealed that DX had a larger inhibitory zone than CHX, while PC and NIT showed no antibacterial effect on the external root surface.

The last phase evaluated the antimicrobial activity on infected root canals with *E. faecalis*. The chosen formulation was DX, as it obtained the best results on previous phases. Microbial samples were collected during three different time periods. The first sample (**S1**) was collected 21 days after contamination with *E. faecalis*; the second sample (**S2**) was collected 14 days under the effect of the intracanal medication, and the third sample (**S3**) 7 days after replacing the medication by BHI (*Brain Heart Infusion*) broth. The count of Colony Forming Units (CFU/mL) was statistically analyzed by repeated measures test (ANOVA) ($p < 0,05$). All intracanal dressings significantly reduced the number of bacterial cells in the root canal after 14 days with medication (S2). After a period of 7 days with BHI broth (S3), the CFU counts of *E. faecalis* remained at low values in DX and CHX groups. The SM group, however, showed a significant increase of CFU in this period, to values similar to those of the initial contamination. These results show that DX was effective in eliminating *E. faecalis* from the root canal system, significantly decreasing the number of microorganisms after 14 days with medication and suggesting some substantivity after 7 days.

Conclusion: From the two formulations suggested in this study, DX presented better antimicrobial effect against the microorganisms in the study (agar diffusion and MIC), supported by the effect on the external root surface and inside the root canal system. This new formulation containing DX can be considered as a possible intracanal dressing, namely in cases of endodontic failure.

Key words

Enterococcus faecalis, Endodontics, Doxycycline, Nitrofurantoin, Chlorhexidine

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos têm um papel etiológico crucial nas doenças pulpares e periapicais ^(1, 2). Assim, o objetivo principal do tratamento destas situações clínicas passa pela sua eliminação, permitindo, na maioria das vezes, a resolução do problema ⁽³⁾. Estes microrganismos desenvolvem-se no interior dos canais radiculares, sob a forma de biofilmes sésseis. O êxito do tratamento endodôntico estará dependente da eficácia da sua completa erradicação antes da obturação, ou, pelo menos, da redução microbiana para valores suscetíveis de permitir a cura ⁽⁴⁻⁶⁾.

O insucesso do tratamento endodôntico tem sido atribuído à persistência de microrganismos no interior dos canais, os quais sobrevivem à preparação mecânica e química destes ⁽²⁰⁾. Neste tipo de infeções secundárias, os microrganismos *E. faecalis* e *C. albicans* são frequentemente isolados, por vezes em monoinfeções ^(7, 8).

Devido à complexidade do sistema de canais radiculares, a ação mecânica e química dos instrumentos e soluções irrigadoras não é, por vezes, suficiente para a total eliminação dos microrganismos. Surge, por isso, a necessidade de complementar o tratamento químico-mecânico com uma medicação intracanal, de forma a atingir microrganismos mais resistentes, presentes em locais menos acessíveis. Esta medicação deverá atuar no lúmen do canal principal ⁽⁹⁻¹²⁾ e difundir-se através dos canais acessórios e túbulos dentinários, aumentando, desta forma, a possibilidade de atingir um maior número de microrganismos e melhorar a taxa de sucesso do tratamento endodôntico ⁽¹²⁻¹⁴⁾.

A medicação intracanal ideal deverá possuir um amplo espectro de ação antimicrobiano, ter capacidade de difusão, e não apresentar citotoxicidade para os tecidos envolventes ^(15, 16).

Apesar da grande variedade de medicação intracanal existente, há estudos que evidenciam que a pasta de hidróxido de cálcio é a que se aproxima mais da formulação ideal ^(17, 18). No entanto, esta não se mostrou igualmente eficaz para todos os microrganismos isolados nos canais radiculares ⁽¹⁹⁾.

O gluconato de clorhexidina foi recentemente introduzido devido ao seu amplo espectro antibacteriano ^(20, 21). Este inclui grande parte dos microrganismos existentes na cavidade oral, como bactérias de gram positivo e negativo, esporos bacterianos e vírus lipofílicos ⁽²²⁻²⁷⁾. Devido a esta característica e ao facto de apresentar contínua disponibilidade em níveis terapêuticos ⁽²⁸⁻³⁰⁾, o seu uso em Endodontia tem sido proposto tanto sob a forma de solução de irrigação como de medicação intracanal ^(31, 32). A clorhexidina é também caracterizada pela sua capacidade de inibir a matriz metaloproteínase da dentina ⁽²²⁾, apresentar uma elevada substantividade ^(23, 30) e ter uma ação mais eficaz na eliminação de *E. faecalis* e *C. albicans*, comparativamente ao hidróxido de cálcio ^(33, 34).

No grupo das medicações intracanal estão também incluídos alguns antibióticos. As tetraciclina apresentam um amplo espectro de ação ⁽³⁵⁾. A capacidade bacteriostática ⁽³⁶⁾ deste grupo de antibióticos pode ser considerada vantajosa, uma vez que não

promove a lise bacteriana e a consequente libertação de antígenos, nomeadamente endotoxinas ⁽³⁵⁾. Para além da atividade antibacteriana, as tetraciclina têm propriedades anti-inflamatórias, as quais poderão influenciar a cicatrização dos tecidos periapicais ⁽³⁷⁾. Este grupo de antibióticos foi já usado em Endodontia, tanto em formulações de irrigação ⁽²¹⁾ como em medicação intracanal ⁽³⁸⁾.

Em 2003, foi introduzida uma solução de irrigação, MTAD ⁽³⁵⁾, constituída por uma mistura de doxiciclina a 3%, ácido cítrico a 4,25% e um detergente a 0,5% (polissorbato 80) ⁽³⁹⁾. Segundo alguns estudos, esta formulação apresentava-se como uma solução de irrigação promissora tanto pelo efeito antibacteriano face ao *E. faecalis* ⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ como pela biocompatibilidade tecidual ⁽⁴³⁾. No entanto, a acidez desta solução (pH=2,15) revelou poder ser a causa de alterações estruturais na dentina radicular ^(44, 45).

A nitrofurantoína, frequentemente usada nas infeções do trato urinário, é eficaz contra grande parte das bactérias de Gram negativo e de Gram positivo, incluindo *E. faecalis* ⁽⁴⁶⁻⁵⁰⁾. Alguns estudos demonstraram que a nitrofurantoína é mais eficaz que a doxiciclina na eliminação de *E. faecalis* ^(50, 51).

O objetivo deste estudo foi propor duas novas formulações de medicação intracanal, utilizando antibióticos, e avaliar, *in vitro*, qual teria a melhor capacidade de difusão, a menor concentração inibitória mínima (CIM) e o melhor potencial antimicrobiano como medicação intracanal, quando em contacto com alguns dos microrganismos frequentemente isolados em casos de insucesso endodôntico.

2 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA

Muitos dos fracassos endodônticos são atribuídos à proliferação bacteriana que permanece após a preparação biomecânica e obturação dos canais radiculares, ou ainda devido à recontaminação causada pela perda de selamento coronário e/ou por uma obturação inadequada ^(8, 52-56). Outros fatores como a falha no isolamento absoluto durante o tratamento endodôntico e a instrumentação inadequada, bem como a não detecção de todos os canais radiculares existentes, podem conduzir a insucessos ⁽⁸⁾. Mesmo com um tratamento endodôntico metódico e cuidadoso, os fracassos podem ainda surgir devido à complexidade anatômica do sistema canalar. Este fator é o responsável pela não instrumentação e obturação das zonas de difícil acesso do sistema radicular, mesmo recorrendo às diversas técnicas e materiais inovadores ⁽⁵²⁾. Existem ainda outros aspectos, não microbianos, que podem induzir uma inflamação periradicular mas que, devido à sua natureza não microbiana, encontram-se normalmente associados a uma reação transitória. Há ainda autores

que sugerem o envolvimento de fatores não microbianos intrínsecos ou extrínsecos, na origem de lesões periradiculares persistentes ⁽⁵⁷⁾.

No que diz respeito à etiologia microbiana, esta pode dever-se a fatores dependentes da restauração, como as propriedades químicas e físicas dos próprios materiais, e a fatores decorrentes do tratamento endodôntico, como as diferentes técnicas de obturação, bem como a presença ou ausência de *smear layer* ^(8, 52-55, 58, 59). Estas situações de infiltração vão permitir o acesso de microrganismos da cavidade oral e substâncias irritantes ao interior do canal obturado, com eventuais repercussões nos tecidos periapicais, podendo pôr em causa o sucesso do tratamento ^(56, 60-62).

Há estudos que comprovam que a periodontite apical pós-tratamento endodôntico (periodontite secundária) apresenta uma contagem bacteriana mais baixa e com um menor número de espécies, comparativamente com a periodontite apical primária ^(8, 63-67).

As bactérias isoladas nos casos de periodontite secundária são predominantemente de Gram positivo. Através de técnicas de cultura são isoladas, com elevada prevalência, bactérias anaeróbias facultativas, tais como *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Actinomyces*; anaeróbias estritas como *Peptostreptococcus*; e fastidiosas como *Dialister pneumosintes* e *Filifactor alocis* ⁽⁷⁾.

Nos casos de periodontite apical pós-tratamento endodôntico, ainda se realça a presença de *E. faecalis* e *C. albicans* pela sua frequência e elevada prevalência em relação às primárias ^(7, 8). Nestas situações, a presença do *E. faecalis* é mencionada por vários autores ^(8, 63, 64, 66, 67).

O *E. faecalis* é caracterizado pela sua resistência à maioria da medicação intracanal com principal destaque para a pasta de hidróxido de cálcio ^(13, 16, 19, 67-69). Segundo Evans (2002), este facto deve-se não tanto a uma resposta adaptativa ao pH alcalino através da síntese de proteínas, mas sim ao funcionamento de uma bomba de prótons capaz de acidificar o citoplasma, controlando desta forma o pH interno da bactéria ⁽⁷⁰⁾. Uma outra característica de *E. faecalis* é a sua capacidade de resistir a

longos períodos de escassez ou mesmo ausência de alimento, recuperando o suporte nutricional para a sua sobrevivência assim que entra em contato com um meio rico em nutrientes. Consegue, desta forma, manter as suas propriedades patogênicas durante o tratamento endodôntico e consequentemente o potencial de manter a infecção ⁽⁷¹⁾.

Contudo, continua a ser necessário confirmar, através de estudos controlados, se *E. faecalis* é o patogênico de maior relevância nos casos de insucesso endodôntico. Todo este conhecimento taxonômico da população microbiana dos canais radiculares é frequentemente baseado em técnicas de cultura microbiológica. A aplicação de métodos de genética molecular aumentou o conhecimento sobre o espectro da população microbiana endodôntica, para além de ter confirmado muitos dos resultados obtidos através das técnicas de cultura clássica ^(72, 73). Com os avanços da biologia molecular será possível compreender um pouco mais sobre a complexa interação entre os fatores microbiológicos e o hospedeiro, e assim ter uma imagem mais clara sobre a patogénese da doença do ponto de vista subcelular ^(52, 74). Os avanços verificados na técnica de sequenciação do ADN e na biologia computacional têm também contribuído tanto para o conhecimento da população microbiana como da etiopatogenia da periodontite apical ⁽⁷³⁾.

A preparação química e mecânica dos canais reduz substancialmente a carga microbiana no seu interior. Contudo, estes estudos revelam que existem bactérias que poderão manter-se viáveis após a preparação do canal, podendo multiplicar-se durante o período entre sessões. O uso de medicação intracanal com propriedades antibacterianas poderá ajudar a evitar estas situações ⁽⁷⁵⁻⁷⁸⁾. Esta medicação poderá eliminar ou inibir a proliferação de bactérias resistentes à preparação química e mecânica dos canais, prevenindo a reinfeção por bactérias oriundas da cavidade bucal, mesmo que por qualquer motivo o canal fique exposto a esta ^(68, 78, 79).

A medicação intracanal deve ter um amplo espectro antimicrobiano, não deve ser citotóxica e deve ter propriedades físico-químicas que permitam a difusão através dos túbulos dentinários e das ramificações laterais do sistema de canais radiculares ^(15, 16). Estes fármacos não devem interferir com a integridade da estrutura dentinária,

sob o risco de comprometerem o sucesso de possíveis intervenções de reabilitação (80, 81).

Várias foram as substâncias propostas para serem usadas como medicação intracanal. Dentre elas o hidróxido de cálcio, o paramonoclorofenol canforado, a clorhexidina e ainda os antibióticos de aplicação tópica.

O hidróxido de cálcio, forte substância alcalina, é uma das medicações mais comuns pois possui grande parte das propriedades ideais de uma medicação intracanal. Destaca-se quer pelas suas propriedades antimicrobianas, quer pelas biológicas. A sua ação antimicrobiana está relacionada com a dissociação iônica dos íons de cálcio e hidróxido, e com o seu efeito tóxico sobre as bactérias através da inibição das enzimas das membranas citoplasmáticas, que induzem alterações nos componentes orgânicos e no transporte de nutrientes (9, 68, 82). Perante isto, e devido ao pH de 12,5 do hidróxido de cálcio, várias bactérias encontradas nos canais radiculares infetados, são inviabilizadas após um curto período de tempo (13). Para que o hidróxido de cálcio seja eficaz como medicação intracanal, os íons hidróxido devem ser capazes de difundir através dos túbulos dentinários e tecido pulpar. Contudo, foi comprovado que o valor do pH diminui à medida que aumenta a distância ao lúmen do canal radicular (17).

Para além deste fator, alguns autores demonstraram que o pH da dentina pode permitir a sobrevivência ou crescimento de determinadas estirpes bacterianas, uma vez que a grande maioria cresce em ambientes com um pH entre 6 e 9 (17, 83). Porém, a medicação intracanal com hidróxido de cálcio continua a ter um papel fundamental em Endodontia, sendo indicada para várias situações clínicas.

Outra medicação frequentemente usada em Endodontia é o paramonoclorofenol canforado. É um derivado fenólico que, apesar de ter um efeito tóxico nos tecidos periapicais, tem uma elevada atividade antisséptica. Para reduzir esta toxicidade e ao mesmo tempo manter, ou aumentar, a atividade antimicrobiana, têm sido propostas combinações do paramonoclorofenol com diferentes agentes, veículos e métodos de aplicação (13, 84, 85).

No caso da associação do hidróxido de cálcio com o paramonoclorofenol, verificou-se que esta mistura apresenta um espectro antibacteriano mais abrangente, eliminando microrganismos resistentes ao hidróxido de cálcio, e sendo mais rápido na sua eficácia antibacteriana quando comparado com o hidróxido de cálcio misturado com veículos inertes como a água, soro ou glicerina. O raio de ação antibacteriana também é maior, uma vez que atua em microrganismos que se encontram afastados do local preenchido pela pasta de hidróxido de cálcio ^(19, 86-90). Este facto deve-se aos compostos fenólicos que possuem uma baixa tensão superficial, conseguindo, mais facilmente, passar através dos túbulos dentinários ⁽⁹¹⁾. Relativamente à resposta dos tecidos periapicais, esta associação de hidróxido de cálcio com o paramonoclorofenol canforado tem apresentado bons resultados. Com esta associação há libertação de sais de cálcio paramonoclorofenolato juntamente com os grupos hidroxilo, ambos bactericidas. Estudos comprovaram que a resposta tecidular é favorecida pela libertação lenta desses sais de cálcio paramonoclorofenolato, em concentrações que não induzem a destruição dos tecidos ^(91, 92).

O digluconato de clorohexidina é uma “bis-bis-guanida” de natureza catiónica com propriedades antibacterianas, antissépticas, com alguma substantividade e baixa toxicidade em mamíferos ^(25, 27, 93). Graças a estas características, tem sido usada em várias áreas da Medicina Dentária e também em Endodontia como solução de irrigação ^(31, 94) e medicação intracanal ^(9, 88, 95). O seu mecanismo de ação deve-se à interação da carga positiva da molécula com a carga negativa dos grupos fosfato existentes nas paredes celulares dos microrganismos ^(16, 96), que vão provocar a perda irreversível de constituintes citoplasmáticos, inibição enzimática e danos na membrana celular ^(20, 21, 27, 97). A clorohexidina a baixas concentrações provoca a perda de substâncias de baixo peso molecular, resultando num efeito bacteriostático. Em elevadas concentrações, a clorohexidina tem um efeito bactericida devido à precipitação e/ou coagulação de componentes citoplasmáticos ^(96, 98).

O espectro antibacteriano da clorohexidina é bastante amplo abrangendo grande parte dos microrganismos presentes na cavidade oral, incluindo bactérias de Gram positivo, negativo, esporos bacterianos, vírus lipofílicos⁽²²⁻²⁷⁾. Tem ainda capacidade de inibição das metaloproteinases da matriz dentilária⁽²²⁾. Quando comparada com o hidróxido de cálcio, apresenta uma eficácia superior na eliminação de *E. faecalis* e *C. albicans* existentes nos túbulos dentinários^(33, 34).

A clorohexidina, no entanto, apresenta algumas desvantagens como a incapacidade de dissolver tecidos orgânicos, a formação de precipitados quando em contato com o hipoclorito de sódio, entre outras sem relevância no tratamento endodôntico^(25, 99-101).

Ao longo dos anos, todas estas substâncias têm sido estudadas e avaliadas, com o intuito de perceber a sua ação e qual a melhor forma e concentração a utilizar⁽¹⁰²⁾.

Alguns autores⁽⁸⁷⁾ efetuaram estudos comparando a ação do paramonoclorofenol canforado, do hidróxido de cálcio e da sua associação perante bactérias como *Actinomyces israeli*, *Fusobacterium nucleatum* e *E. faecalis*, verificando que o paramonoclorofenol canforado aumentava o efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio. Lima *et al*⁽¹⁰³⁾, comparando a ação do hidróxido de cálcio e da sua combinação quer com paramonoclorofenol canforado, quer com clorohexidina 0,4%, verificaram que as medicações com hidróxido de cálcio têm capacidade de reduzir significativamente o número de colónias de *E. faecalis* do sistema de canais radiculares. Outros ensaios clínicos^(11, 76, 104) avaliaram a eficácia do hidróxido de cálcio, da clorohexidina 2% e da combinação dos dois, constatando que todos têm ação antimicrobiana quando em contacto com *E. faecalis*. No entanto, foi a clorohexidina 2% que apresentou maior eficácia.

Os antibióticos têm sido usados no tratamento e prevenção de infeções bacterianas, em várias áreas da Medicina e Medicina Dentária, podendo ser de administração sistémica ou aplicação tópica. A Endodontia é uma dessas áreas, sendo atualmente a aplicação tópica (intracanal) de antibióticos um assunto controverso^(105, 106).

Aparentemente, é visível a eficácia do uso de antibióticos sistêmicos para complementar/coadjuvar determinados procedimentos endodônticos cirúrgicos e não-cirúrgicos. Contudo, a sua administração deve ser bem ponderada uma vez que a ela estará sempre associado o risco de reações adversas sistêmicas como por exemplo, reações alérgicas, de hipersensibilidade, de toxicidade e desenvolvimento de resistências ⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾. Além disso, a administração sistêmica de antibióticos depende da circulação sanguínea para conseguir levar o composto ativo até ao local da infecção, que poderá já não possuir uma vascularização normal ^(107, 109). Infelizmente, a cavidade pulpar de um dente com polpa necrosada é uma cavidade isolada, de difícil acesso ao sistema imunitário local ⁽¹¹⁰⁾. Além disso, e uma vez que a sua vascularização está comprometida, a concentração de antibiótico que consegue alcançar o espaço do canal radicular após a administração sistêmica é mínima, não conseguindo inibir o crescimento bacteriano ^(105, 107, 109). Devido à ineficácia dos antibióticos sistêmicos, no que diz respeito aos dentes com polpa necrosada e tecidos periradiculares, a administração tópica de antibióticos poderá ser um modo mais efetivo de aplicação e de distribuição dos compostos ativos ^(13, 107, 109, 111-113).

Nos casos de periodontite apical persistente, pode haver vantagens na aplicação tópica de antibacterianos, especialmente após uma cuidadosa cultura e testes de sensibilidade, para que seja selecionado o agente mais apropriado de acordo com o tipo de microrganismos implicados ⁽¹¹⁴⁾. Com este tipo de aplicação pretende-se que haja um efeito terapêutico mais eficaz sobre a infecção e em doses muito mais baixas que as usadas na administração sistêmica, com a consequente diminuição do risco de efeitos secundários.

O primeiro relato do uso de antibiótico com ação local foi em 1951, quando Grossman usou uma pasta poliantibiótica conhecida como PBSC ⁽¹¹⁵⁾. A sua constituição incluía penicilina, bacitracina, estreptomicina e caprilato de sódio, mas era ineficaz contra as principais espécies bacterianas responsáveis pelas patologias endodônticas ⁽¹²⁾.

Posteriormente, surge a pasta Ledermix[®] à base da combinação de uma tetraciclina e um corticosteroide ⁽¹²⁾, com capacidade de difusão através dos túbulos dentinários e cimento até aos tecidos periodontais e periapicais ⁽¹¹⁶⁾. Demonstrou-se que esta medicação não provoca danos no ligamento periodontal e que é eficaz no tratamento da reabsorção radicular progressiva, em dentes com lesões traumáticas ^(107, 113). Uma desvantagem é a descoloração dos dentes, quando a sua aplicação não se restringe à área infra gengival ⁽¹¹⁷⁾.

A mistura de Ledermix[®] com hidróxido de cálcio estaria indicada para dentes com polpa necrosada e formação incompleta da raiz, perfurações, reabsorções radiculares inflamatórias e no tratamento de grandes lesões radiolúcidas ^(12, 113). Esta associação apresenta uma difusão mais lenta dos componentes permitindo que o medicamento fique mais tempo no interior dos canais ⁽¹¹⁸⁾. Porém, existe um estudo que sugere que alguns medicamentos não devem ser usados em associação quando se trata de dois produtos com elevada atividade antimicrobiana, uma vez que os efeitos sobre determinados microrganismos podem não ser nem aditivos, nem sinérgicos ⁽¹¹⁹⁾.

Septomixine Forte[®] surge da combinação de dois antibióticos, neomicina e sulfato de polimixina B, mas a sua aplicação não foi efetiva na inibição do crescimento das bactérias residuais, entre sessões ⁽¹²⁰⁾. Tanto o Ledermix[®] como o Septomixine Forte[®] não parecem ser a medicação intracanal mais indicada, uma vez que os seus espetros de ação não abrangem as bactérias mais frequentemente relatadas nas lesões endodônticas ⁽¹⁰⁵⁾.

Já a clindamicina é eficaz contra muitos dos microrganismos presentes nas lesões endodônticas ^(109, 113). Contudo, a sua atividade parece estar limitada, temporalmente, a 14 dias ⁽¹¹³⁾. Apesar disso, não oferece vantagens relativamente à medicação intracanal convencionalmente usada, como o hidróxido de cálcio ⁽³⁸⁾.

A pasta triantibiótica à base de ciprofloxacina, minociclina e metronidazol, tem sido mencionada como bastante eficaz na desinfecção do sistema de canais radiculares ^(107, 113). Hoshino *et al.* investigaram o efeito antibacteriano da pasta triantibiótica com

e sem a adição de rifampicina, em bactérias de canais radiculares infetados e em bactérias de dentina cariada e polpa infetada. Verificaram que, isoladamente, as drogas não conseguem eliminar as bactérias na totalidade mas são eficazes quando usadas em conjunto ⁽¹²¹⁾.

Mais tarde surge na literatura evidência de uma solução de irrigação designada por MTAD, eficaz na eliminação de *E. faecalis*, constituída por um antibiótico, tetraciclina (doxiciclina), um agente desmineralizante (ácido cítrico) e um detergente (Tween 80) ^(39, 43). Apesar da doxiciclina não ser o antibiótico mais específico para a eliminação de *E. faecalis* ⁽¹²²⁾, é usada em alguns compostos para esse fim, em Endodontia. A solução de irrigação supracitada é um desses casos e há vários estudos que demonstram essa eficácia ^(41-43, 123-125). A inclusão do detergente no MTAD tem como objetivo reduzir a tensão superficial e aumentar a capacidade de humedecer as paredes do canal, permitindo uma melhor penetração da substância nos túbulos dentinários e outros espaços irregulares ^(39, 122).

A nitrofurantoína é um agente antimicrobiano sintético ⁽⁴⁷⁾ que apresenta atividade bactericida e bacteriostática sobre um elevado número de bactérias ⁽⁵⁰⁾. É frequentemente utilizada nas infecções do trato urinário, tendo eficácia comprovada contra muitas bactérias de Gram positivo e negativo, incluindo *E. faecalis* ⁽⁴⁶⁻⁵⁰⁾. Estudos demonstraram que a nitrofurantoína poderia estar indicada no tratamento de infecções causadas por *E. faecalis* ⁽⁴⁷⁾ e que, relativamente a esta bactéria, apresentaria uma maior eficácia quando comparada com a doxiciclina ^(50, 51).

Entre as sessões de tratamento e pós-obturação é geralmente utilizado um material de obturação provisória. Este material deverá prevenir a entrada de fluídos, microrganismos e outros detritos para o interior do canal. Além disso, deve manter o selamento permitindo a atuação da medicação entre sessões, e assim garantir o sucesso do tratamento endodôntico ^(58, 59, 126-130).

Assim, há vários fatores que podem influenciar o sucesso do tratamento endodôntico dos quais se destacam o grau de infiltração, a presença e tipo de restauração, o tempo de exposição bacteriana, o tipo de medicação intracanal e a qualidade da

obturação endodôntica, bem como o grau de virulência dos microrganismos infiltrados ⁽⁵⁶⁾. Uma vez que não há estudos que comprovem uma correlação entre infiltração de fluídos e bactérias ⁽¹³¹⁾, a informação que é obtida através de estudos bacterianos é fundamental no contributo para a seleção de protocolos com uma maior relevância clínica e biológica ⁽¹³²⁾.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar, *in vitro* e em dentes humanos, o comportamento de novas formulações de medicação intracanal contra *Enterococcus faecalis*.

3.2 ESPECÍFICO

1. Avaliar a ação antimicrobiana dos géis NIT e DX quando em contato com os microrganismos *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, testados pelo método de difusão em agar e pelo CIM.

2. Avaliar a ação antimicrobiana dos géis NIT e DX como medicação intracanal, na superfície externa da raiz a partir de uma adaptação do método de difusão em agar.

3- Avaliar a ação antimicrobiana do gel DX como medicação intracanal, em dentes contaminados com *E. faecalis*, a partir de colheitas dos canais radiculares e cultura clássica.

4 METODOLOGIA DO TRABALHO EXPERIMENTAL

4.1 DELINEAMENTO DO TRABALHO EXPERIMENTAL E SELEÇÃO DOS DENTES

O delineamento do trabalho experimental envolveu 3 fases. Na primeira analisou-se, qualitativamente, a ação antimicrobiana dos medicamentos manipulados para este estudo quando em contato com cinco espécies de microrganismos, envolvendo bactérias de Gram positivo, de Gram negativo e um fungo (Figura 1). Na segunda fase verificou-se a ação antimicrobiana e a capacidade de atuação na superfície externa da raiz (difusão através dos canalículos dentinários) dos medicamentos manipulados, usando culturas de *E. faecalis* em placas de agar (Figura 2). Na

terceira e última fase avaliou-se, *in vitro*, a ação antimicrobiana da DX como medicação intracanal em dentes infectados com *E. faecalis*, com o recurso a colheitas dos canais radiculares e cultura clássica (Figura 3).

Para este estudo foram utilizados 50 dentes caninos humanos extraídos e desinfetados com 0,5% de cloramina, conservados em água destilada e utilizados antes de seis meses de armazenamento. Os elementos foram selecionados individualmente, considerando os seguintes critérios de inclusão: ausência de cárie ou fraturas, ausência de restaurações, ausência de dilacerações radiculares e não existência de tratamento endodôntico prévio. Foram obtidos no Banco de Dentes Humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa (BDH-UEPG) tendo sido protocolados e devidamente aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa (COEP-UEPG), cujo documento de aprovação se encontra em anexo (protocolo:8876/12).

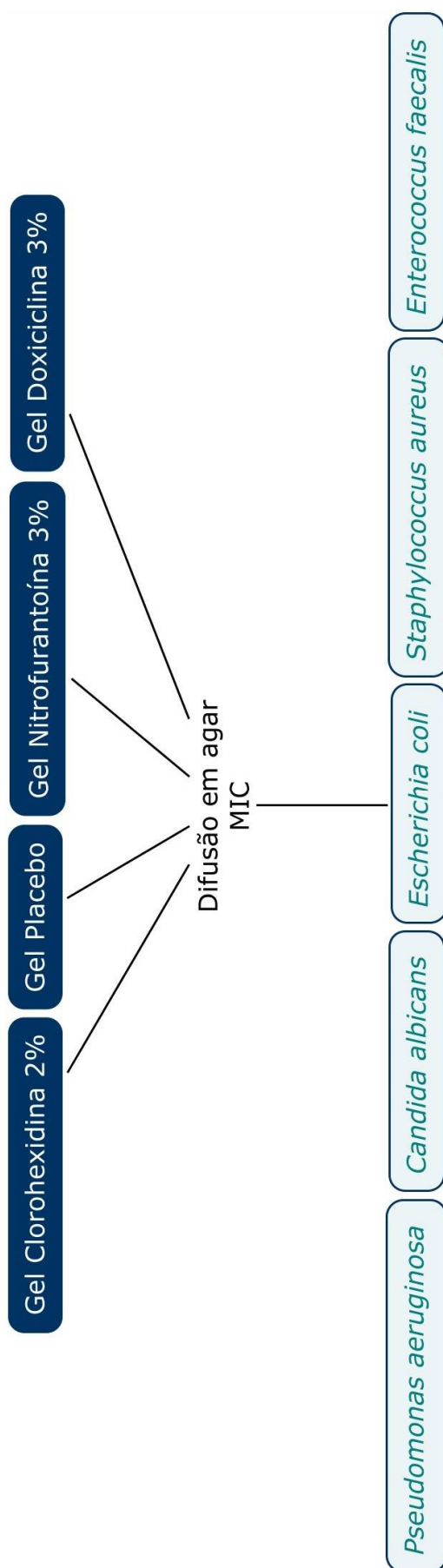


Figura 1 - Cronograma da primeira fase do trabalho experimental.
Análise qualitativa da ação antimicrobiana dos medicamentos manipulados quando em contato com as cinco espécies de microrganismos em estudo

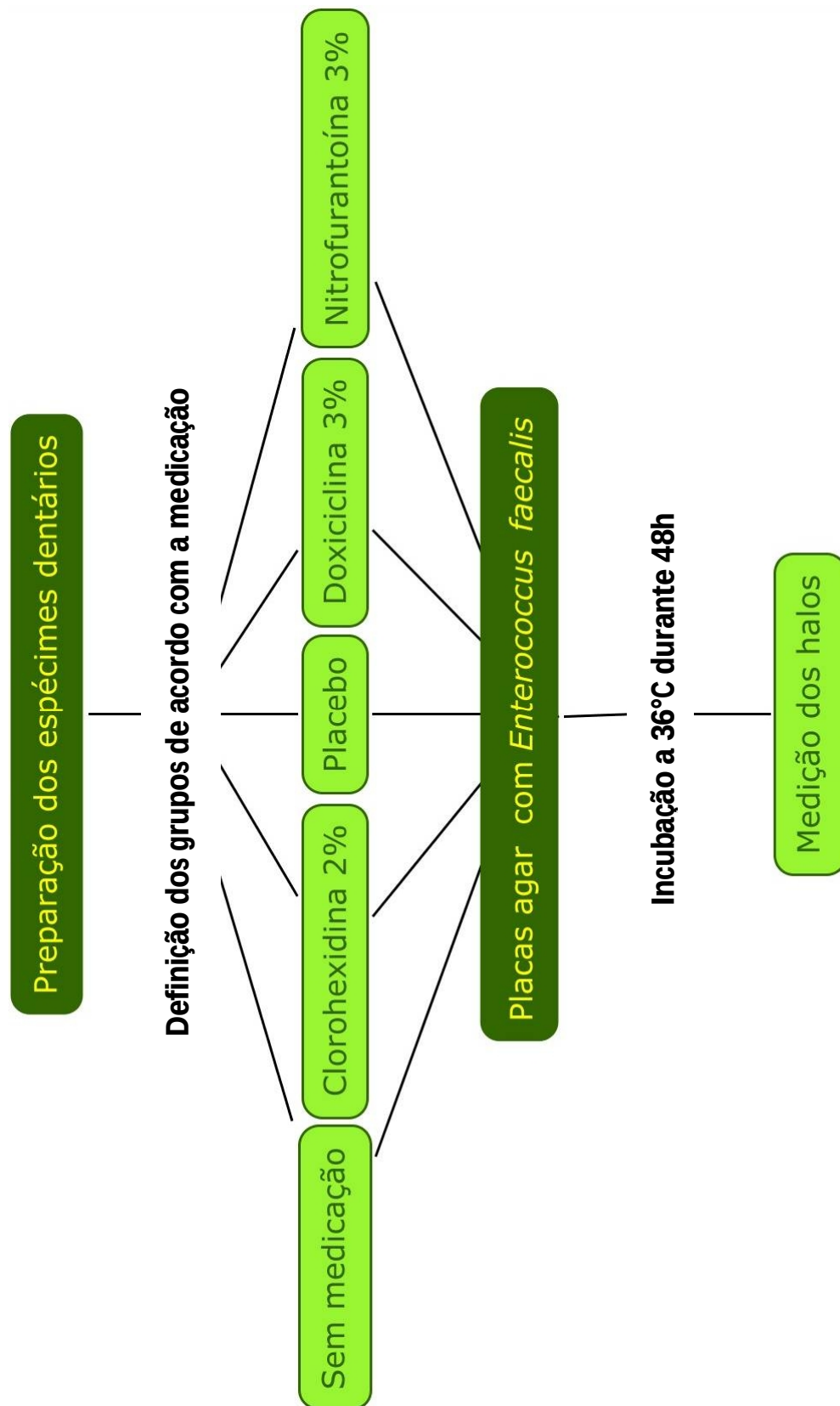


Figura 2 - Cronograma da segunda fase do trabalho experimental.

Avaliação da ação antimicrobiana e da capacidade de atuação dos medicamentos manipulados na superfície externa da raiz (difusão através dos canais dos dentinários), usando meios de cultura com *E. faecalis*.

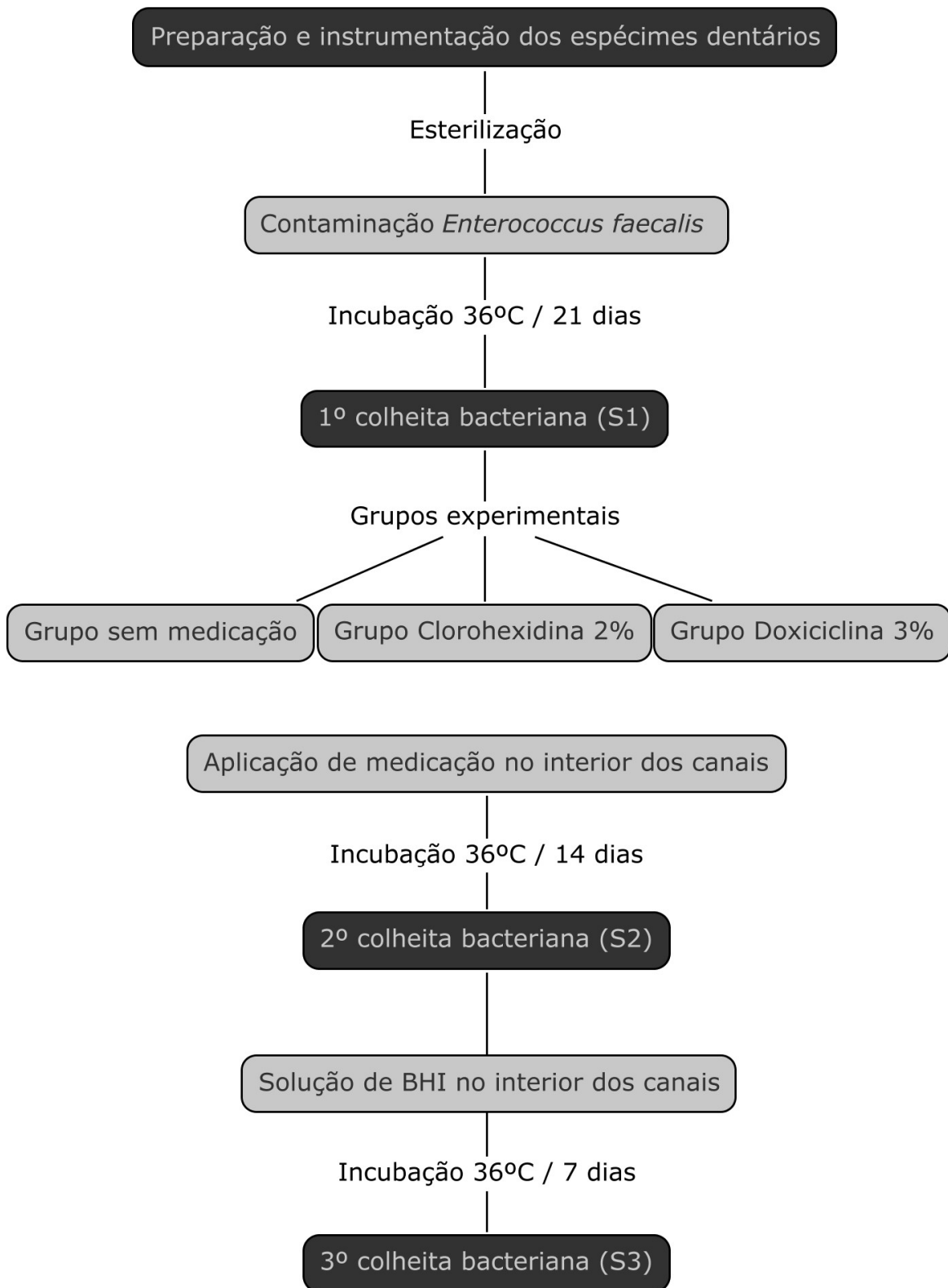


Figura 3 - Cronograma da terceira fase do trabalho experimental.

Avaliação *in vitro* da ação antimicrobiana da DX como medicação intracanal em dentes infectados com *E. faecalis*, com recurso a colheitas dos canais radiculares e cultura clássica.

4.2 ESTIRPE DOS MICRORGANISMOS

Os microrganismos usados neste estudo fazem parte da *American Type Culture Collection* (ATCC), estirpes existentes no *stock* do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Odontologia da UEPG:

- *Enterococcus faecalis* (ATCC nº 29203),
- *Staphylococcus aureus* (ATCC nº 29213),
- *Escherichia coli* (ATCC nº 25922),
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC nº 27853),
- *Candida albicans* (ATCC nº 90028).

4.3 PREPARAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS AUXILIARES A SEREM UTILIZADAS

Para a execução das preparações auxiliares utilizou-se, quando necessário, uma balança (*Gettaka, BG 2000, São Paulo-Brasil*), bem como o agitador mecânico eletrônico mini Q235 (*Quimis – Modelo: 235-2, São Paulo-Brasil*) (Figura 4).

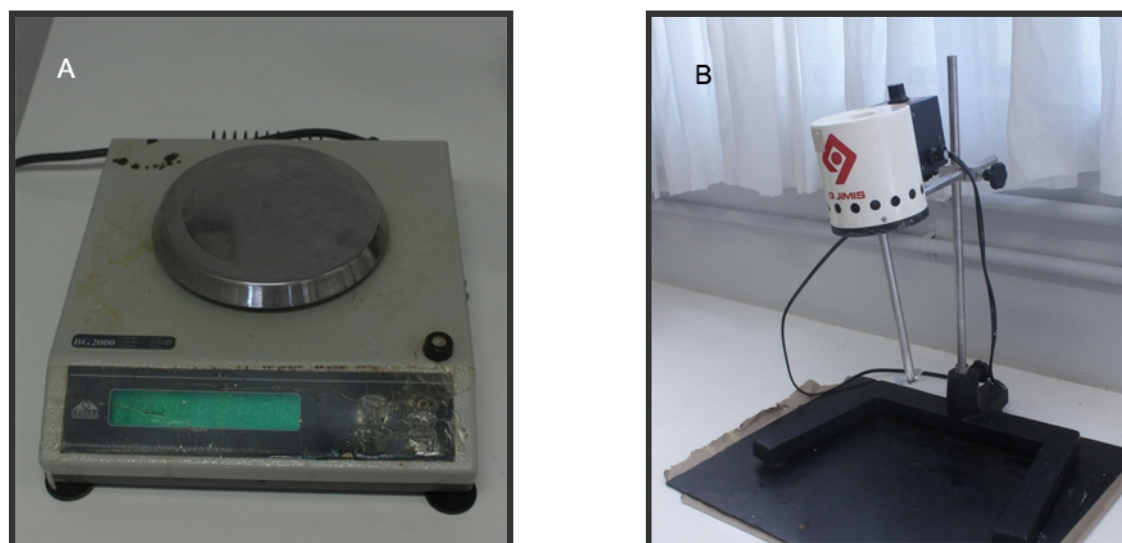


Figura 4 - (A) Balança e (B) agitador mecânico eletrônico mini Q235.

4.3.1 MEDICAÇÕES INTRACANAL

GEL BASE DE HIDROXIETILCELULOSE (NATROSOL®) A 2% – 1L

Juntou-se 20g de hidroxietilcelulose a 2%, com 1g de metilparabeno e água destilada até perfazer os 100mL. Levou-se a lume brando mexendo lentamente com uma espátula. Assim que começou a ferver e a ganhar consistência, retirou-se do lume e deixou-se arrefecer (Figura 5) ^(43, 133-135).



Figura 5 - Gel Base de Hidroxietilcelulose a 2% (Natrosol®).

GEL DE CLOROHEXIDINA A 2% – 100G (CHX)

Num almofariz juntou-se 10g de digluconato de clorohexidina, 50g de propilenoglicol e 0,5g de Tween 80, misturando cuidadosamente até ficar homogéneo. Num *goblet* pesou-se 39,5g de gel base Natrosol® 2% e adicionou-se a preparação anterior mexendo até ficar um composto homogéneo com 100g de peso final (Figura 6 – M) ^(43, 133-135).

GEL PLACEBO 100G (PC)

Misturou-se num almofariz 50g de propilenoglicol com 0,5g de Tween 80. Num *goblet* pesou-se 0,76g de fosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4), 1,94g de

fosfato de disódico anidro (Na_2HPO_4) e 41,8g de gel base Natrosol® 2%, mexendo muito bem até dissolver todo o fosfato. A este preparado foi adicionado o anterior, tendo-se misturado até se obter um composto homogêneo com 100g de peso final (Figura 6 - N) ^(43, 133-135).

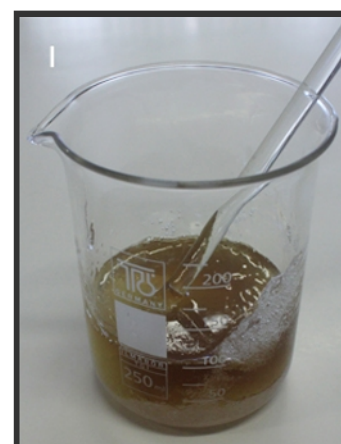
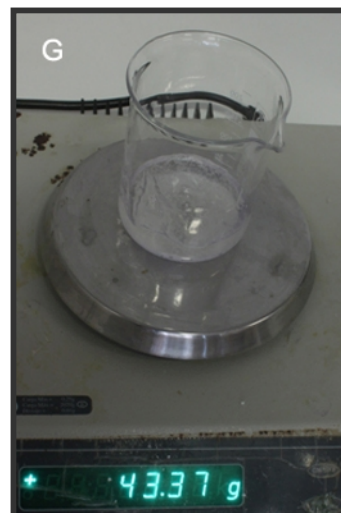
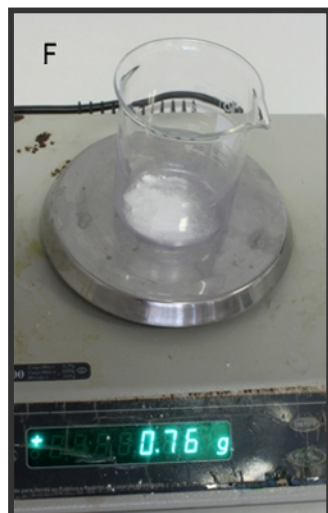
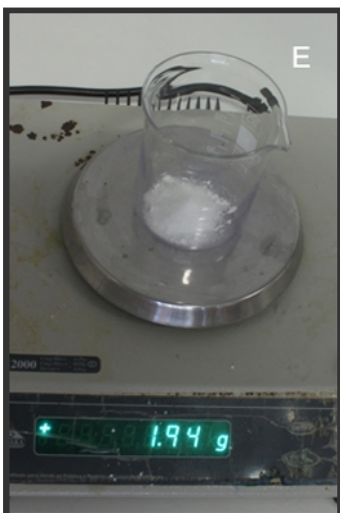
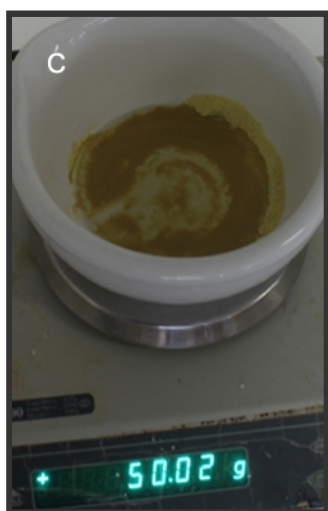
GEL DE NITROFURANTOÍNA A 3% - 100G (NIT)

Colocou-se 3g de nitrofurantoína num almofariz, triturou-se e, em seguida, dissolveu-se em 50g de propilenoglicol e 0,5g de Tween 80. Num *goblet* juntou-se 0,76g de NaH_2PO_4 , 1,94g de Na_2HPO_4 e 43,8g de gel base Natrosol® 2%, mexeu-se bem até dissolver todo o fosfato. A este preparado foi adicionado o anterior, tendo-se misturado até se obter um composto homogêneo com 100g de peso final (Figura 6 - O) ^(43, 133-135).

GEL DE DOXICICLINA A 3% - 100G (DX)

Juntou-se e triturou-se num almofariz 3,33g de cloridrato de doxiciclina (equivalente a 3g de doxiciclina) e 0,1g de metabissulfito de sódio (Figura 6 – B). Em seguida dissolveu-se com 50g de propilenoglicol e 0,5g de Tween 80 (Figura 6 - C,D). Num *goblet* juntou-se 0,76g de NaH_2PO_4 , 1,94g de Na_2HPO_4 e 43,37g de gel base Natrosol® 2% e mexeu-se bem com uma vareta (Figura 6 – E, F, G). A este preparado foi adicionado o anterior até se obter um composto homogêneo com peso final de 100g (Figura 6 – H, I, J, P, L) ^(43, 133-135).





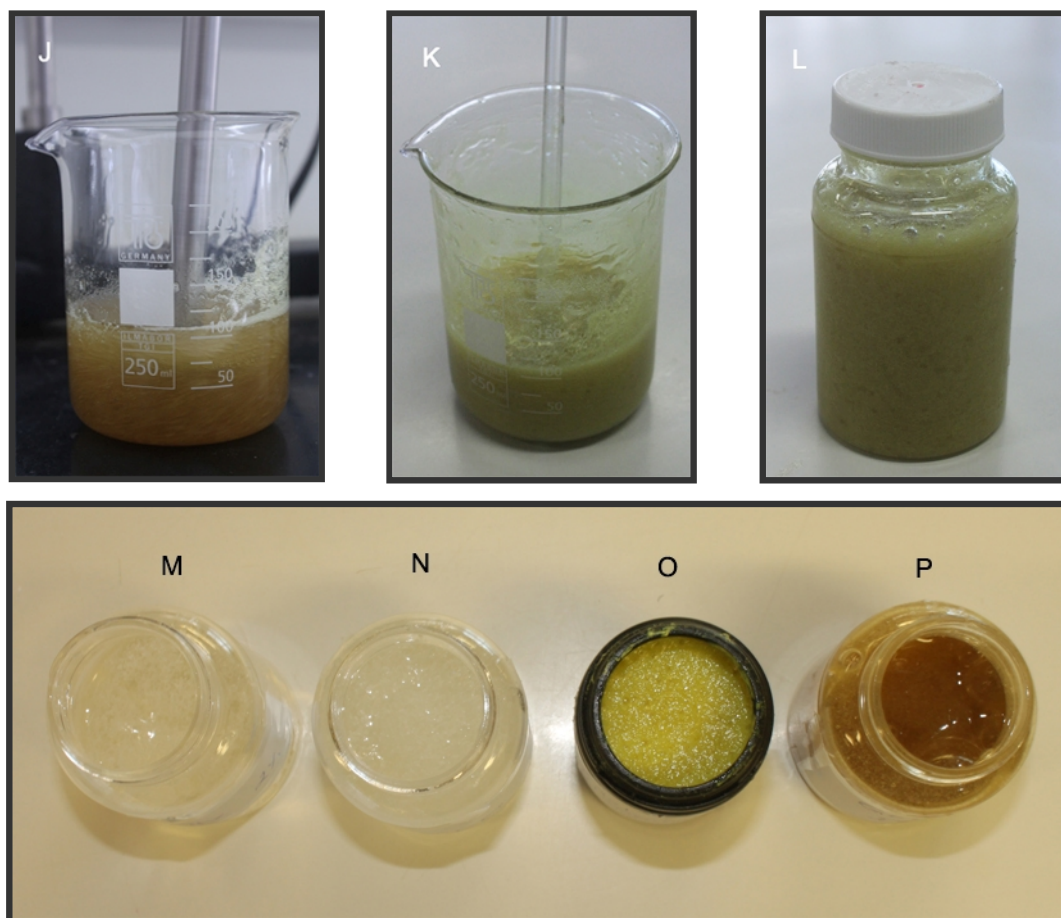


Figura 6 - Preparação das diferentes medicações intracanal: (A) material utilizado, (B) cloridrato de doxiciclina (Fc 1,11g), (C) propilenoglicol, (D) dissolução do cloridrato de doxiciclina, 0,1% de metabissulfito de sódio, propileno e Tween 80, (E) Na_2HPO_4 , (F) NaH_2PO_4 , (G) gel base Natrosol® 2%, (H) junção das duas preparações, (I,J) homogeneização com vareta e agitador mecânico, (K,L) produto final da manipulação do gel DX, (M) CHX, (N) PC, (O) NIT, (P) DX.

4.3.2 SOLUÇÕES DE IRRIGAÇÃO

SOLUÇÃO DE EDTA A 17% - 1L

Para a preparação de 1L da solução, inicialmente pesou-se 170g EDTA Na_2 , mediu-se 92,5 mL de NaOH 20% e ferveu-se 1L de água destilada (Figura 7- A).

Num balão de diluição de 1L juntou-se o EDTA e a água fervida até cerca de 500mL. Adicionou-se o NaOH 20% e agitou-se bem até dissolver o pó. Em seguida, sem parar de mexer, adicionou-se o resto da água até perfazer o volume pretendido. Filtrou-se e armazenou-se a solução numa garrafa de plástico (Figura 7- B) ^(43, 133-135).

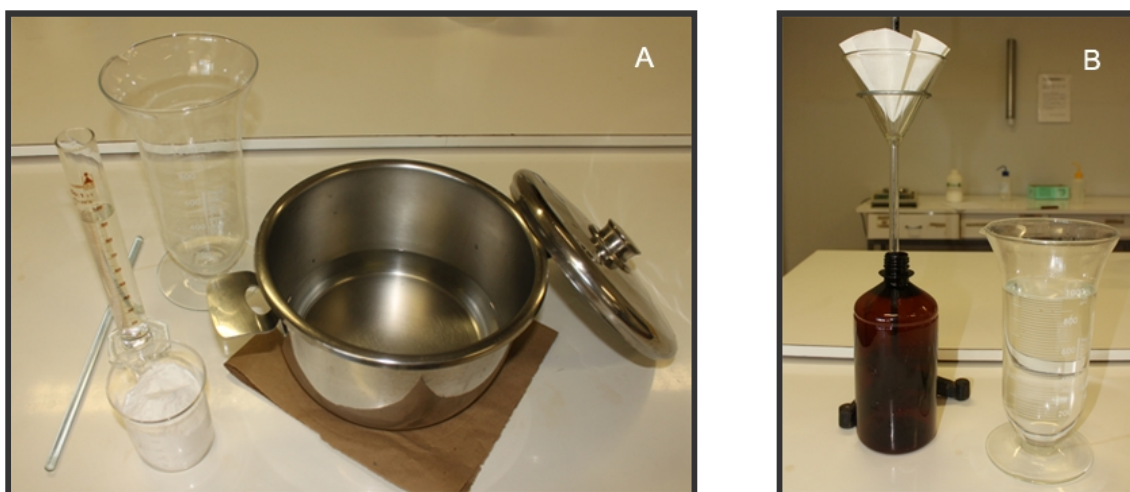


Figura 7 – (A) Preparação da solução de EDTA a 17% com EDTA Na₂, NaOH 20% e água destilada. (B) Filtração da solução para garrafa de plástico após dissolução.

SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaClO) A 5,25%

Antes de todo o processo foi necessário efetuar uma titulação para confirmar a concentração real da solução de NaClO. (Concentração real = 9,56%)

A partir da percentagem obtida, calculou-se o Fc através da fórmula: $Fc = 100 / \text{Potência (\%)}$. ($Fc = 10,46$)

Para obter uma solução de NaClO a 5,25% (1730mL), mediu-se numa proveta 780 mL de água destilada e 950 mL solução de NaClO comercial. Após a junção das duas soluções num balão volumétrico, misturou-se bem e armazenou-se a solução (Figura 8) ^(43, 133-135).

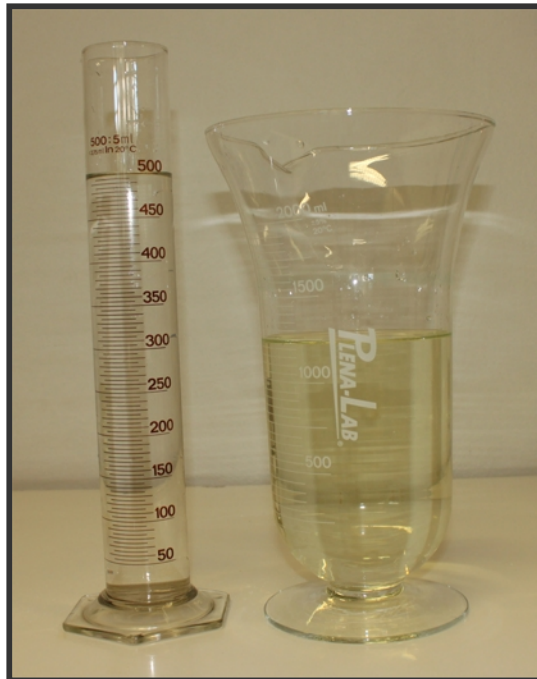


Figura 8 - Preparação da solução de NaClO a 5,25% a partir da junção de água destilada e NaClO comercial.

4.3.3 SOLUÇÕES NEUTRALIZANTES

O uso da substância neutralizante, de acordo com o agente antimicrobiano utilizado durante o tratamento, irá minimizar a interferência pós-tratamento destas substâncias químicas que, se transportadas para o meio de cultura, poderão provocar resultados falsos negativos.

Através da Tabela 1 verifica-se que este agente varia consoante a substância em questão.

Tabela 1 – Agentes neutralizantes de acordo com o tipo de composto⁽¹³⁵⁾.

SUBSTÂNCIA	AGENTE NEUTRALIZANTE	CONCENTRAÇÃO
Clorohexidina	Lecitina +Tween 80	0,5% +1,0%
Composto quaternário de amônio (Nitrofurantoína)	Lecitina +Tween 80	0,5% +1,0%
Composto fenólico (Doxiciclina)	Tween 80	1,0%

Perante isto, preparou-se uma solução neutralizante de lecitina +Tween 80 com a concentração de 0,5% +1,0%, que abrangeu todos os compostos ⁽¹³⁵⁾.

SOLUÇÃO DE 0,5% DE TWEEN 80 EM 0,07% LECITINA DE SOJA (300 ML)

Num balão volumétrico pesou-se 1,5 g de lecitina de soja e posteriormente, no mesmo balão, 3g de Tween 80 (Figura 9). Adicionou-se água destilada até perfazer o volume pretendido e, em seguida, misturou-se muito bem até se obter uma solução homogênea. Após a colocação em recipientes de vidro opaco, armazenou-se no frigorífico até ao seu uso ^(43, 133-135).



Figura 9 - Preparação da solução neutralizante com a junção de lecitina de soja e de Tween 80 num balão volumétrico.

4.4 PRIMEIRA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL

4.4.1 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO ATRAVÉS DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM AGAR

Foram preparadas suspensões com $1,5 \times 10^8$ células/mL com cada um dos seguintes microrganismos: *E. faecalis*, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Estas suspensões foram padronizadas pela escala de McFarland a 0,5 usando o espectrofotômetro (*Micronal, B220, Santo Amaro, São Paulo - Brasil*), e pela escala visual (Figura 10 – A, B, C, D). Com o auxílio de uma zaragatoa fez-se a inoculação em placas de Petri com agar de Muller Hinton (MH) ^(78, 135). Estas foram incubadas a 36°C durante 10 min para secagem (Figura 10 – E,F).

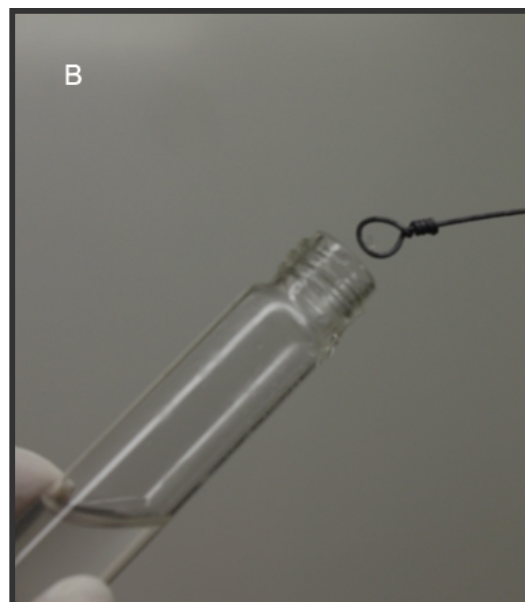
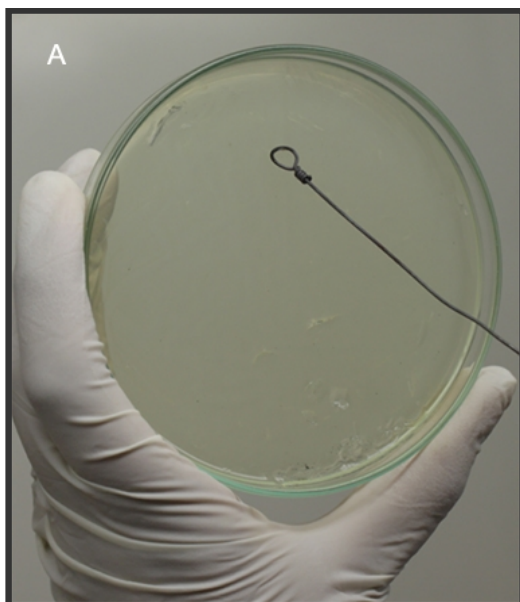




Figura 10 - Inoculação das placas de agar com *E. faecalis*: (A,B) Preparação de suspensões de $1,5 \times 10^8$ células/mL de *E. faecalis*, (C) agitador de tubos vortex, (D) confirmação da concentração no espectrofotômetro, (E) inoculação da bactéria *E. faecalis*, (F) incubação das placas inoculadas.

Com o auxílio de tubos de vidro esterilizados, foram confeccionados quatro ou cinco poços com 4mm de diâmetro e de profundidade no agar, onde foram depositados os géis de CHX, PC, NIT, DX e Natrosol® 2% (Figura 11 – A- D) ^(78, 135, 136).

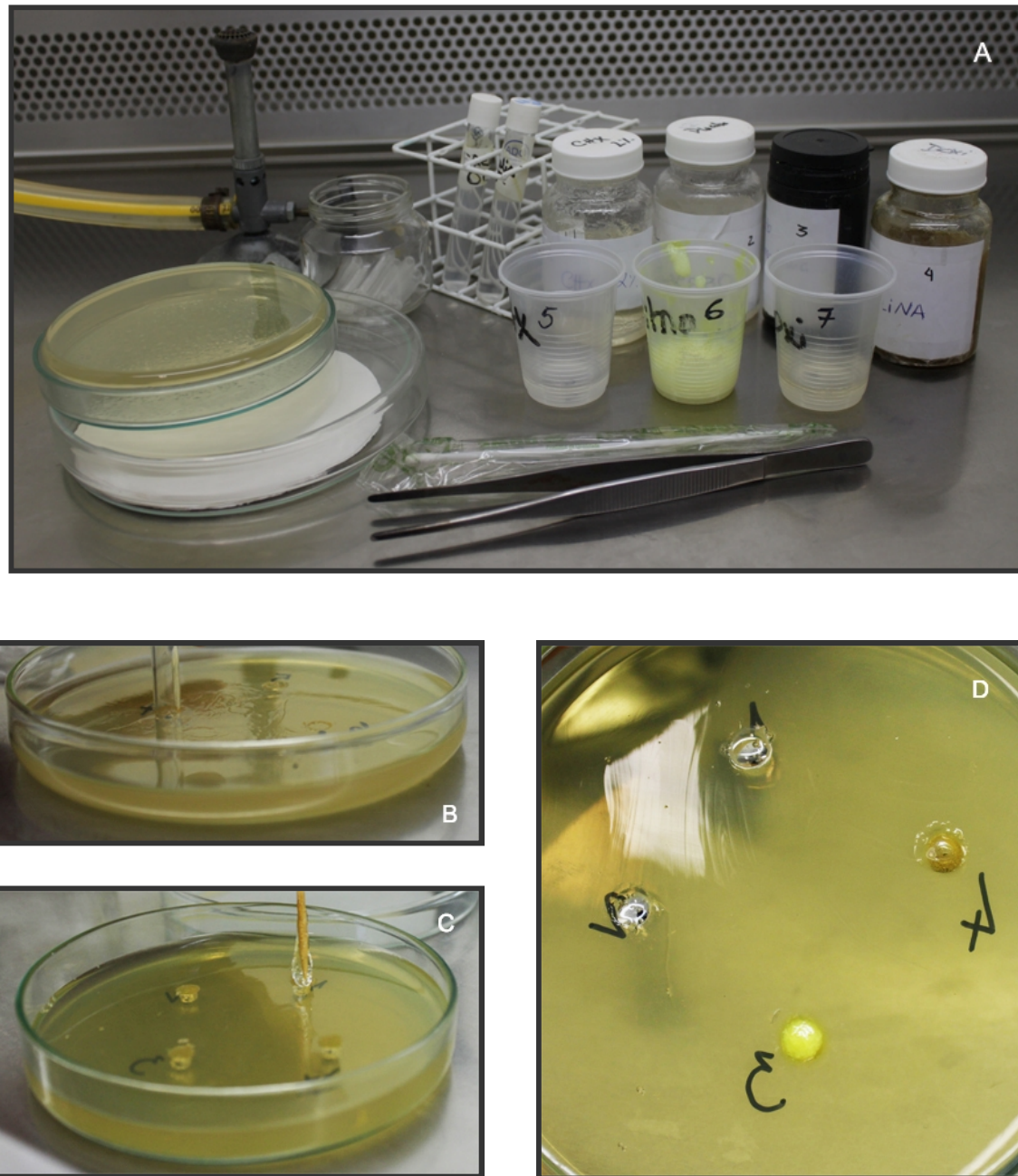


Figura 11 – Preparação das placas de agar para o método de difusão: (A) material utilizado durante o procedimento, (B) confecção de poços nas placas de MH com o auxílio dos tubos de vidro esterilizados, (C) aplicação das diferentes medicações nos respectivos poços, (D) placa de agar de MH com as várias medicações.

Depois da incubação em estufa bacteriológica a 36°C durante 24h, determinaram-se os diâmetros dos halos da zona de inibição de crescimento microbiano, recorrendo a um paquímetro digital (*Digimess, São Paulo, Brasil*) e uma boa fonte de luz refletida.

Foi considerada, como zona inibitória, a menor distância (mm) desde a margem externa do poço até ao ponto onde se verifica o início do crescimento bacteriano (Figura 12 e Figura 13).

As medições foram feitas colocando o paquímetro digital de forma a obter três diferentes medições dos raios dos halos de inibição, calculando-se assim a média e o desvio padrão de cada halo (Figura 12 e Figura 13) ⁽¹³⁵⁾.

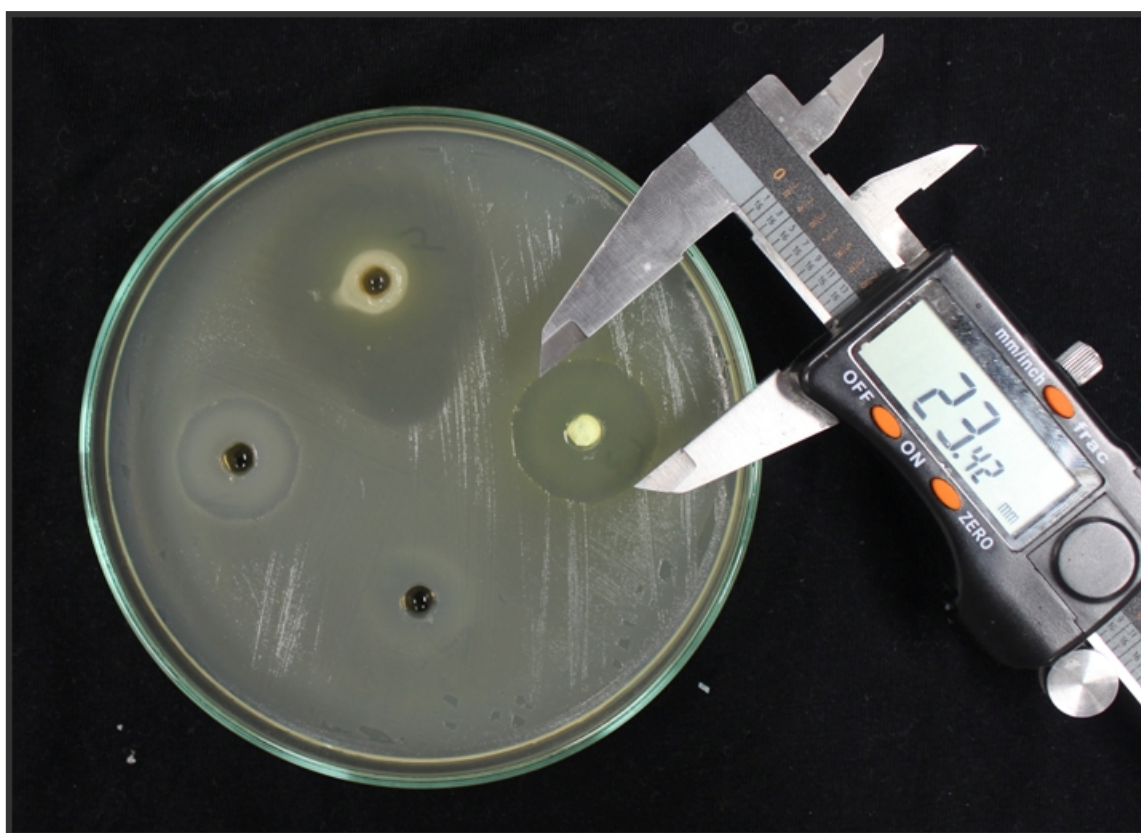


Figura 12 - Medição dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento de *E. faecalis* quando em contato com os diferentes tipos de medicações manipuladas.

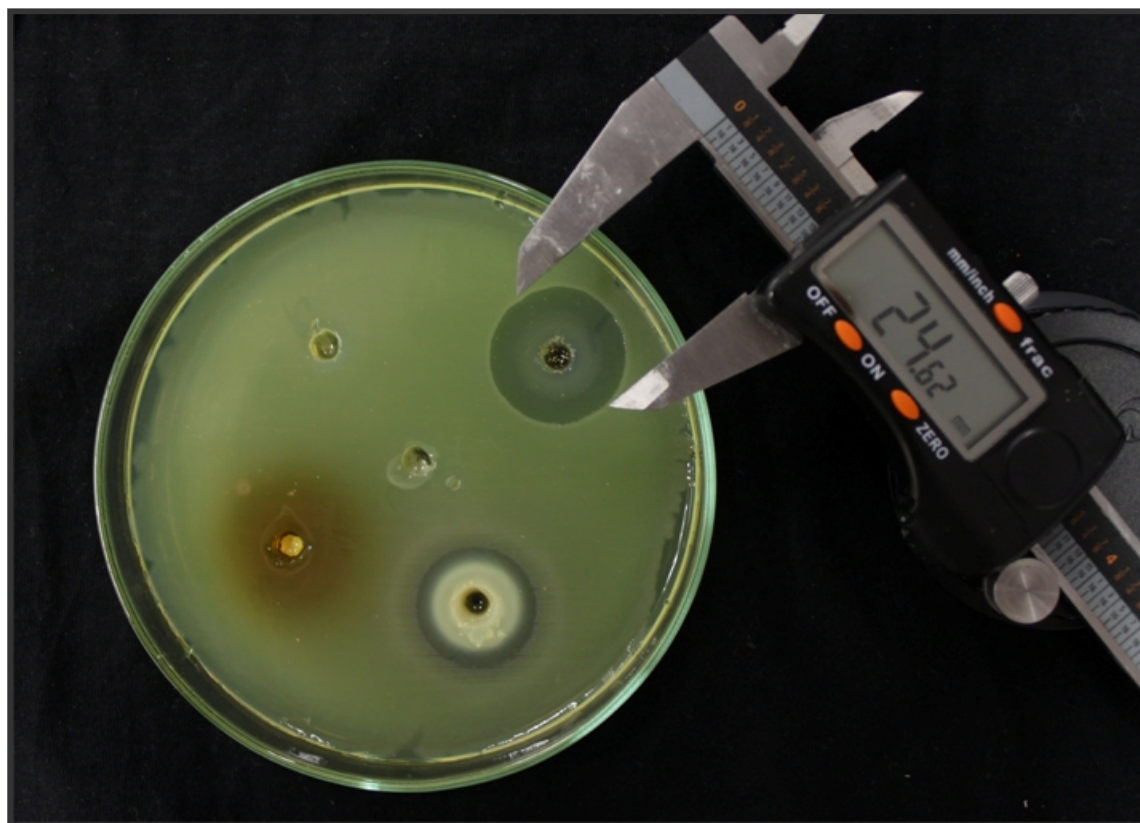


Figura 13 - Medição dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento de cada microrganismo para os diferentes tipos de medicações manipuladas.

4.4.2 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO ATRAVÉS DO MÉTODO CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).

Preparação das suspensões de microrganismos referidas em 4.4.1 e de 50g de cada medicação intracanal sob a forma de solução, seguindo o protocolo descrito em 4.3.1, mas substituindo o gel base por água destilada.

O processo de microdiluição foi baseado nas normas do NCCSL ⁽¹³⁷⁾. Este processo iniciou-se com uma diluição de 1:2 a 0,01 g/mL no caso da solução de CHX, e de 0,015 g/mL no caso da NIT e DX, até uma diluição de 1:1024 com as concentrações de $1,95 \times 10^{-5}$ g/mL e $2,93 \times 10^{-5}$ g/mL respectivamente.

Em cada microplaca estéril de 96 poços, inclusive nas placas com CHX (controle positivo das medicações), deixou-se uma coluna de controle positivo (bactéria com caldo MH) e uma coluna controle negativo (contendo só caldo MH).

Em cada poço foram colocados: 170 μL de caldo MH, 10 μL da suspensão de bactéria e 20 μL de medicação (Figura 14) ⁽¹³⁷⁾.

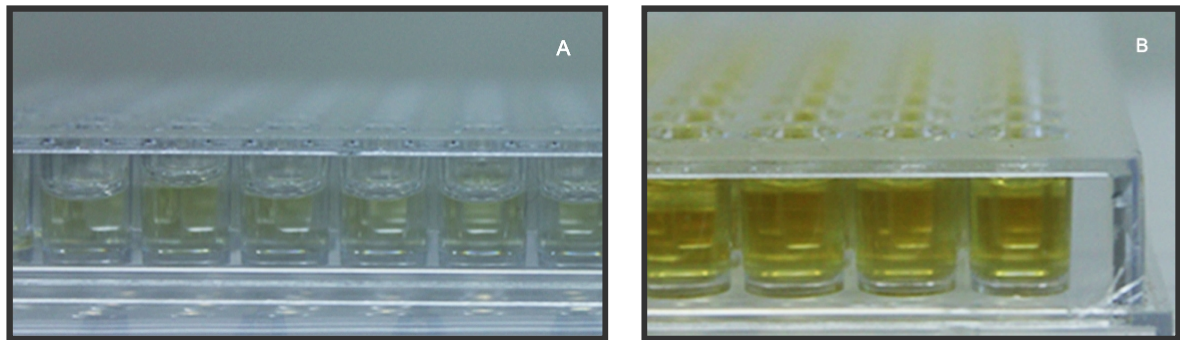


Figura 14 – Método da CIM: (A,B) através da diluição da concentração da medicação com caldo de MH e suspensão de bactéria.

Antes da incubação selaram-se as placas com tampa de plástico bem adaptada e com uma fita aderente de plástico para evitar a secagem. Em seguida as placas foram incubadas a 36°C durante 24h ⁽¹³⁷⁾.

Após o período de incubação, fez-se a leitura do CIM visualmente. Do último poço sem turvação foram recolhidos 100 μL da suspensão e semeados numa placa de MH com o auxílio de uma zaragatoa. A incubação foi feita a 36°C durante 24h para verificar o crescimento, ou não, de UFC.

4.5 SEGUNDA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL

4.5.1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DIFUSÃO DA MEDICAÇÃO INTRACANAL ATRAVÉS DOS TÚBULOS DENTINÁRIOS

PREPARAÇÃO DOS DENTES

Todos os procedimentos foram realizados por um mesmo operador previamente treinado, antes e durante a execução do estudo piloto.

Para garantir a existência apenas de um canal, radiografaram-se todos os espécimes através de um sistema analógico de raio-x (*Dabi Atlante, spectro 70, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil*).

Parâmetros do raio-x:

Película intraoral - Dental Intraoral E-Speed Film, Kodak (*Nova York, Estados Unidos da América (EUA)*); distância foco filme 30 cm (Figura 15); tempo de exposição usado para pesquisa 0,20 segundos; incidências radiográficas nos sentidos méso-distal e vestibulo-lingual (Figura 16 – A,B). Películas reveladas numa processadora automática da marca Revell (*Vila Moraes, São Paulo, Brasil*), com temperatura entre os 28° e os 30°C e o tempo de processamento das periapicais entre 2-3 min (Figura 16 – C, Figura 17) ^(16, 126).



Figura 15 – Distância foco-filme (30 cm).

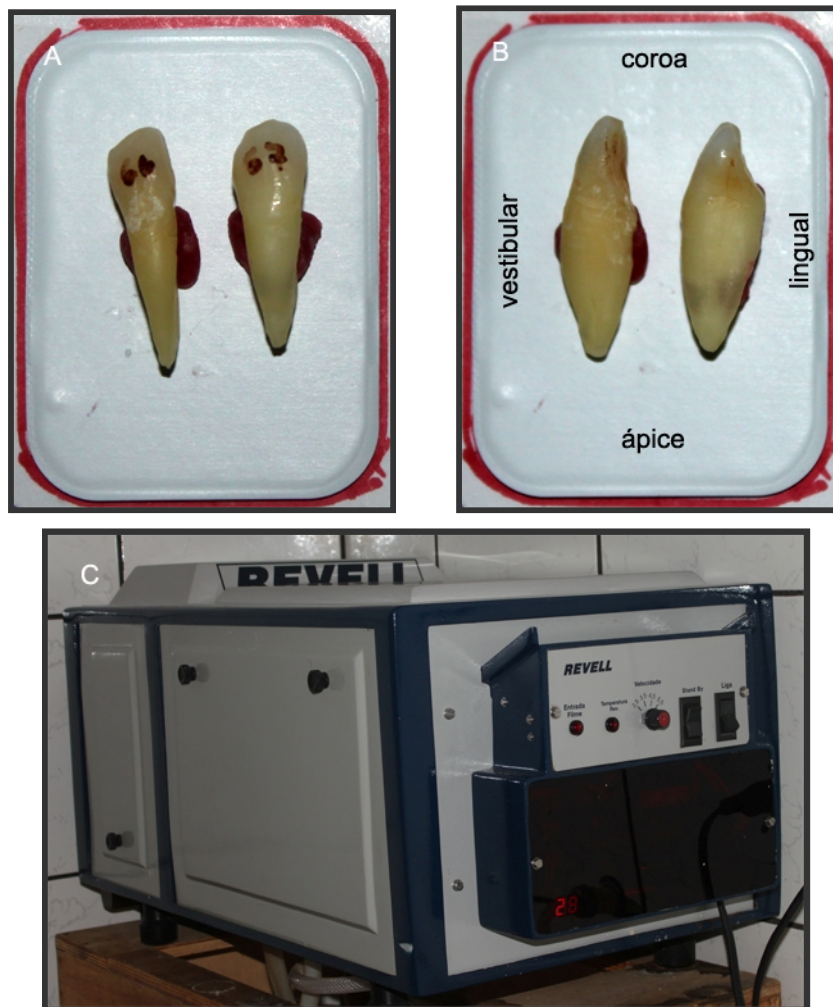


Figura 16 - Procedimento radiológico: (A,B) posicionamento dos espécimes dentários nas películas radiográficas; (C) processadora automática das películas radiográficas.

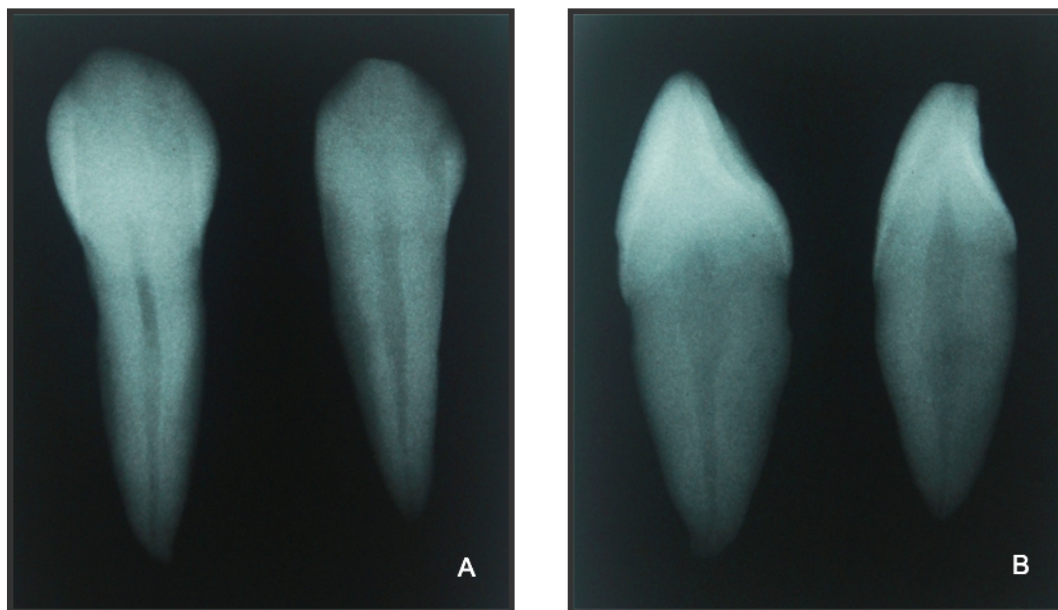
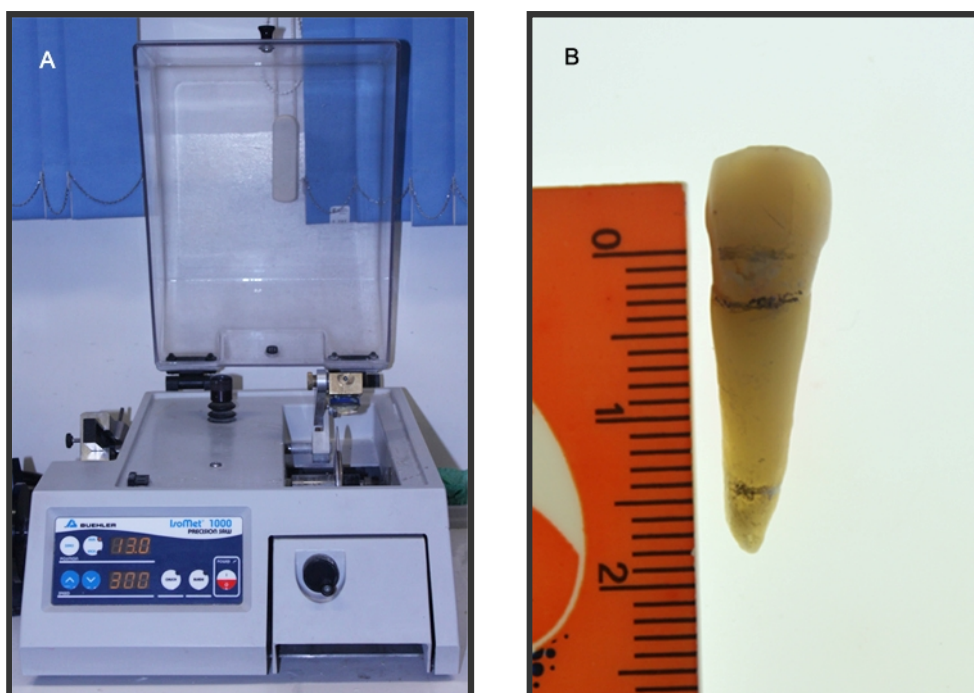


Figura 17 - Incidências radiográficas dos caninos: (A) vestibulo lingual e (B) mesio distal.

Para que os espécimes perfizessem 15 mm de comprimento, a cada dente foi removida a coroa a 3 mm da junção amelo cementária permitindo acesso direto ao canal, e a porção apical da raiz a 12 mm da junção amelo cementária. Foi usada uma máquina de corte (*Isomet 1000, Buehler, Ltda, Lake Bluff, Illinois (IL), EUA*), com um disco diamantado (#7020, *KG Sorensen, Barueri, São Paulo, Brasil*), sob velocidade de 300 rpm e refrigeração constante com água (Figura 18) ⁽¹³⁸⁾.



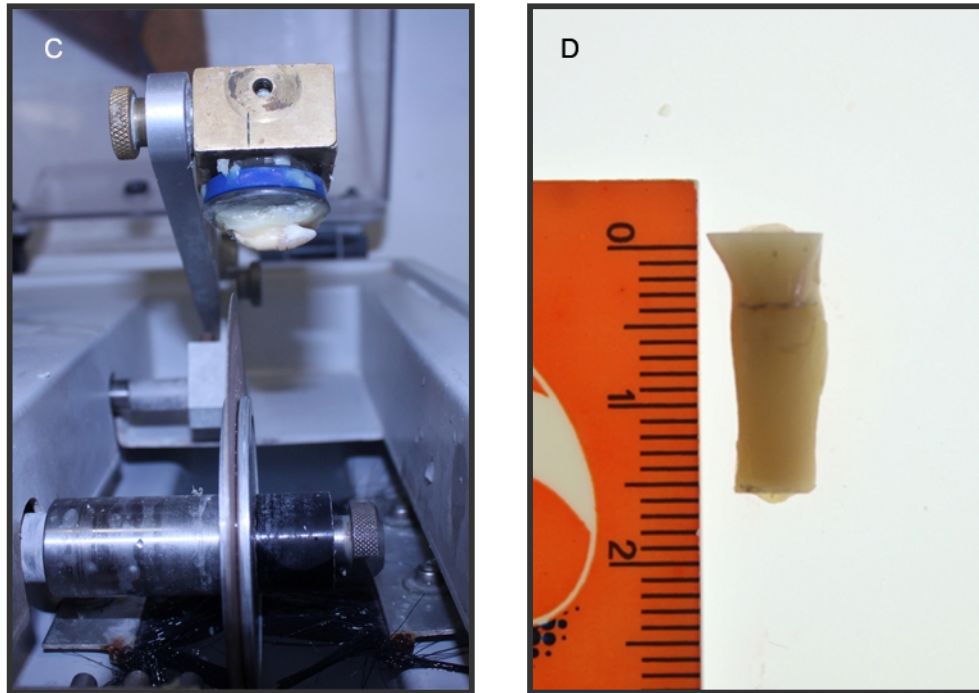


Figura 18 - Procedimento de corte dos espécimes dentários: (A) máquina de corte com disco diamantado; (B) medição dos espécimes dentários; (C) corte dos espécimes; (D) aspecto final dos espécimes dentários.

As superfícies externas das raízes foram limpas de tecidos moles e de resíduos utilizando-se curetas periodontais (*Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA*) e água corrente, de modo a não danificar a superfície radicular. Com uma lupa graduada, inspecionou-se a existência de fraturas e/ou fissuras ^(139, 140).

O acesso estandardizado foi executado por oclusal, usando uma turbina de alta velocidade com refrigeração de água e uma broca endo Z (*Dentsply® Maillefer Instruments, Baillaigues, Switzerland*) para sua uniformização (Figura 19 – A) ^(139, 140). Retificou-se visualmente o comprimento de trabalho (CT), introduzindo-se uma lima 10K (*Dentsply® Maillefer, Baillaigues, Switzerland*) até esta aparecer ao nível apical. O CT foi estabelecido subtraindo 1mm ao comprimento estandardizado, ficando padronizado nos 14mm ^(59, 126).

Para facilitar a irrigação fez-se a preparação cervical com brocas de Gates nº 2 e 3 (*Dentsply® Maillefer, Baillaigues, Switzerland*), introduzindo a nº 2 no canal até aos 10mm e a nº 3 com um recuo de 1 mm (Figura 19 – B).

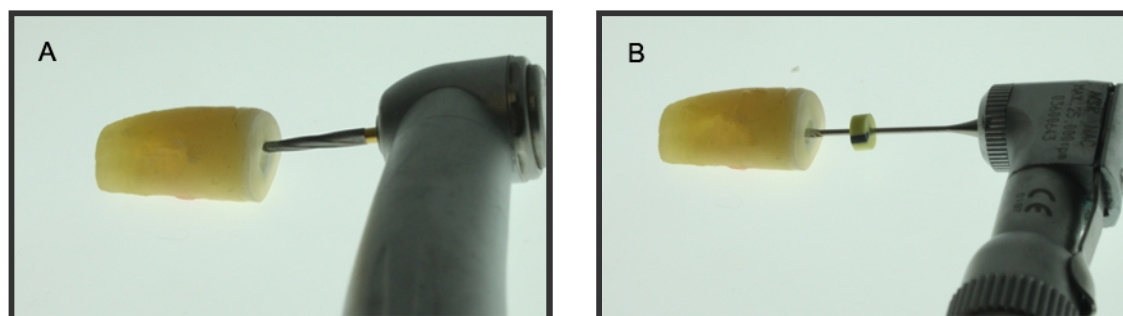


Figura 19 - Estandarização da cavidade de acesso: (A) uniformização da cavidade com turbina e broca endo Z; (B) preparação cervical com brocas Gates nº 2 e 3.

O diâmetro apical foi determinado para que houvesse uma constituição de grupos o mais homogêneo possível. Usaram-se limas K manuais, começando com uma lima 10K inserida até ao CT. Aumentou-se progressivamente o número das limas até se encontrar um instrumento que ficasse bem adaptado no CT. O número da lima selecionada, instrumento anatómico (IA), foi registada para cada dente ⁽¹⁴¹⁾.

GRUPOS EXPERIMENTAIS

As raízes foram divididas em 5 grupos, 2 grupos de controlo de n=10 e 3 grupos experimentais, também, de n=10 (Tabela 2).

Tabela 2 – Divisão dos espécimes pelos diferentes grupos experimentais.

DIÂMETRO ANATÓMICO	GRUPOS EXPERIMENTAIS				
	Controlo Negativo (SM)	Controlo positivo (CHX)	PC	NIT	DX
15	1	1	1	1	1
20	1	1	1	1	1
25	2	2	2	2	2
30	2	2	2	2	2
35	2	2	2	2	2
45	1	1	1	1	1
55	1	1	1	1	1
Total	10	10	10	10	10

Técnica Híbrida de instrumentação⁽¹⁴²⁾

De seguida procedeu-se à instrumentação dos cinquenta dentes segundo a técnica manual normalizada, usando os princípios da técnica de *crown-down*, combinando as brocas Gates-Glidden (*Dentsply® Maillefer, Baillaigues, Switzerland*) com as limas K (*Dentsply® Maillefer, Baillaigues, Switzerland*). Os primeiros dois terços cervicais dos canais, 10 mm, foram inicialmente preparados com limas K (*Dentsply® Maillefer, Baillaigues, Switzerland*), a partir da lima #25 até à #35. Posteriormente, foram usadas brocas Gates-Glidden nº 2 e nº 3 (*Dentsply® Maillefer, Baillaigues, Switzerland*), utilizando a primeira com 10mm e a segunda com um recuo de 1 mm. Entre cada lima e broca utilizou-se uma lima K #10, com um comprimento de 15 mm, como lima de recapitulação e com o intuito de manter a patência.

A instrumentação do terço apical iniciou-se a partir do IA, progredindo usando as três limas consecutivas acima deste IA (Figura 20). Cada instrumento foi intercalado com uma lima que passará 1 mm além do apex, sendo esta mais fina e dois números abaixo do IA (lima de patência).

Por exemplo, considerando IA= K #25, a instrumentação será efetuada até à lima K #40 ao longo de todo o comprimento do canal (CT) e, entre cada uma delas, será usada a lima K #15, como lima de patência^(75, 142).

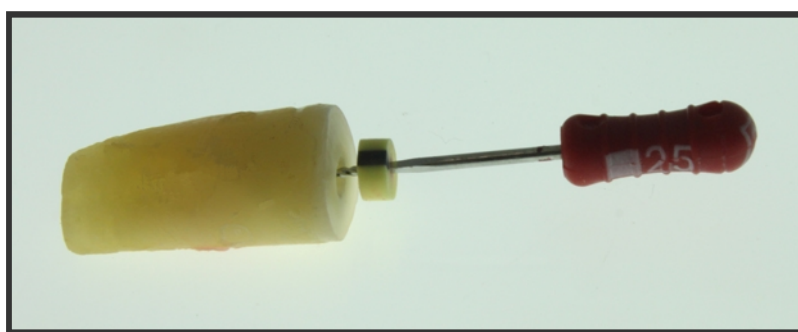


Figura 20 – Espécime dentário com instrumento anatómico (IA) K #25.

Após esta instrumentação e considerando a última lima usada ao longo do CT, realizou-se a técnica *step back* com recurso às três limas seguintes, recuando em cada uma 1mm. A recapitulação fez-se com a última lima que foi até ao CT e a patência manteve-se com a lima mais fina⁽¹⁴²⁾.

Retomando o exemplo anterior, sendo a última lima usada a K #40 para o CT (14 mm), recorrer-se-á às limas K #45 (13 mm), K #50 (12 mm) e K #55 (11 mm), para a realização da técnica de *step-back*. A lima de recapitulação será K #40 a 14 mm e a lima de patência K #15 a 15 mm (Figura 21).

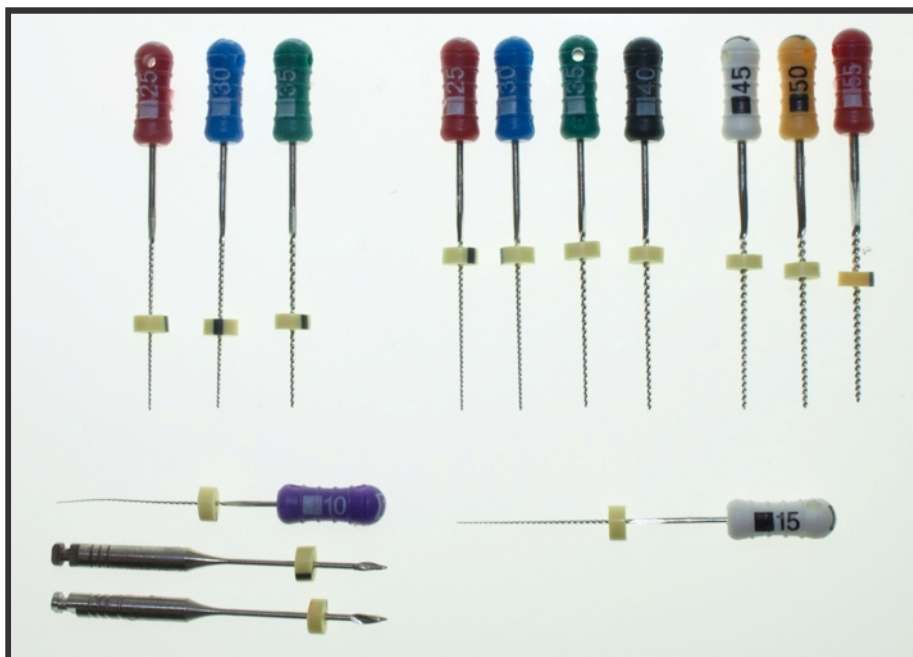


Figura 21 – Sequência de limas e brocas usadas na preparação química e mecânica dos espécimes dentários.

Durante toda a instrumentação os dentes foram mantidos em gazes humedecidas com solução salina, para evitar a desidratação.

IRRIGAÇÃO DOS CANAIS RADICULARES

No decorrer do preparo químico e mecânico foi feita a irrigação dos canais em cada grupo experimental.

A irrigação dos canais executou-se entre cada lima com 1mL de NaClO a 5,25%. No final da preparação irrigou-se com 5mL de EDTA a 17% mantendo o contacto deste com a parede do canal durante 3 minutos, seguido de 1mL de NaClO a 5,25%, para a remoção da *smear layer* residual, tecidos pulpare, raspas dentinárias e outros

resíduos. A última irrigação fez-se com 5mL de soro fisiológico (SF) (Figura 22) ^(16, 103).

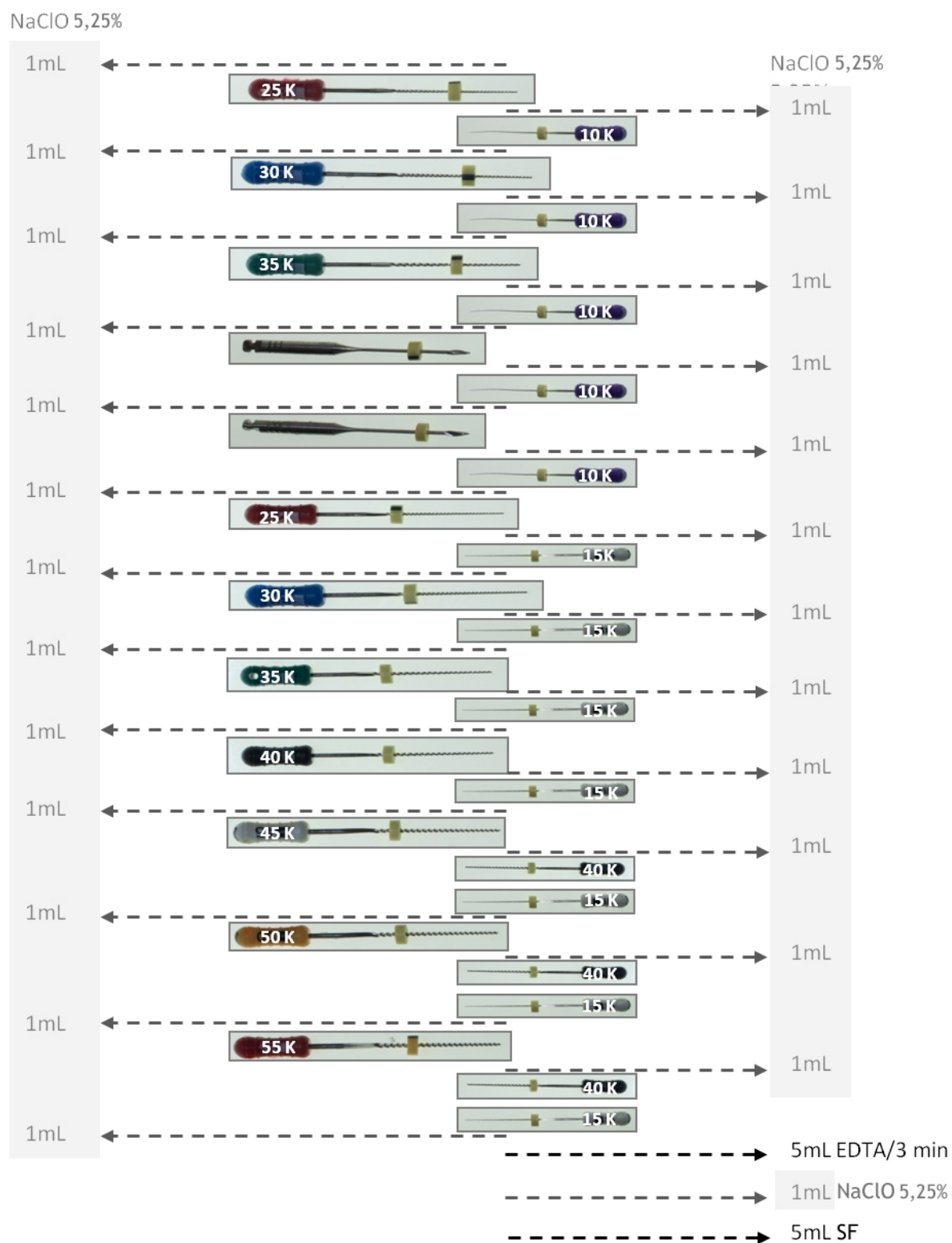


Figura 22 – Esquema da irrigação dos espécimes durante a preparação química e mecânica com a técnica híbrida.

ESTERILIZAÇÃO DOS ESPÉCIMES

Os diversos espécimes foram colocados individualmente em tubos de ensaio contendo 5mL de caldo de BHI e autoclavados (*Autoclave – ALPHA*) durante 30 min a 121°C e à pressão de 1 atm (Figura 23) ⁽¹⁴³⁾.

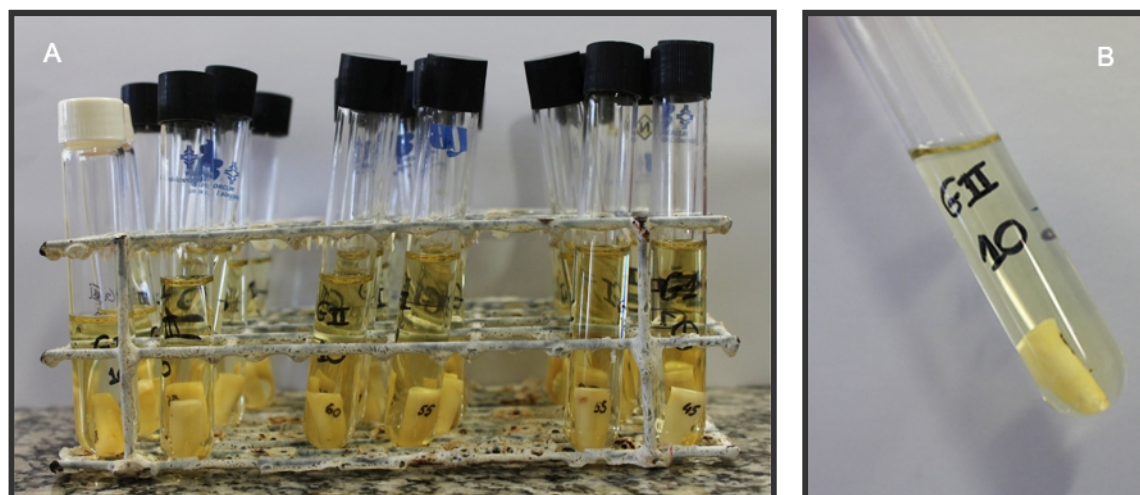


Figura 23 - Esterilização dos espécimes dentários: (A,B) tubos de ensaio com caldo de BHI.

Após a autoclavagem, e para comprovar a esterilização dos espécimes, foram incubados a 36°C durante 48h ⁽¹⁴⁴⁾.

DIFUSÃO DAS MEDICAÇÕES INTRACANAIS ATRAVÉS DOS TÚBULOS DENTINÁRIOS

Preparação e inoculação da suspensão bacteriana de *E. faecalis* de acordo com a metodologia apresentada em 4.4.1 ⁽¹⁴³⁾.

Os canais radiculares dos 50 dentes foram preenchidos com as várias medicações intracanal em câmara de fluxo laminar, com uma seringa e agulha até ao extravasamento do material, respeitando os grupos experimentais. O *forâmen* apical e a parte coronal dos espécimes dentários foram selados com cera *utility (Coltène® Whaledent, Langenau, Germany)* devidamente esterilizada, depois de removidos os excessos da medicação das extremidades.

Os dentes foram colocados sobre as placas com o meio de MH. Estas foram deixadas durante 2 horas à temperatura ambiente para permitir a difusão dos agentes através dos túbulos dentinários e através do agar. Seguidamente, incubou-se à temperatura de 36°C e atmosfera de 10% de CO₂, durante 48h ⁽¹⁴³⁾.

Após o período de incubação, foram medidas e registadas as várias zonas de inibição de crescimento microbiano, recorrendo a um paquímetro digital (*Digimess, São Paulo, Brasil*) e a uma fonte de luz refletida (Figura 24).

Foi considerada como zona inibitória, a menor distância (mm) desde a margem externa da raiz até ao ponto onde se verifica o início do crescimento bacteriano ⁽¹⁴³⁾.



Figura 24 - Determinação das zonas de inibição de crescimento microbiano de cada microrganismo, quando em contato com os diferentes tipos de medicações intracanal.

4.6 TERCEIRA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL

4.6.1 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO EM DENTINA INFETADA

ESTERILIZAÇÃO DOS ESPÉCIMES

Os espécimes foram colocados individualmente em tubos de ensaio contendo 5mL de caldo de BHI, de acordo com os grupos experimentais preparados em 4.5.1 (Tabela 3). Posteriormente, esses tubos foram autoclavados (*Autoclave – ALPHA*) durante 30 min, a 121°C e à pressão de 1 atm ⁽¹⁴³⁾.

Tabela 3 – Divisão dos dentes pelos diferentes grupos experimentais.

DIÂMETRO ANATÓMICO	GRUPOS EXPERIMENTAIS		
	Controlo Negativo (SM)	Controlo Positivo (CHX)	DX
15	1	1	1
20	1	1	1
25	2	2	2
30	2	2	2
35	2	2	2
45	1	1	1
55	1	1	1
Total	10	10	10

Após a autoclavagem e para comprovar a esterilização, os espécimes foram incubados a 36°C durante 48h ⁽¹⁴⁴⁾.

CONTAMINAÇÃO DOS CANAIS RADICULARES

Segundo o protocolo descrito em 4.4.1 fez-se a cultura e a preparação de uma suspensão de *E. faecalis* na concentração equivalente a 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A morfologia foi confirmada usando o método Gram e um microscópio ótico em aumento de 1000X ⁽⁷⁶⁾.

Em cada tubo de ensaio colocou-se um espécime dentário e 5mL de caldo BHI, onde foram inoculados 2mL da suspensão de *E. faecalis*. No total foram contaminados 30 espécimes dentários, nos seus respectivos tubos de ensaio (Figura 25). Estes tubos foram homogeneizados num agitador de tubos vortex (*Quimis Q220A, Diadema, São Paulo, Brasil*) (Figura 26) ^(76, 103).

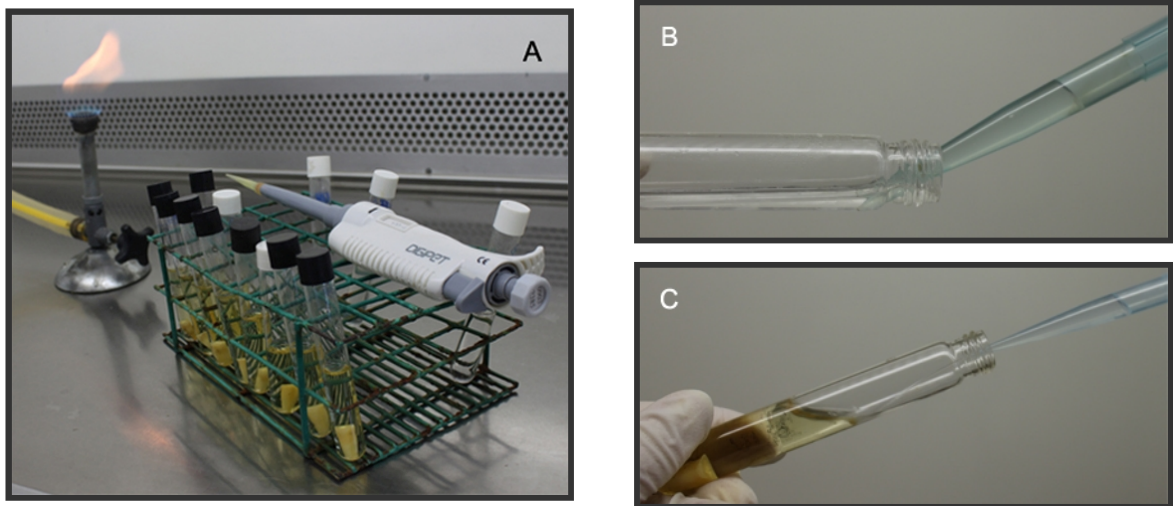


Figura 25 – Contaminação dos espécimes dentários: (A) material utilizado durante o procedimento; (B) recolha da suspensão de *E. faecalis*; (C) inoculação da suspensão de *E. faecalis* nos tubos de ensaio com os espécimes esterilizados.

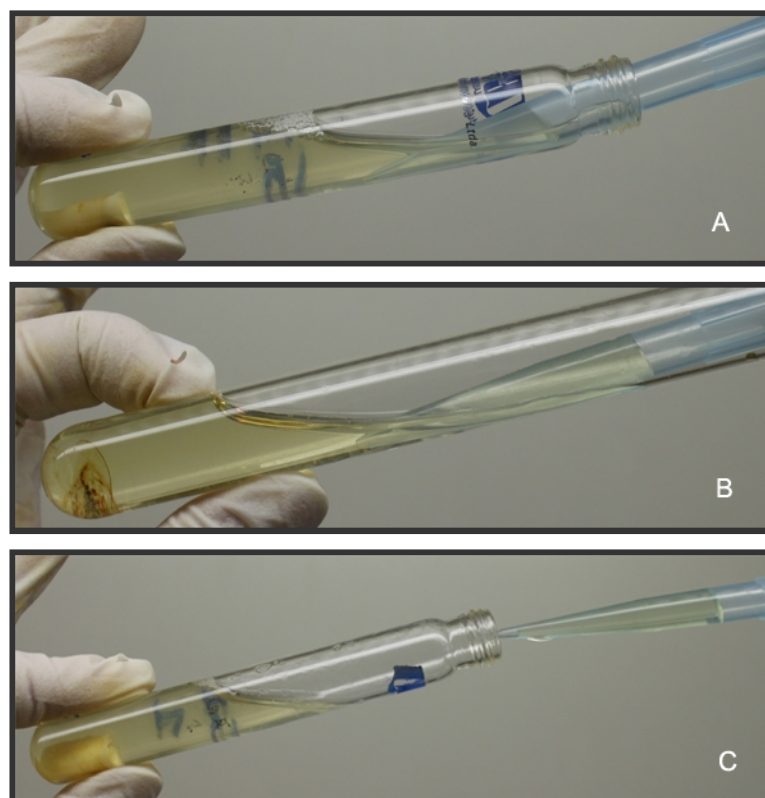


Figura 26 - Protocolo para evitar saturação do meio: (A) substituição de caldo contaminado (B,C) por caldo fresco de BHI.

1º COLHEITA (S1) E MEDICAÇÃO INTRACANAL

Após este período, e sempre trabalhando no interior da câmara de fluxo laminar, os espécimes foram colocados numa plataforma de aço inoxidável estéril (*Procind Mecânica e Instalações Industriais Ltda, Piracicaba, São Paulo, Brasil*) (Figura 27 – A), onde se fez a irrigação dos canais radiculares com 1 mL de SF (Figura 27 – B). Os canais foram secos com 2 pontas de papel estéreis (*Dentsply® Maillefer, Baillaigues, Switzerland*) durante 3 segundos de forma a remover apenas o excesso de humidade, sem os secar na totalidade. As pontas de papel foram calibradas de acordo com a última lima usada no CT (14mm). Depois do canal estar relativamente seco, introduziu-se um terceiro cone igual aos anteriores, movimentando-o contra as paredes durante 60 segundos (Figura 27 – C,D) ^(66, 76), para efetuar a colheita da amostra bacteriana.

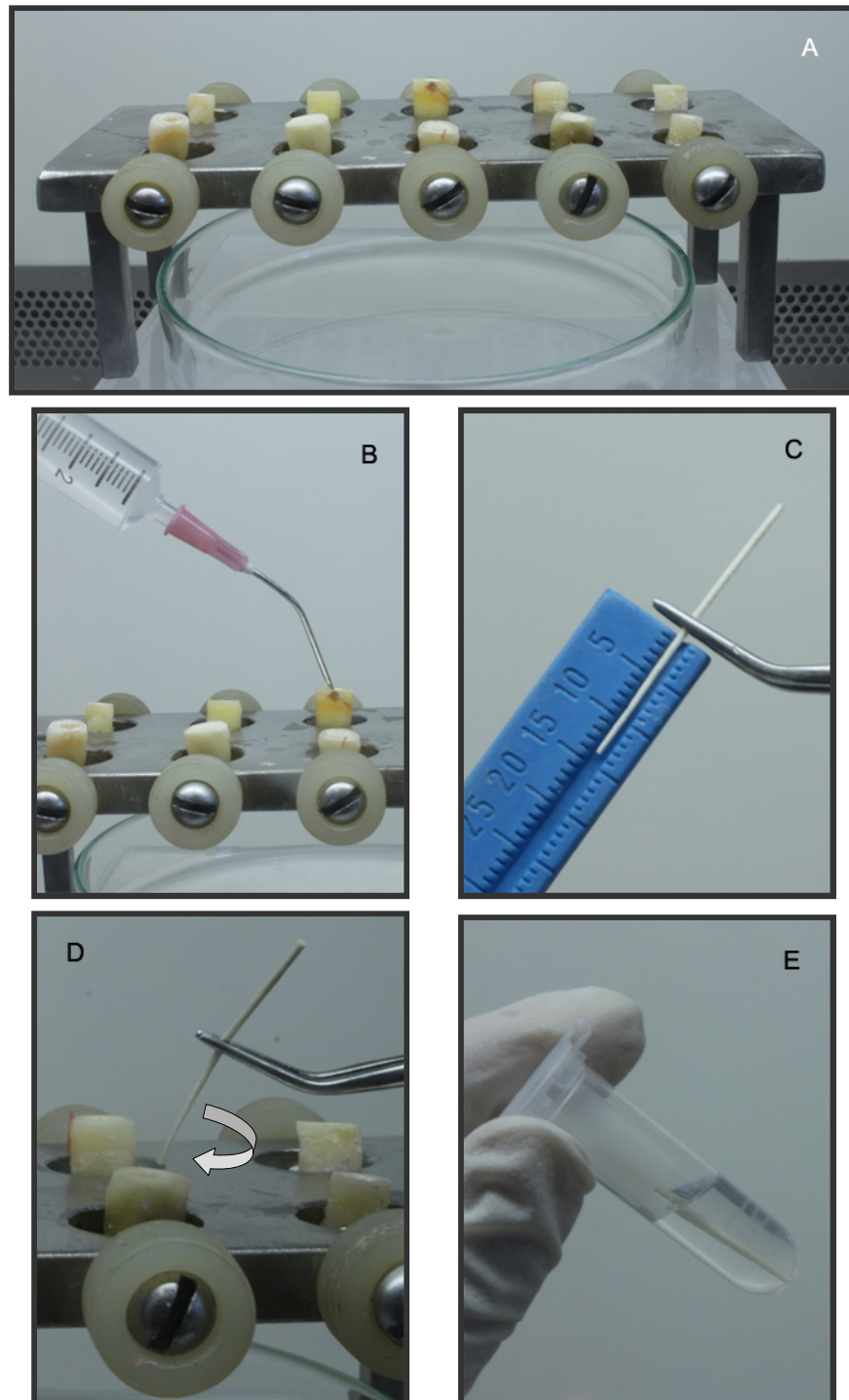


Figura 27 - Protocolo da primeira colheita após 21 dias de contaminação: (A) colocação dos espécimes dentários na plataforma de aço inoxidável estéril; (B) irrigação com SF; (C) calibração do cone de papel; (D) cone de papel introduzido ao longo do CT com movimentos circulares contra as paredes do canal; (E) colocação da amostra bacteriana num *eppendorf* estéril com solução salina.

De seguida, o terceiro cone foi transferido para tubos estéreis, tipo *ependorf*, contendo 1 mL de solução salina (Figura 27 – E). Depois de agitados durante 1 min num aparelho vortex (*Quimis® Q220A, Diadema, São Paulo, Brasil*), as suspensões foram diluídas em série 1/10, 1/100 em solução salina estéril. 100 µL de cada diluição foram semeados em triplicado em placas de agar BHI (Figura 28) e incubadas numa estufa de CO₂, a 36°C durante 48h.

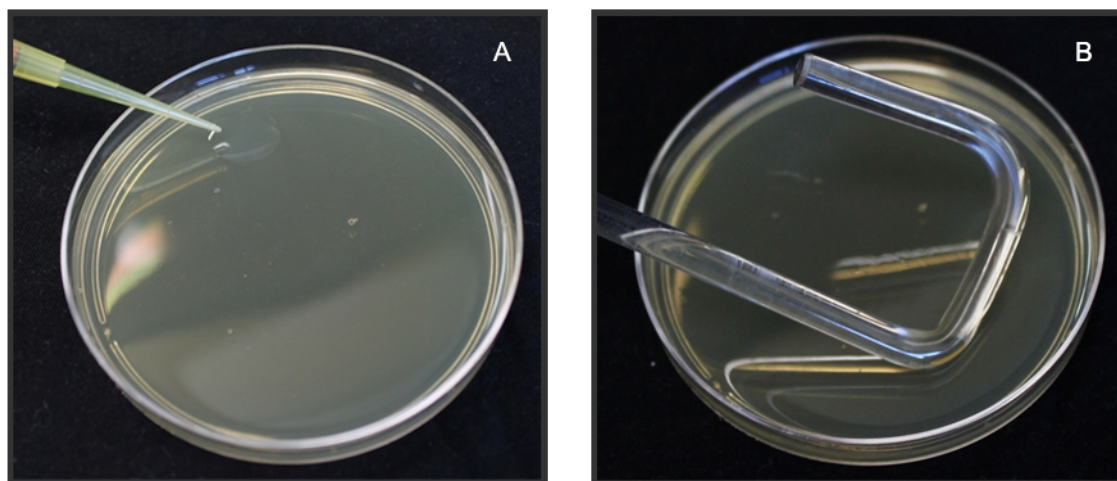


Figura 28 – (A) Sementeira das diluições em placas de agar BHI, (B) espalhamento com alças de *drigalski*.

Após as 48h, procedeu-se à contagem do número de UFC existentes nas placas, determinando assim concentração inicial de *E. faecalis*.

Com as raízes fixadas no suporte metálico, fez-se o preenchimento dos canais radiculares com a respetiva medicação:

- *Controlo negativo: sem medicação (SM),*
- *Controlo positivo: gel de clorhexidina 2% (CHX),*
- *Grupo experimental: gel com doxiciclina 3% (DX).*

Esta aplicação foi efetuada em câmara de fluxo laminar, com uma seringa e agulha até ao extravasamento do material (Figura 29). Após remoção do excesso da medicação, tanto os orifícios de entrada do canal como o apex foram selados com

cera *utility* (Coltène® Whaledent, Germany), previamente autoclavada (Autoclave – ALPHA) durante 30 min a 121°C e à pressão de 1 atm.

Depois do preenchimento e selamento dos canais, os espécimes fixaram-se em placas de 24 poços de fundo plano (*Coming Cell Culture, Coming, EUA*) com a ajuda da cera *utility* (Coltène® Whaledent, Germany) previamente esterilizada.

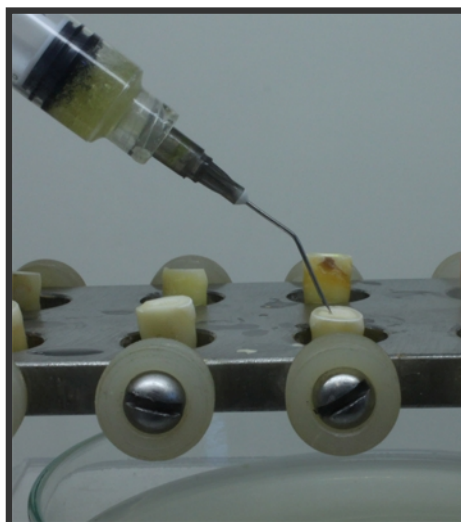


Figura 29 – Aplicação das diferentes medicações intracanal.

Os poços foram preenchidos com caldo BHI até à linha amelo cementária dos espécimes (Figura 30) e em seguida colocou-se uma gaze humedecida com SF por cima dos espécimes. Tapou e vedou-se a placa para então ser levada à estufa a uma temperatura de 36°C durante 14 dias ⁽⁷⁶⁾.

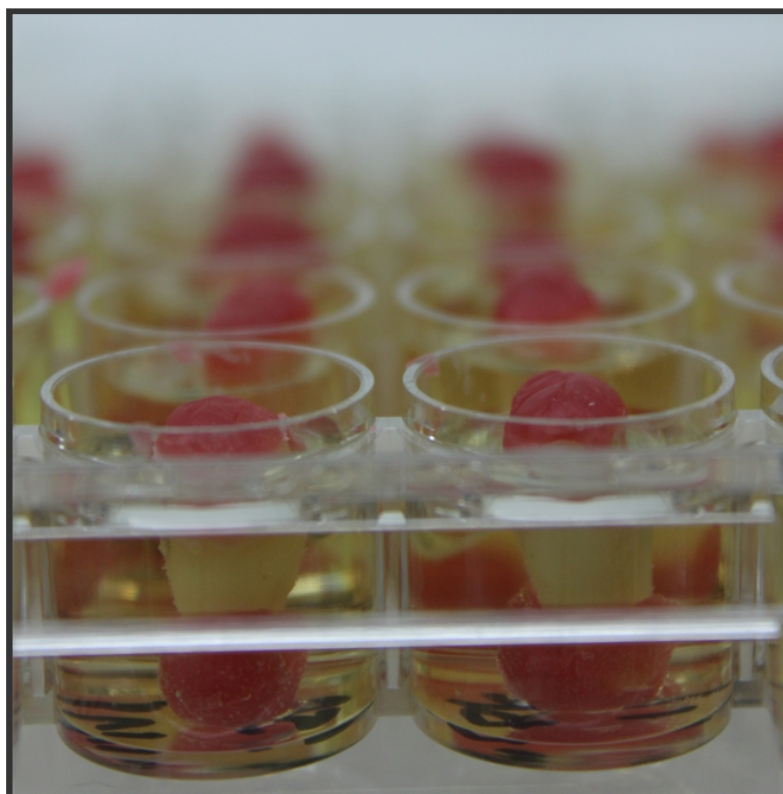


Figura 30 - Preparação dos espécimes dentários para a incubação após S1: placas de 24 poços com os espécimes fixados e selados; poços preenchidos com caldo BHI.

2º COLHEITA (S2) APÓS MAIS 14 DIAS

No final do período de incubação, trabalhando dentro do fluxo laminar, as raízes foram colocadas novamente no suporte de aço inoxidável previamente esterilizado. Fez-se então a sequência de irrigação: SF (1mL), solução neutralizante (1mL) durante 1min e novamente SF (1mL) (Figura 31).

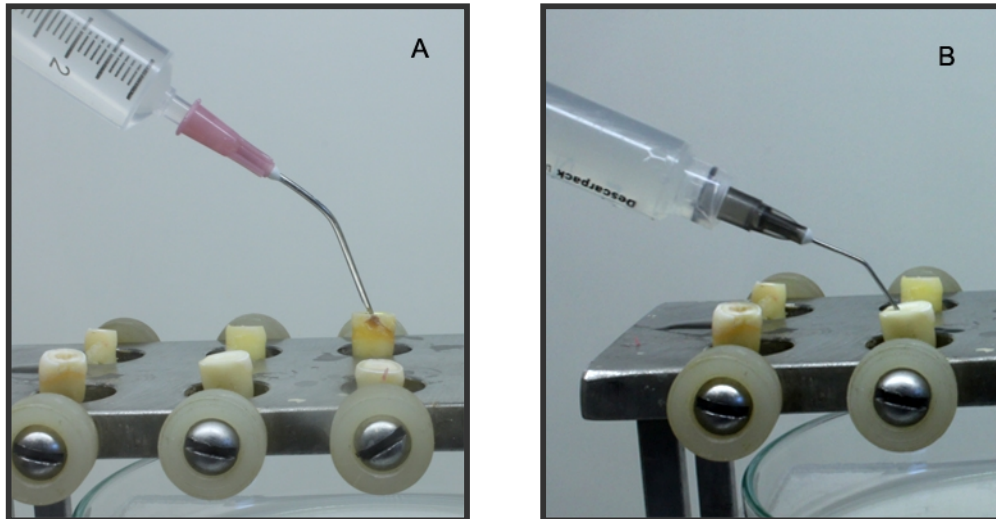


Figura 31 – (A) Irrigação dos espécimes dentários com SF e (B) com solução neutralizante.

Esta irrigação teve como objetivo minimizar as interferências pós tratamento destas substâncias químicas e, assim, evitar falsos negativos nos meios de cultura ⁽¹³⁵⁾.

Em seguida fez-se uma nova colheita (S2) com cones de papel esterilizados, seguindo os procedimentos explicados em S1.

Os cones foram transferidos para os *ependorf* estéreis contendo 1mL de solução salina e colocados durante 1 min num agitador de tubos vortex (*Quimis® Q220A, Diadema, São Paulo, Brasil*). Apenas para o Grupo SM as suspensões foram diluídas 1/10 em solução salina estéril. Para os Grupos CHX e DX semeou-se 100 μ L da solução mãe; para o Grupo SM, para além de 100 μ L da solução mãe, semeou-se o mesmo volume da diluição 10^{-1} . Todas elas foram semeadas em triplicatas, em placas de agar BHI e incubadas numa estufa de CO₂, a 36°C durante 48h; após a qual foi feita a contagem de UFC.

No final da colheita as raízes foram colocadas em novas placas de 24 poços estéreis, devidamente seladas com cera *utility* (*Coltène® Whaledent, Germany*) previamente esterilizada. Nos poços e no interior do canal colocou-se caldo BHI, de forma a mantê-lo húmido (Figura 32). As placas, depois de devidamente seladas, foram deixadas na estufa a uma temperatura de 36°C durante 7 dias. Com esta

cultura pretendeu-se verificar a existência, ou não, de *E. faecalis* no interior dos canalículos.

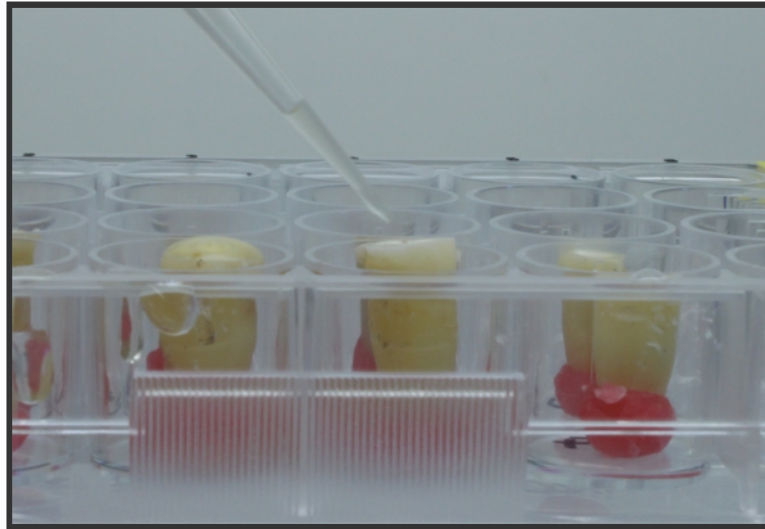


Figura 32 – Colocação de caldo de BHI no interior dos canais.

3º COLHEITA (S3) APÓS MAIS 7 DIAS

Após este novo período de incubação, e na plataforma metálica previamente esterilizada, foi feita nova irrigação dos canais com 1mL de SF, seguindo-se a nova colheita (S3) de acordo com os procedimentos usados em S2.

Foram contadas as UFC de *E. faecalis* e assim determinada a concentração.

A pureza das culturas foi confirmada através da morfologia das colónias e coloração de Gram.

4.7 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

O estudo estatístico foi efetuado com recurso ao *software* de tratamento estatístico de dados IBM-SPSS, versão 19.0.

Primeiramente procedeu-se a uma análise descritiva de todas as variáveis em estudo. Foram, assim, calculadas as médias e os desvios-padrão das variáveis numéricas e as frequências e percentagens das variáveis categoriais ⁽¹⁴⁵⁾. Recorreu-se também a gráficos de barras e gráficos Bloxplot.

Na análise inferencial comparativa assumiram-se como diferenças estatisticamente significativas aquelas em que o valor de probabilidade associado (p) ao teste estatístico possuía um valor de pelo menos 0.05 ⁽¹⁴⁶⁾.

No cruzamento transversal de variáveis numéricas com uma variável independente constituída por cinco grupos com um número de efetivos de dez elementos, optou-se pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Na comparação das diferenças estatisticamente significativas entre os grupos efetuaram-se testes *post-hoc* recorrendo ao teste de Tamhane's T2 por se tratar de um teste conservativo e assumir diferenças nas variâncias dos grupos ⁽¹⁴⁷⁾.

No cruzamento longitudinal das diferenças de uma variável em três pontos no tempo em função de uma variável categorial (grupos experimentais) considerou-se a aplicação de uma Anova de medidas repetidas onde se atendeu a teste intra-sujeitos (*within subject*) e entre grupos (*between subjects*) ⁽¹⁴⁸⁾. Na aplicação desta técnica observou-se em todas as análises a existência de esfericidade, através do teste de Mauchly, e caso esta não pudesse ser assumida considerou-se a correção aos graus de liberdade proposta por *Greenhouse and Geiser* considerada como a abordagem mais restritiva ⁽¹⁴⁶⁾. Apesar do número de casos por grupo ser relativamente reduzido, este encontra-se acima do ponto de corte referido na literatura ($n=10$) para aplicação de testes paramétricos em *designs* longitudinais,

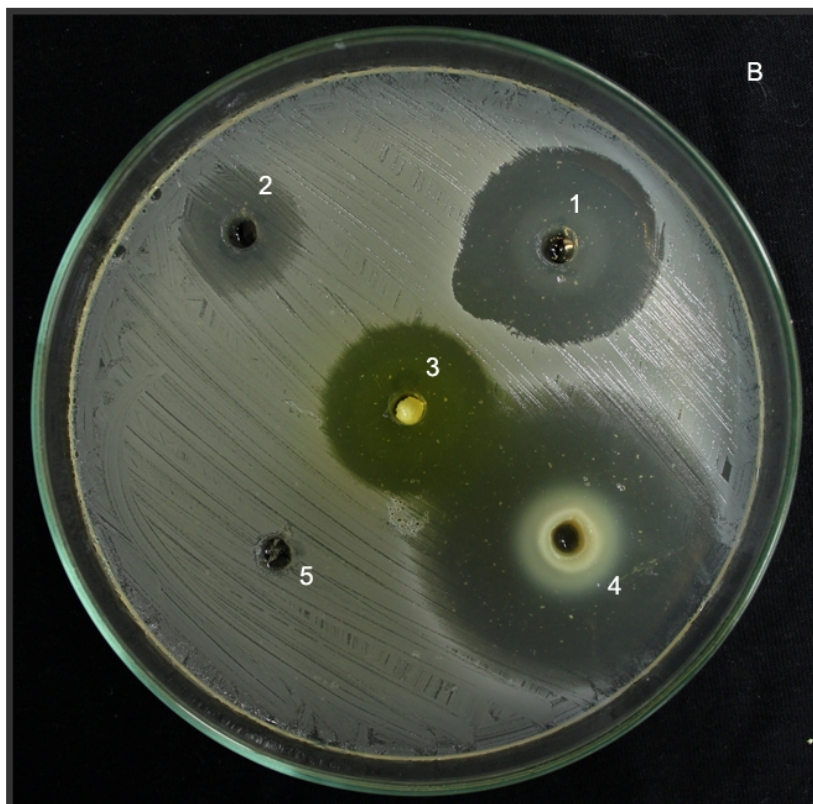
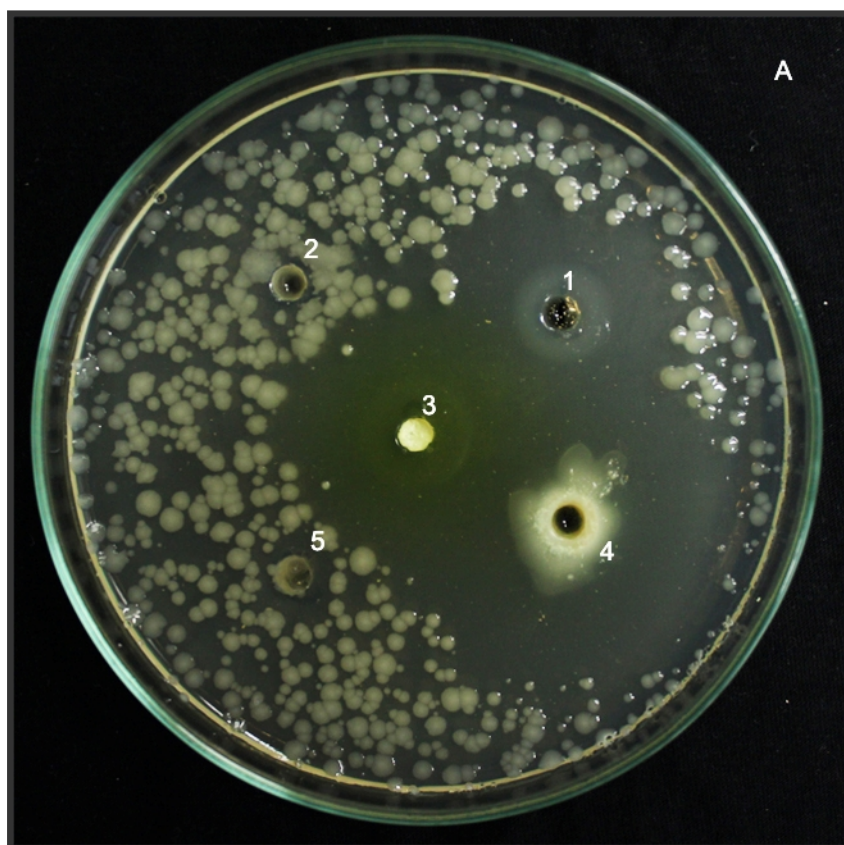
dados que estes não necessitam de amostras do tamanho das apontadas para os estudos transversais, isto porque se espera uma variabilidade inferior ⁽¹⁴⁹⁾.

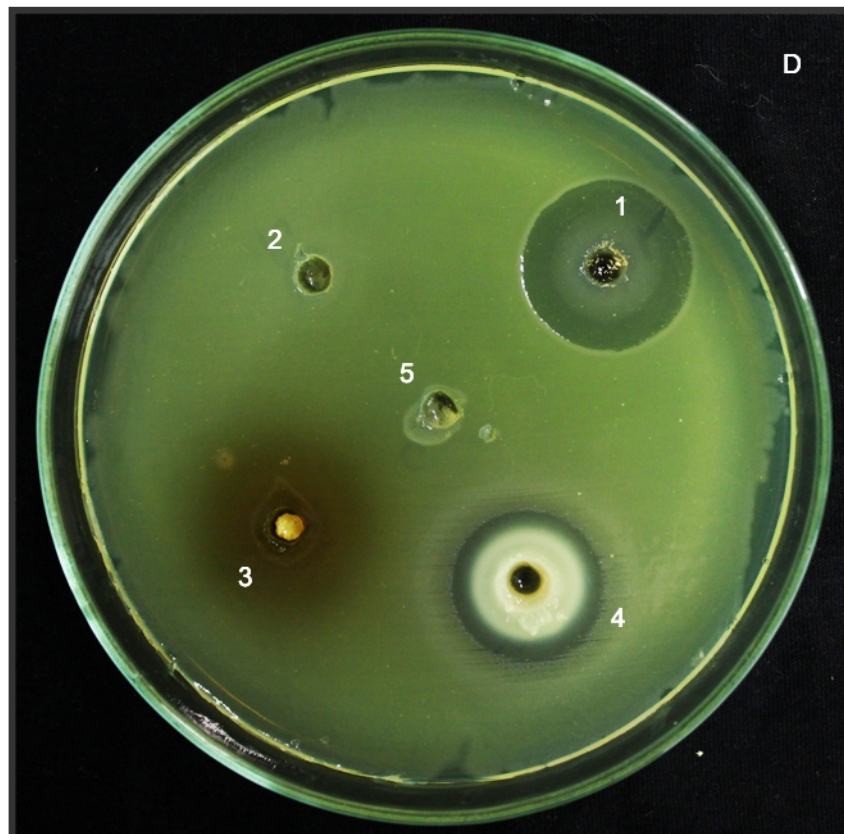
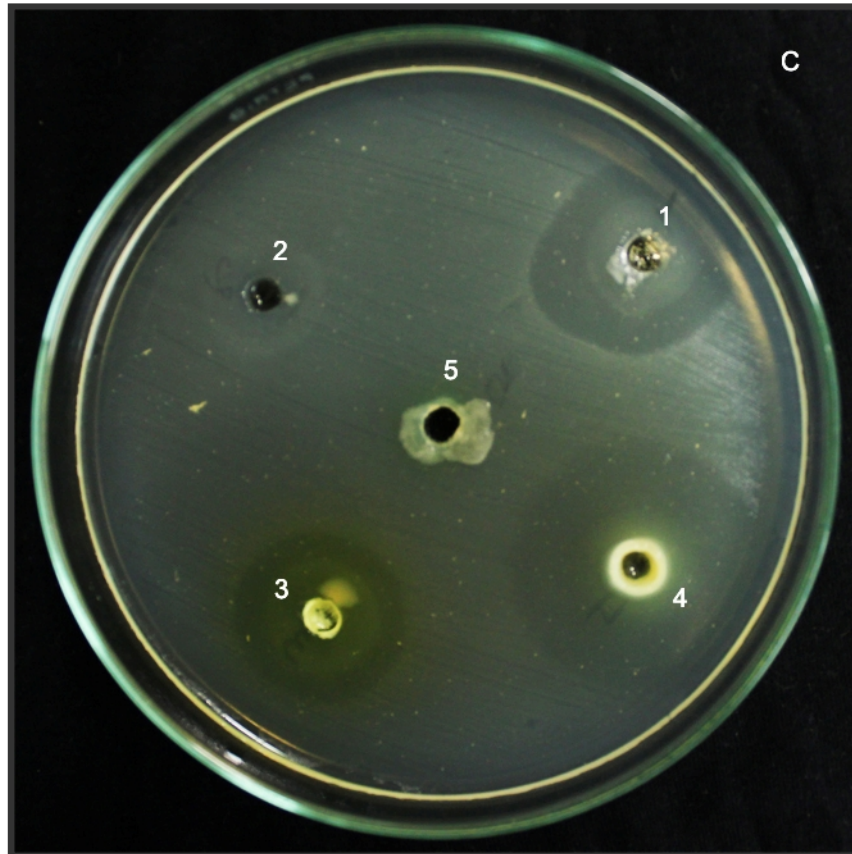
5 RESULTADOS

5.1 PRIMEIRA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL

5.1.1 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO ATRAVÉS DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM AGAR

Comparando os géis Natrosol[®], CHX, NIT e DX, relativamente ao seu comportamento antibacteriano quando em contato com os microrganismos *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, através do método de difusão de agar (Figura 33), verificou-se que as medicações tiveram diferentes comportamentos com os vários tipos de microrganismos.





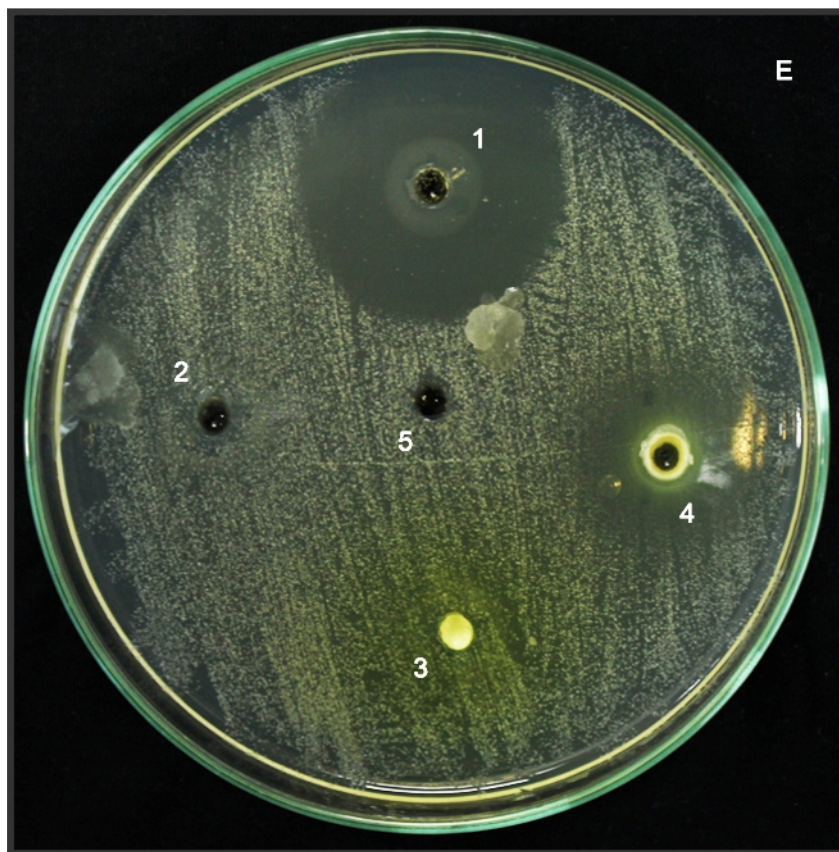


Figura 33 - Halos (mm) de inibição formados pelas medicações intracanal testadas (1 - CHX; 2 - PC; 3 - NIT; 4 - DX; e 5 - gel de Natrosol®) face às bactérias (A) *E. coli*, (B) *S. aureus*, (C) *E. faecalis*, (D) *P. aeruginosa* e ao fungo (E) *C. albicans*.

Através da Tabela 4 podemos analisar os valores médios, em mm, das áreas de inibição do crescimento microbiano das várias medicações quando em contato com os microrganismos em estudo. Tanto o gel Natrosol® como o PC foram os únicos géis que não inibiram o crescimento de nenhum dos microrganismos. A CHX não apresentou os halos de maior dimensão, mas foi a única que teve ação em todos os casos, inclusive em *C. albicans*. Com esta medicação, *C. albicans* apresentou maior suscetibilidade evidenciando um halo de inibição de 36,61 ($\pm 0,59$) mm, seguindo-se *E. coli* (35,35 ($\pm 3,62$) mm), *S. aureus* (31,03 ($\pm 0,63$) mm), *E. faecalis* (27,88 ($\pm 1,54$) mm) e por fim *P. aeruginosa* (24,89 ($\pm 0,31$) mm). O gel DX foi o que apresentou maiores halos de inibição microbiana com 52,87 ($\pm 2,17$) mm para *E. coli*, 42,28 ($\pm 0,04$) mm para *S. aureus*, 36,18 ($\pm 0,17$) mm para *E. faecalis* e 21,71 ($\pm 0,99$) mm para *P. aeruginosa*. A NIT não apresentou ação contra *P. aeruginosa*, tendo demonstrado a sua maior eficácia quando em contacto com *E. coli* (37,03 ($\pm 0,40$))

mm), em seguida com *S. aureus* (25,91 ($\pm$ 0,13) mm) e por fim com *E. faecalis* (25,15 ($\pm$ 0,16) mm).

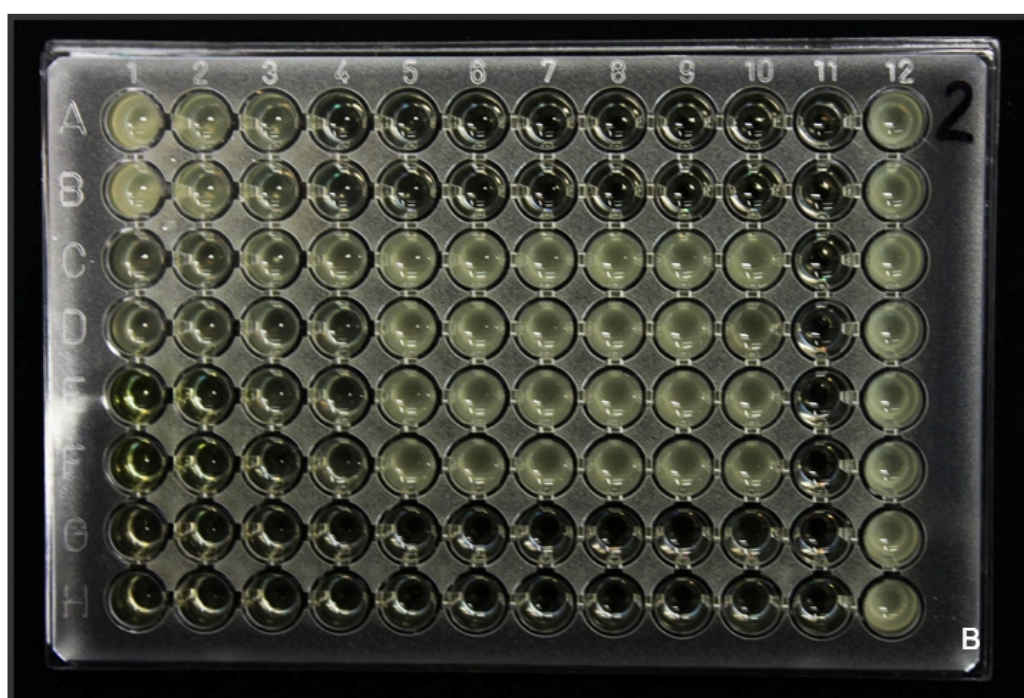
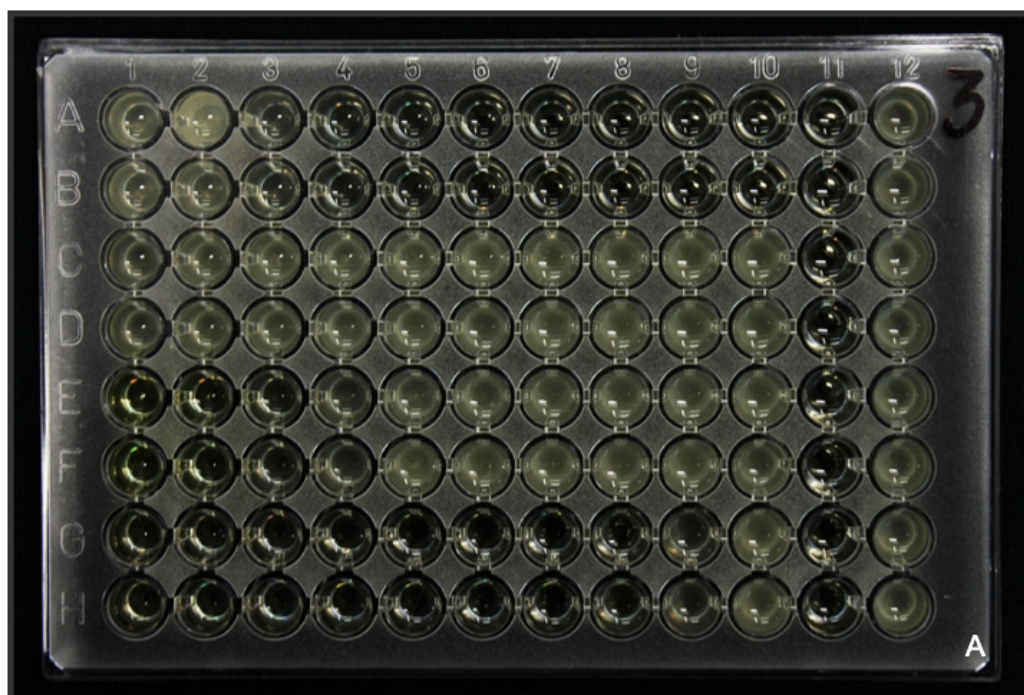
Tabela 4 – Médias e desvios-padrão dos diâmetros dos halos (mm) de inibição formados pelas medicações intracanal testadas contra as bactérias de Gram positivo, Gram negativo e a um fungo.

MEDICAÇÕES	MICROORGANISMOS				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
CHX	35,35 ($\pm$ 3,62)	31,03 ($\pm$ 0,63)	27,88 ($\pm$ 1,54)	24,89 ($\pm$ 0,31)	36,61 ($\pm$ 0,59)
PC	0 ($\pm$ 0,0)	0 ($\pm$ 0,0)	0 ($\pm$ 0,0)	0 ($\pm$ 0,0)	0 ($\pm$ 0,0)
NIT	37,03 ($\pm$ 0,40)	25,91 ($\pm$ 0,13)	25,15 ($\pm$ 0,16)	0,00 ($\pm$ 0,0)	0,00 ($\pm$ 0,0)
DX	52,87 ($\pm$ 2,17)	42,28 ($\pm$ 0,04)	36,18 ($\pm$ 0,17)	21,71 ($\pm$ 0,99)	0,00 ($\pm$ 0,0)
Gel de Natrosol®	0 ($\pm$ 0,0)	0 ($\pm$ 0,0)	0 ($\pm$ 0,0)	0 ($\pm$ 0,0)	0 ($\pm$ 0,0)

5.1.2 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO ATRAVÉS DO MÉTODO DO CIM

A Figura 34 mostra os resultados do CIM das medicações sob a forma de solução de clorhexidina 2%, placebo, nitrofurantoína 3% e doxiciclina 3% contra os microrganismos *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

RESULTADOS



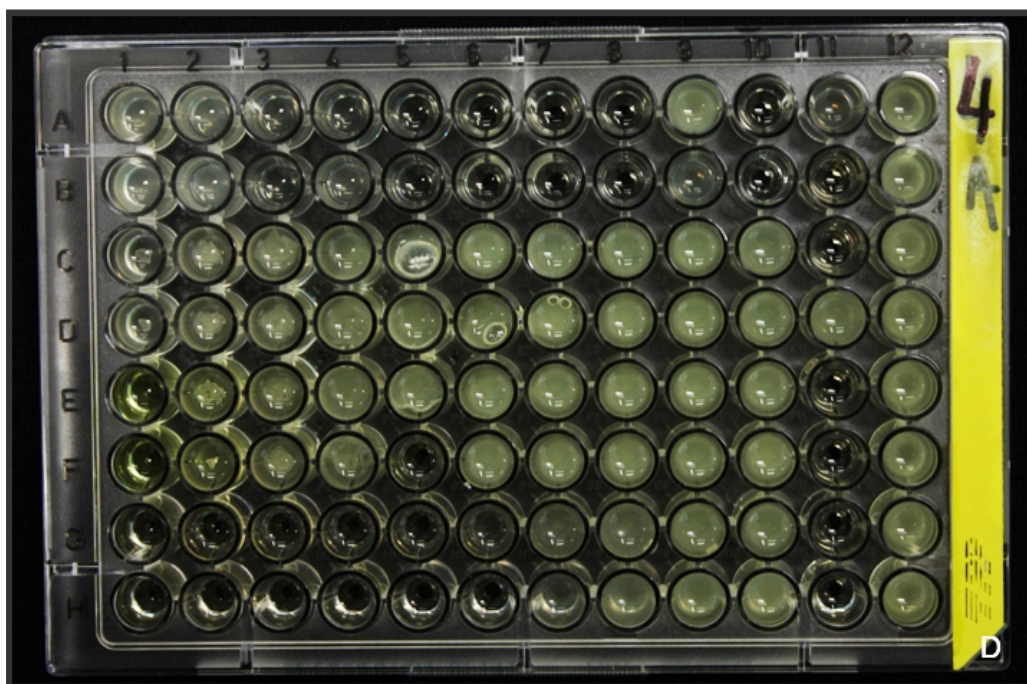
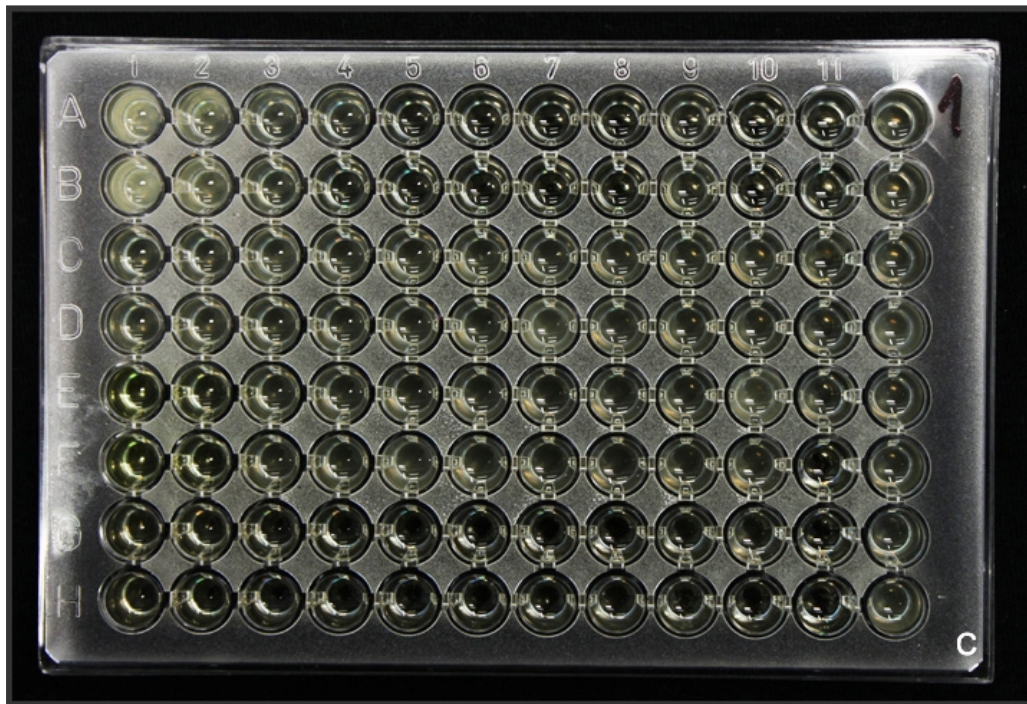




Figura 34 – Placas de microdiluições de 96 poços com as diluições das medicações intracanal testadas (CHX, PC, NIT, DX) contra as bactérias (A) *E. coli*, (B) *S. aureus*, (C) *E. faecalis*, (D) *P. aeruginosa* e o fungo (E) *C. albicans*.

Os resultados obtidos no CIM podem ser analisados através do Gráfico 1. Aqui é visível que o PC não evidenciou qualquer tipo de ação antimicrobiana. A CHX foi a que teve maior eficácia, uma vez que a uma concentração mínima de $1,95 \times 10^{-5}$ g/mL apresentou ação antimicrobiana quando exposta aos vários microrganismos. De seguida, destaca-se a DX que a uma concentração de $1,88 \times 10^{-3}$ g/mL inibiu o crescimento de *P. aeruginosa*, a $2,34 \times 10^{-4}$ g/mL *E. coli*, a $4,69 \times 10^{-4}$ g/mL *C. albicans*, e a $5,86 \times 10^{-5}$ g/mL *S. aureus* e *E. faecalis*. Por fim, a NIT foi a que necessitou de maiores concentrações para ter ação antimicrobiana. Desta forma, o crescimento da *C. albicans* não foi inibido, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* foram inibidos a uma concentração de $1,5 \times 10^{-2}$ g/mL, e *S. aureus* a $7,5 \times 10^{-3}$ g/mL.

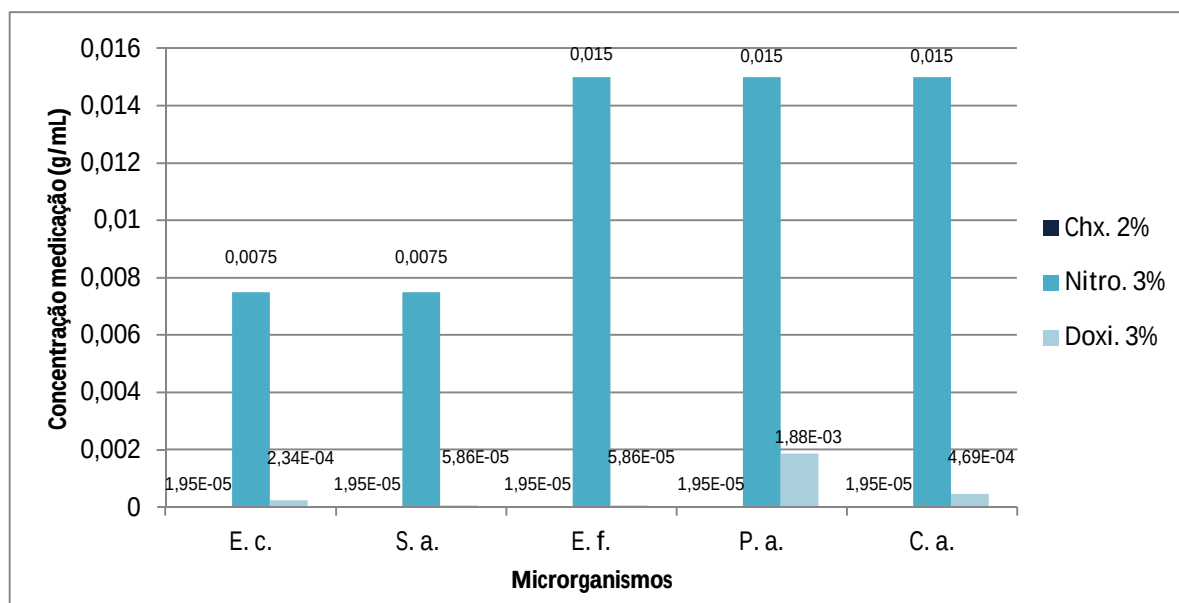


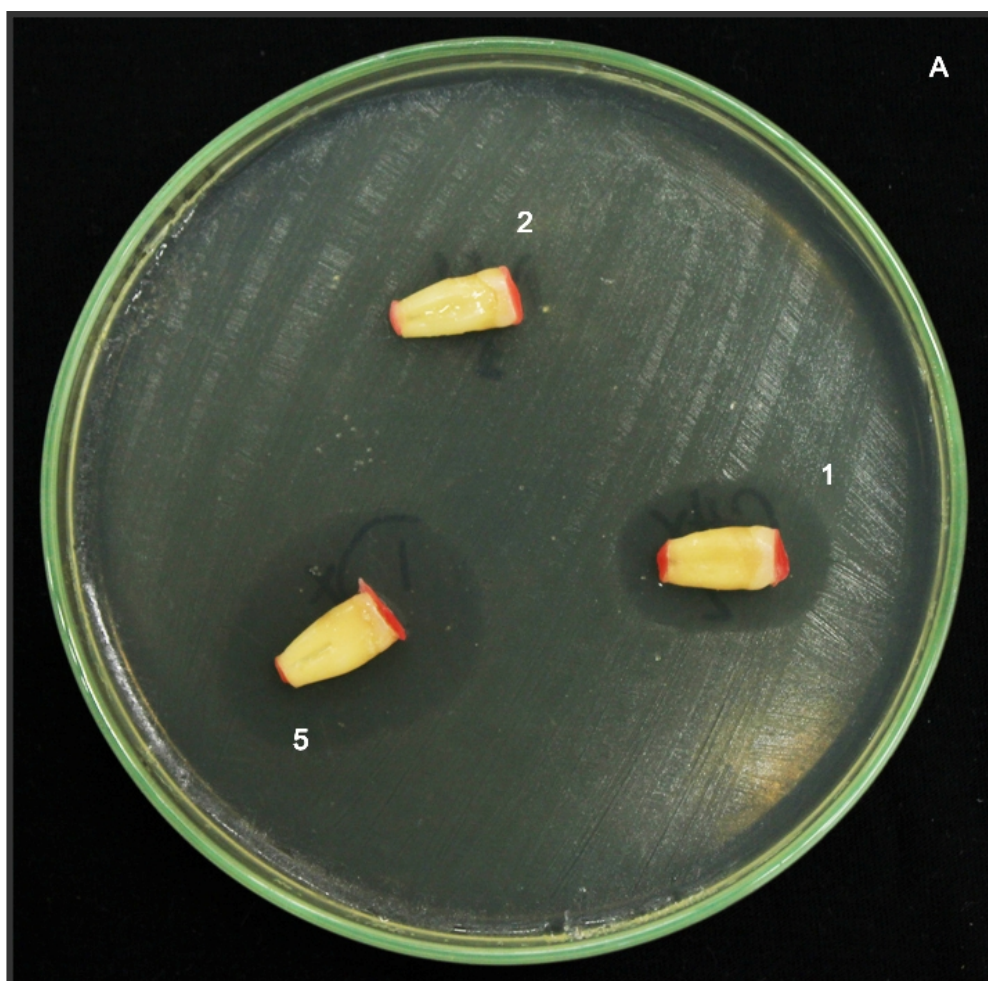
Gráfico 1 – Gráfico de barras da CIM de cada solução com ação antimicrobiana face à *E. coli* (E.c.), *S. aureus* (S.a.), *E. faecalis* (E.f.), *P. aeruginosa* (P.a.) e o fungo *C. albicans* (C.a.).

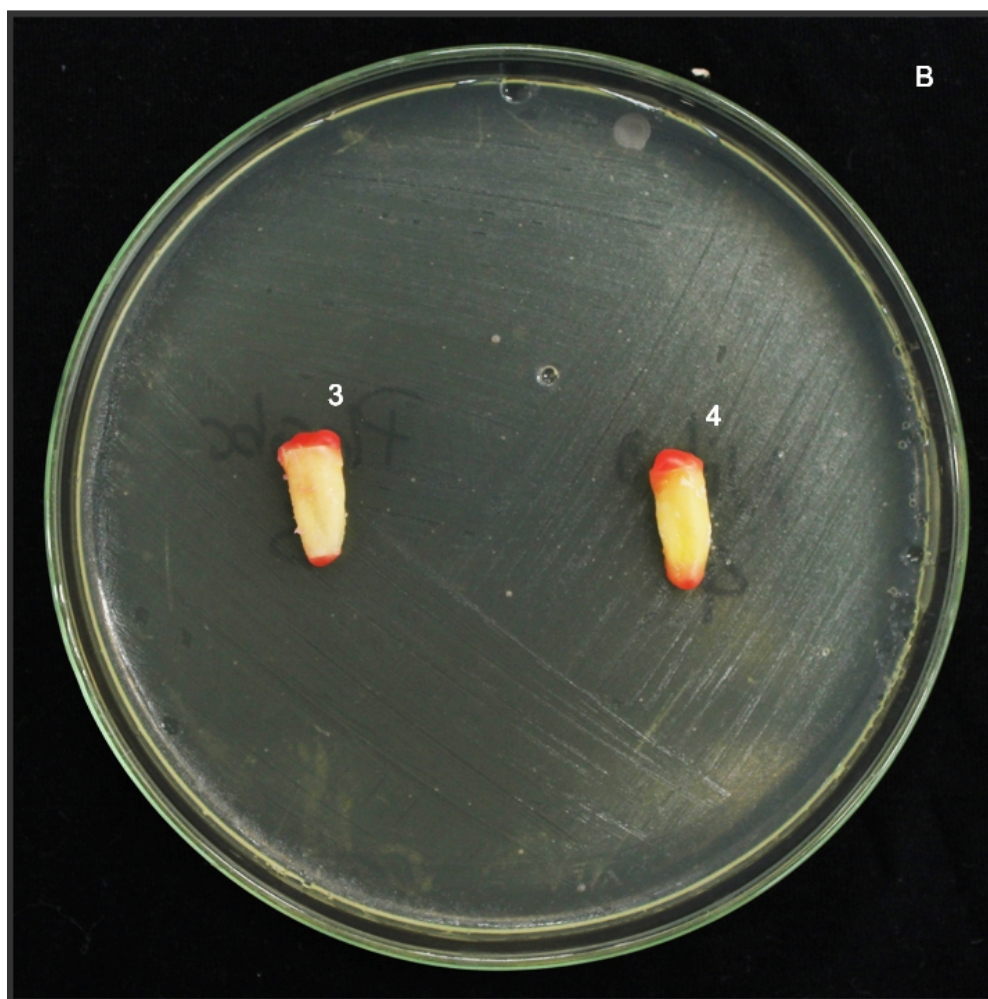
Da cultura dos 100 µL dos últimos poços sem turvação verificou-se que só a CHX é que apresentou comportamento bactericida/fungicida quando em contacto com *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, e com o fungo *C. albicans*. Quando na presença de *P. aeruginosa*, a CHX teve um comportamento bacteriostático. Relativamente à NIT e DX tiveram sempre um comportamento bacteriostático, independentemente do microrganismo.

5.2 SEGUNDA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL

5.2.1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DIFUSÃO DA MEDICAÇÃO INTRACANALAR ATRAVÉS DOS TÚBULOS DENTINÁRIOS

A Figura 35 mostra a área de inibição microbiana das várias medicações intracanais, através da superfície externa da raiz, perante o agar contaminado com *E. faecalis*. O registo destas medidas foi feito em mm e foi calculada a sua média.





Figuras 35 – Halos (mm) de inibição formados pelas medicações intracanal testadas através dos canalículos dentinários face à presença de *Enterococcus faecalis*: (A) 1 – CHX; 2 – SM e 5 – DX; (B) 3 – PC e 4 – NIT.

A partir do Gráfico 2, é visível que só a CHX e a DX apresentaram halos de inibição de crescimento $5,52 (\pm 2,9)$ mm e $11,17 (\pm 2,17)$ mm respectivamente, enquanto os grupos PC e NIT não inibiram o crescimento de *E. faecalis* (0,00 mm), tendo um comportamento semelhante ao controlo negativo (SM). O teste Kruskal-Wallis ($\chi^2=47.126$; $p<.001$) revelou diferenças significativas entre os grupos. Nos procedimentos de comparações múltiplas *post-hoc* foi possível observar diferenças significativas entre a CHX e DX e os outros grupos.

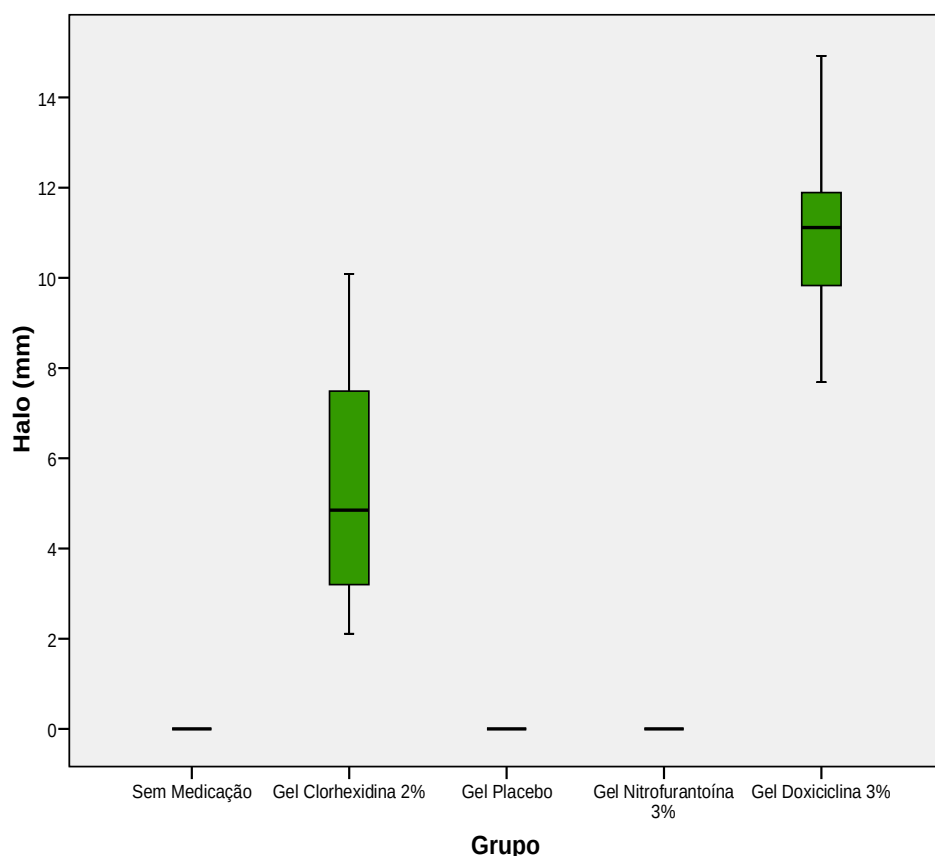
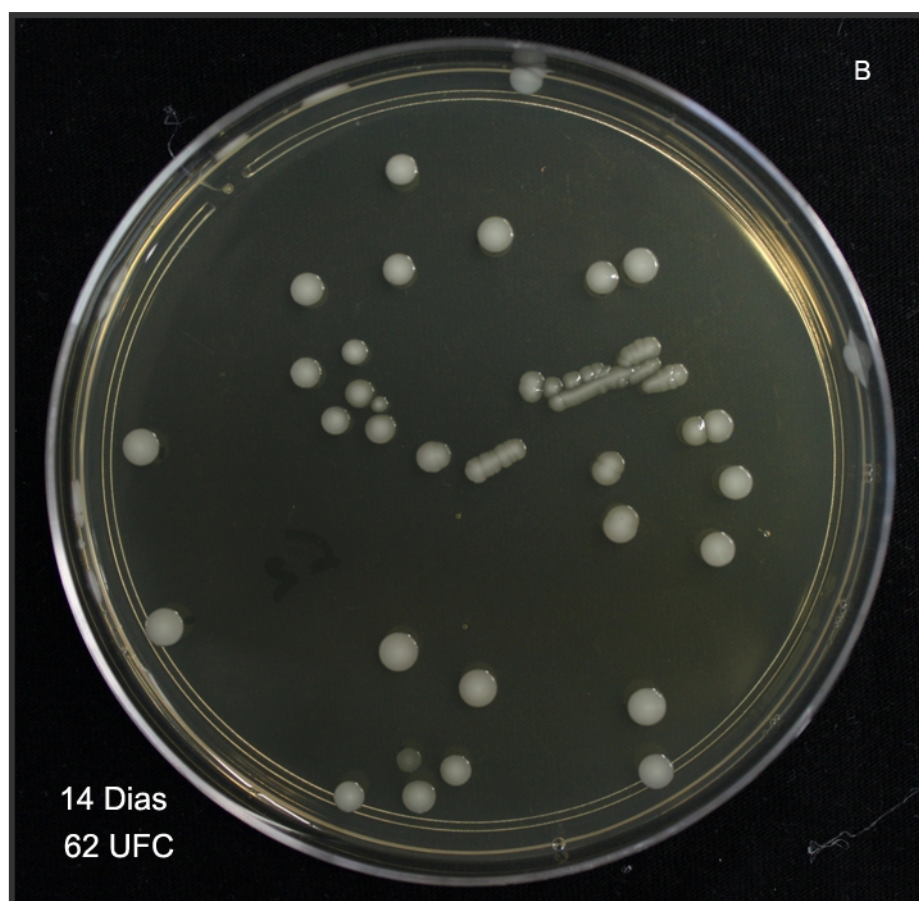
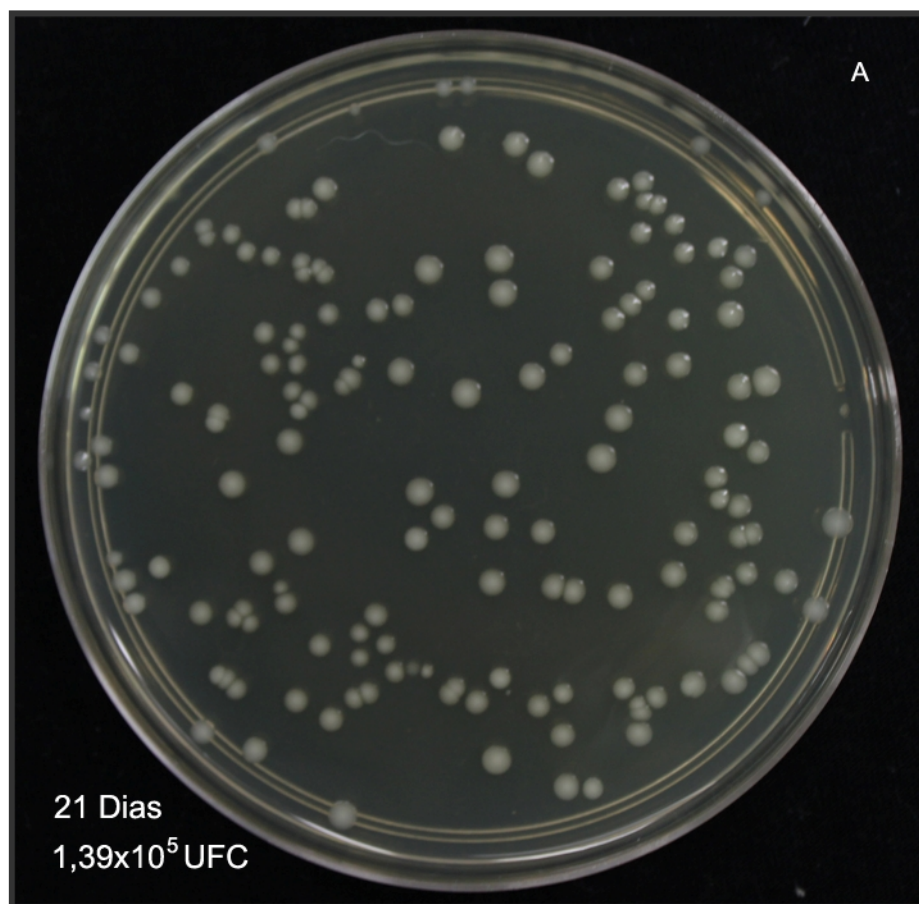


Gráfico 2 - Box-plot dos valores dos halos das diferentes medicações através dos dentes após 24h. Teste Kruskal-Wallis ($\chi^2=47.126$; $p<.001$).

5.3 TERCEIRA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL

5.3.1 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO EM DENTINA INFETADA

A Figura 36 ilustra a variação das UFC's de um dente ao longo dos três momentos do estudo em que se efetuaram as diferentes colheitas das amostras bacterianas (1º momento - 21 dias de contaminação dos espécimes dentários com *E. faecalis* (S1); 2º momento – 14 dias com medicação intracanal (S2); 3º momento – 7 dias com caldo de BHI (S3)).



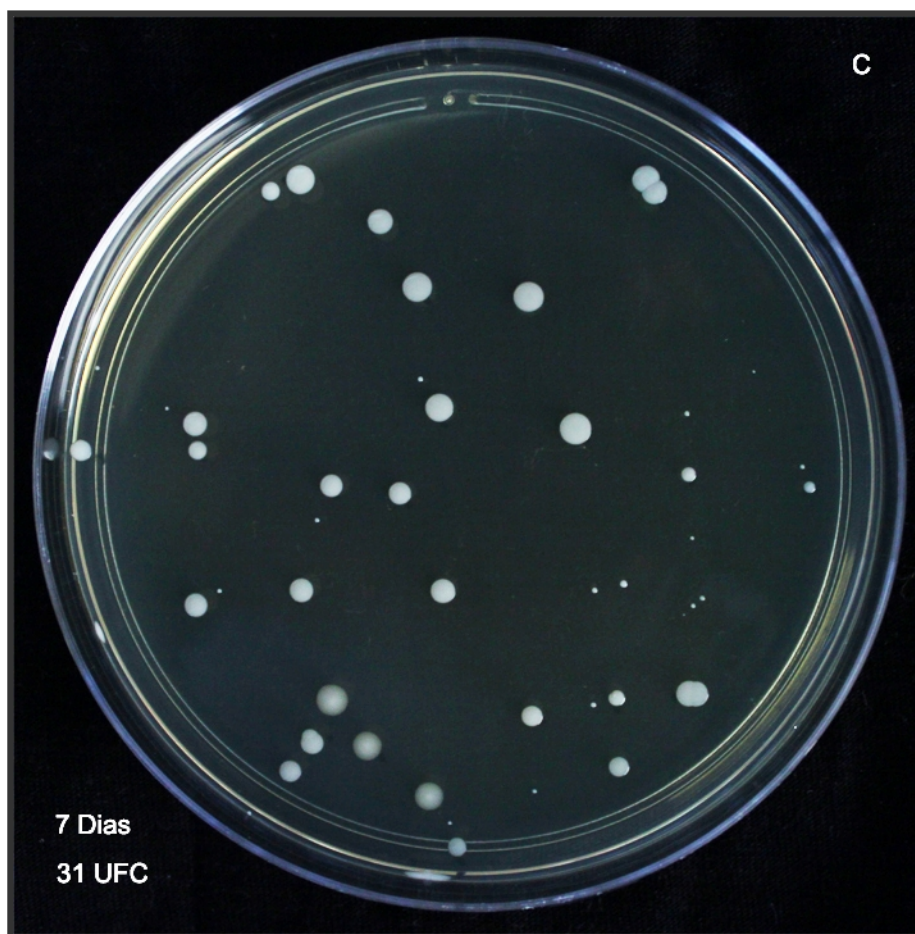


Figura 36 - Análise das UFC's de um dente do grupo do Gel DX: (A) UFC de S1, após 21 dias de contaminação dos espécimes dentários com *E. faecalis*. (B) UFC de S2, após 14 dias com a medicação intracanal. (C) UFC de S3 após 7 dias com meio BHI no interior dos canais.

Na Tabela 5 é possível analisar o número de UFC/mL de *E. faecalis* recuperadas do canal radicular, ao longo dos 3 momentos do trabalho experimental.

Depois dos 21 dias de contaminação verificou-se a presença de *E. faecalis* em todos os dentes.

O valor da média de UFC's diminui em todos os grupos após os 14 dias com a medicação intracanal. No entanto, essa diferença foi mais acentuada nos grupos com medicação intracanal CHX e DX, do que no grupo SM.

Após 7 dias com caldo de BHI no interior dos canais, os valores de UFC's mantiveram-se baixos para os grupos CHX e DX, enquanto no SM aumentaram para valores idênticos aos níveis iniciais.

Tabela 5 – Médias e desvio-padrão das UFC dos diferentes grupos em função do tempo (ANOVA de medidas repetidas na análise do tempo e interação tempo e grupo).

Colheitas Bacterianas	Grupos Experimentais (UFC/mL x 10 ⁴)		
	Sem Medicação (SM) (n=10)	Clorhexidina (CHX) (n=10)	Doxiciclina (DX) (n=10)
S1 (21 dias)	2,63 ± 2,77	10,59 ± 9,17	11,89 ± 10,95
S2 (14 dias)	1,12 ± 1,37	0,08 ± 0,21	0,17 ± 0,19
S3 (7 dias)	2,63 ± 0,86	0,02 ± 0,02	0,11 ± 0,11
Tempo F (1,009) = 25,087; p = 0,000			
Tempo x Grupo/Medicação F (2,018) = 5,231; p = 0,012			

S1- após 21 dias de contaminação com *E. faecalis*; **S2** - depois de 14 dias com medicação intracanal, **S3** – após 7 dias com BHI.

No Gráfico 3 é possível analisar a cinética dos diferentes grupos ao longo de todo o ensaio clínico.

Para verificar se as alterações ao longo do tempo foram estatisticamente significativas foi usado o teste de medidas repetidas ANOVA, assumindo o valor de significância de pelo menos de 0,05. Foi também verificado e assumido a normalidade e homogeneidade da variância, usando o teste Mauchly's sphericity, que permite efetuar o cálculo com a correção de Greenhouse-Geisser.

A partir da ANOVA de medidas repetidas foi possível verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas, quer nas UFC ao longo do tempo ($p < 0,001$), quer nos grupos que também possuem diferenças entre eles nos três momentos ($p = 0,012$).

Analisando cada grupo individualmente, constatou-se que todos os grupos demonstraram diferenças estatisticamente significativas (SM $p=0,010$, CHX $p<0,001$ e DX $p=0,031$). Entre o primeiro e o segundo momento do ensaio experimental, todos os grupos exibiram uma redução do número de UFC's, onde se observou uma diferença significativa nos grupos DX ($p=0,015$) e CHX ($p=0,999$), contudo no grupo SM essa diminuição não foi suficiente para se verificar uma diferença estatisticamente significativa. Após o segundo momento, os grupos CHX e DX reduziram o número de UFC, mas não foi suficiente para que se verificasse uma diferença estatisticamente significativa, no entanto, o grupo SM revelou um aumento significativo das UFC ($p=0.006$).

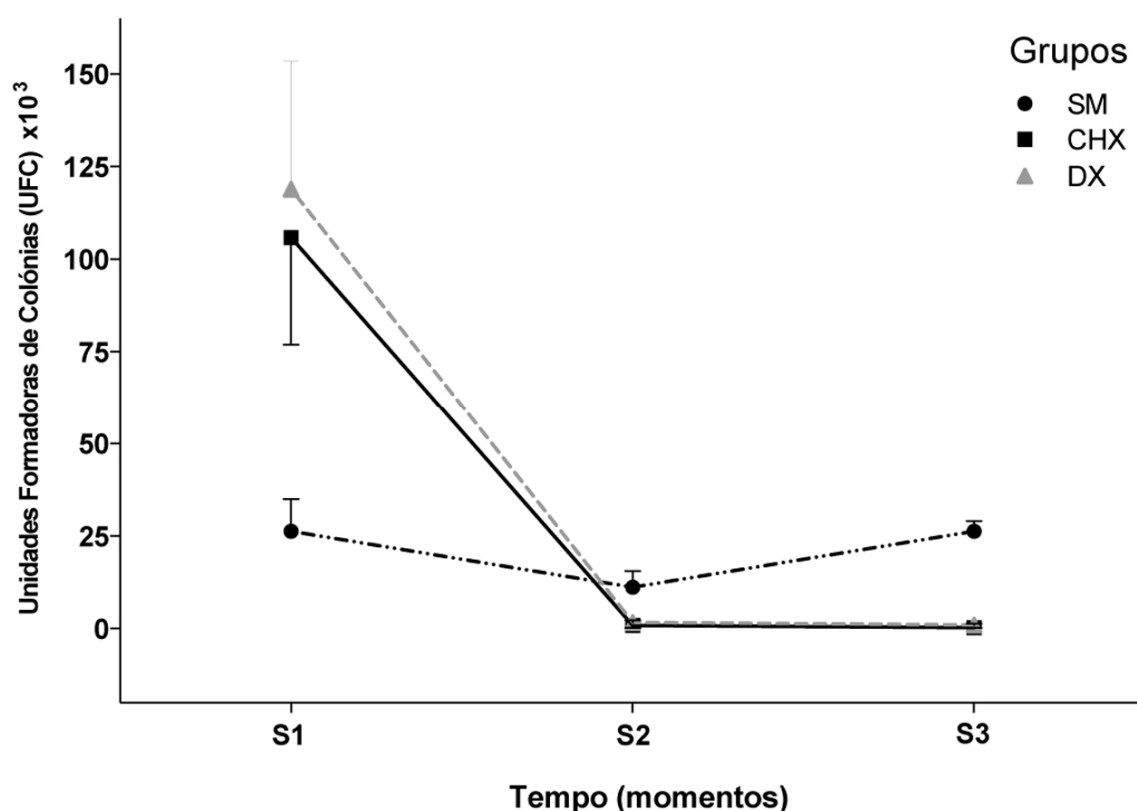


Gráfico 3 – Quantificação das UFC's nos Grupos/Medicações em função do tempo: (S1) 1º momento – após 21 dias de contaminação, (S2) 2º momento – após 14 dias com medicação intracanal, (S3) 3º momento – após 7 dias com caldo de BHI. ANOVA de medidas repetidas na análise do tempo e interação tempo e grupo/medicação.

6 DISCUSSÃO

Organizou-se este capítulo em secções de forma a transmitir a discussão dos resultados referentes a cada um dos estudos parcelares efetuados, iniciando com algumas considerações gerais comuns a todos eles.

6.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Apesar da grande variabilidade da medicação intracanal existente, não foi encontrada ainda a ideal. Por esta razão, tentou-se criar uma medicação que se aproximasse o mais possível dos requisitos ideais ^(15, 16).

A solução de irrigação MTAD, uma mistura de tetraciclina (doxiciclina), ácido cítrico e detergente, foi a formulação base do presente estudo, uma vez que a sua ação antimicrobiana já tinha sido comprovada por outros autores ^(41, 125).

Com base na solução de MTAD, criaram-se duas novas formulações com o propósito de poderem ser usadas como medicação intracanal. Para tal, foram feitas algumas adaptações.

Em relação ao tipo de antibiótico selecionado, prepararam-se duas formulações, mantendo-se numa a doxiciclina, e optando-se na outra pela nitrofurantoína. A doxiciclina, apesar de ter a sua ação antimicrobiana confirmada contra determinadas bactérias encontradas nas lesões endodônticas ⁽¹⁵⁰⁾, não é o antibiótico de primeira escolha para uma das bactérias mais frequentemente isoladas como *E. faecalis* ⁽¹²²⁾. Já a nitrofurantoína é um antibiótico sintético, mais específico, de amplo espectro de ação e com alguns estudos a confirmar uma melhor eficácia contra esta espécie quando comparada com a doxiciclina ^(50, 51). A vancomicina foi também tida em conta, face à especificidade do seu espectro de ação, porém o preço, comparativamente com o dos outros produtos, fez com que não fosse considerada para este estudo ⁽⁵⁰⁾.

O ácido cítrico, como já foi referido, é um dos constituintes do MTAD. Foi demonstrado por alguns autores que nas concentrações de 10% (pH 1,6) e de 25% (pH 1,2) evidenciou alguma ação bactericida contra diversos microrganismos ^(151, 152). Contudo, há estudos que sugerem que o efeito antimicrobiano do MTAD não é devido ao ácido cítrico a 4,25% (pH 2,15), uma vez que este, nesta concentração, não apresenta atividade bactericida significativa, mas sim devido à doxiciclina ^(43, 153). Uma vez que o pH ácido induz a desmineralização da estrutura dentinária ⁽¹⁵⁴⁾ e considerando que o ácido não terá relevância no efeito antimicrobiano, este foi substituído por um tampão fosfato. Com isto pretendeu-se um pH neutro, de forma a permitir que as novas formulações pudessem permanecer no interior dos canais por um maior período de tempo, sem consequências nefastas para a estrutura dentinária.

O detergente Tween 80, foi mantido na constituição das novas formulações, sendo responsável pela redução da tensão superficial, permitindo um maior efeito de molhabilidade e, conseqüentemente, uma melhor penetração da medicação intracanal ⁽³⁹⁾.

Depois de estabelecida a composição das novas formulações, definiu-se o uso de clorohexidina a 2% como controlo positivo. A clorohexidina é usada como “*gold standard*” devido ao seu amplo espectro antibacteriano^(20, 21, 104). Também foi tida em consideração a quantidade de estudos realizados com esta substância na área da microbiologia endodôntica, a sua biocompatibilidade e eficácia perante microrganismos frequentemente isolados em infeções endodônticas, como *E. faecalis*^(25, 104, 155-157).

As formulações com clorohexidina (CHX), nitrofurantuína (NIT) e doxiciclina (DX) foram confeccionadas sob a forma de gel para melhor aplicação intracanal. O gel base usado foi a hidroxietilcelulose, um polímero de carbono biocompatível, mais conhecido como Natrosol®⁽¹⁵⁸⁾. Para além de bastante hidrossolúvel, este gel é facilmente removido dos canais radiculares com uma irrigação de 5 mL de água destilada^(31, 159).

Das várias bactérias envolvidas nos casos de insucessos endodônticos as de Gram positivo são as principais responsáveis.

Entre as bactérias de Gram positivo destaca-se *E. faecalis* pela sua elevada incidência^(7, 66). A escolha deste microrganismo na maior parte dos estudos deve-se ao facto de ser uma bactéria bastante resistente^(13, 160), capaz de invadir os túbulos dentinários e de aderir ao colagénio⁽¹⁶⁰⁾, estando frequentemente associada a casos de insucesso endodôntico.

Outra das bactérias estudadas foi *Staphylococcus aureus*. É certo que durante muito tempo esta bactéria não foi considerada como constituinte habitual da população microbiana oral, nem com um papel importante na patogénese das infeções orais. No entanto, têm sido isoladas algumas estirpes, havendo mesmo estudos recentes que confirmam o facto de que *Staphylococcus* poderá ser um colonizador dos tecidos orais mais frequente do que se acreditava inicialmente⁽¹⁶¹⁾.

Embora as bactérias facultativas de Gram positivo sejam as primeiras colonizadoras dos canais radiculares, com o desenrolar da situação, gera-se um ambiente caracterizado pela ausência de aporte sanguíneo e de oxigénio⁽¹⁶²⁾, responsável

pela proliferação de microrganismos de Gram negativo, anaeróbios e proteolíticos, que apresentam na sua parede endotoxinas^(163, 164). Por isso, optou-se também por seleccionar duas bactérias de Gram negativo, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. O destaque de *Pseudomonas* é pelo facto de ser isolada como bactéria resistente em lesões endodônticas persistentes ou refratárias^(165, 166). Relativamente à *Escherichia coli*, apesar de não ser frequentemente isolada nos canais com polpa necrosada, as suas endotoxinas são muitas vezes usadas como referência para avaliar a eficácia de substâncias antibacterianas. Isto deve-se ao facto destas apresentarem a estrutura básica do componente lipídico que representa o centro ativo responsável pela toxicidade dos lipopolissacarídeos (LPS)⁽¹⁶⁷⁾.

O fungo *Candida albicans* é outro dos microrganismos mais frequentemente isolados nas infeções secundárias, e por isso considerado relevante para este estudo^(7, 8). Esta resistência pode estar relacionada com a sua capacidade de adaptação a vários ambientes, de se alterar morfológicamente para um estado comensal e invadir os tecidos do hospedeiro, de se adaptar quer num pH ácido, quer básico e ser capaz de formar biofilmes em diferentes superfícies⁽¹⁶⁸⁾.

6.2 PRIMEIRA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL

Nesta primeira fase pretendeu-se avaliar a ação antimicrobiana das novas formulações NIT ou DX quando expostas aos microrganismos: *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans*. Os seus desempenhos foram comparados com o gel CHX dado o seu amplo espectro de ação^(20, 21) e com o gel PC, de constituição semelhante às novas formulações, mas sem o agente antimicrobiano. Tanto o teste de difusão em agar, como o da CIM, são bem descritos na literatura^(78, 135, 137, 169).

No teste de difusão em agar os resultados demonstram que as novas formulações DX e NIT tiveram efeito antimicrobiano contra todos os microrganismos, excetuando o caso do fungo *C. albicans*. Quando comparado com o controlo positivo (CHX),

verificou-se que a DX apresentou melhores resultados que a CHX e a NIT apenas conseguiu ter maior atividade relativamente à bactéria *E. coli*. Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados por outros autores, que mostram a eficácia da clorohexidina na inibição de vários microrganismos ⁽¹⁶⁹⁾. Sendo as novas formulações baseadas na constituição da solução de irrigação MTAD, pode considerar-se que os resultados presentes corroboram os resultados de outros estudos sobre a atividade antibacteriana do MTAD ⁽¹⁵⁰⁾.

Apesar de, através desta metodologia, a área do halo de inibição ser um indicador da atividade antimicrobiana, a sua eficácia está dependente de vários fatores como o tamanho molecular, a solubilidade e difusão das substâncias através do meio agar, a sensibilidade do medicamento, a origem/fonte bacteriana, o número de bactérias inoculadas, o pH do substrato nas placas, a viscosidade do agar, as condições de armazenamento das placas de agar, o tempo de incubação e a atividade metabólica contra os microrganismos ^(9, 19, 170).

Não obstante a NIT ter apresentado um halo de inibição inferior à DX, estudos mostram que a nitrofurantoína é mais eficaz que a doxiciclina, relativamente à *E. faecalis* ⁽⁵⁰⁾, ao contrário do que se verificou com o nosso estudo.

Apesar de haver valores de referência para as áreas de inibição indicativos da atividade antibacteriana ⁽¹⁷¹⁾ e tendo em consideração as limitações do teste de difusão em agar, o material que apresente o maior diâmetro da zona de inibição de crescimento bacteriano, não reflete, necessariamente, a eficácia do agente antimicrobiano ^(172, 173). Por este motivo, e pelo facto de estarmos perante uma amostra de tamanho reduzido, optou-se por procedimentos de estatística descritiva. A atividade antimicrobiana foi avaliada considerando apenas a presença ou ausência do halo de inibição.

Neste sentido, é considerado que tanto a DX como a NIT apresentaram efeito antibacteriano em relação ao *E. faecalis* independentemente da área de inibição registada. Para o grupo PC e o gel Natrosol[®] não foram observados quaisquer halos de inibição.

Após a verificação de que ambas as formulações NIT e DX apresentaram ação antimicrobiana, realizou-se o CIM de forma a perceber a suscetibilidade dos vários microrganismos relativamente às substâncias em estudo.

Os dados do presente estudo (Gráfico 1) sugerem que a suscetibilidade dos microrganismos varia consoante a formulação, e que ambas as formulações têm a capacidade de induzir a inibição do crescimento bacteriano a concentrações superiores às do controlo positivo (CHX). Entre as duas formulações, a DX foi a que teve melhores resultados uma vez que conseguiu ter ação antimicrobiana a concentrações mais baixas, quando comparada com a NIT.

Com a DX, os microrganismos que demonstraram maior suscetibilidade foram *E. faecalis* e *S. aureus*, seguidos de *E. coli* e *C. albicans* e, por fim, *P. aeruginosa*. A ação antimicrobiana do MTAD perante *E. faecalis* e *S. aureus* na concentração de $5,8 \times 10^{-5}$ g/mL (equivalente a 512 diluições) foi também observada por outros autores ⁽¹²⁴⁾, assim como para *E. coli* na concentração de $2,34 \times 10^{-4}$ g/mL (equivalente a 128 diluições) ⁽¹⁵⁰⁾.

Relativamente aos restantes microrganismos, com *P. aeruginosa* pôde observar-se alguma variação no CIM quando comparada a concentração de $1,88 \times 10^{-3}$ g/mL (equivalente a 16 diluições) do presente trabalho com a de $4,69 \times 10^{-4}$ g/mL (equivalente a 64 diluições) de outros autores ⁽¹⁵⁰⁾. No que diz respeito à *C. albicans*, o seu crescimento foi inibido a uma concentração de $4,69 \times 10^{-4}$ g/mL (equivalente a 64 diluições). Isto também se verificou em outros estudos como o de Arslan (2011), em que o resultado do CIM de *C. albicans* contra o MTAD (30mg/mL de doxiciclina) foi de $9,38 \times 10^{-4}$ g/mL (equivalente a 32 diluições) ⁽¹⁷⁴⁾, ou o de Ruff (2006) onde se verifica uma diminuição das UFC's deste fungo quando em contacto com o MTAD ⁽¹⁷⁵⁾. Embora alguns autores ^(150, 175) não atribuam relevância a estes valores de CIM sobre *C. albicans*, há estudos que realçam a ação antifúngica do MTAD com valores de CIM similares aos verificados para a DX ⁽¹⁷⁴⁾.

No que diz respeito à NIT, os microrganismos que apresentaram maior suscetibilidade foram *S. aureus* e *E. coli*, seguidos de *E. faecalis* e *P. aeruginosa*. Já o fungo *C. albicans* não teve qualquer ação. Apesar de não existirem estudos com a formulação em questão, há outros que avaliam a ação antimicrobiana deste agente por exemplo contra *E. faecalis* e *E. coli*, e constataam a sua atividade e eficácia na eliminação destas bactérias ^(176, 177).

Pequenos desvios nos testes de suscetibilidade antimicrobiana podem estar relacionados com variações da metodologia, uma vez que diversos fatores como a quantidade inoculada, a composição do meio, pH e incubação, podem influenciar a interação dos microrganismos com os agentes antimicrobianos, condicionando os valores de CIM obtidos ⁽⁸⁴⁾.

Apesar destas condicionantes, este tipo de teste (CIM) tem algumas vantagens quando comparado com o teste de difusão em agar, como por exemplo, permitir obter valores de CIM usando agentes voláteis e não depender da capacidade de difusão do agente no meio de cultura; sendo, por isso, um teste de primeira escolha na avaliação de agentes antimicrobianos sobre bactérias anaeróbias ⁽¹⁷⁸⁾.

No presente estudo verificou-se que ambos NIT e DX apresentaram atividade antimicrobianas contra uma grande variedade de microrganismos. No entanto, o grupo DX foi o que demonstrou maior eficácia contra *E. faecalis*. Este facto foi evidenciado tanto no CIM quanto no teste de difusão em agar.

A nitrofurantoína é reportada como eficaz contra muitas bactérias de Gram positivo e negativo, incluindo *E. faecalis* ^(47, 50), mas a doxiciclina também abrange um elevado número de microrganismos ⁽³⁹⁾. No entanto, alguns estudos evidenciam a sua baixa atividade perante uma grande variedade de estirpes de *E. faecalis* ^(179, 180). Os resultados obtidos neste estudo podem ser explicados talvez pelo facto de estarmos a utilizar uma estirpe mais suscetível à doxiciclina que à nitrofurantoína.

Tendo em conta a suscetibilidade que *E. faecalis* demonstrou às novas formulações, o facto de ser das espécies mais frequentemente isolada nos casos de insucesso

endodôntico, e a sua resistência e capacidade de multiplicação no interior dos canais ^(7, 8, 26, 65, 67, 155, 181), esta foi a bactéria selecionada para as restantes fases do trabalho experimental.

6.3 SEGUNDA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL

Na segunda fase experimental, foi usada uma adaptação do teste de difusão em agar usando peças dentárias ⁽¹⁴³⁾, numa tentativa de verificar a capacidade de difusão das novas formulações através dos túbulos dentinários e atividade antibacteriana perante *E. faecalis*. A importância da análise desta capacidade deve-se ao facto de a difusão de substâncias anti-bacterianas através dos túbulos dentinários poder aumentar a taxa de sucesso do tratamento endodôntico ⁽¹²⁻¹⁴⁾. Para além disso, pode também ser considerada uma via complementar para o tratamento da periodontite apical, dada a estreita relação entre o sistema de canais radiculares e o complexo periodontal, e ao efeito antibacteriano que poderá ter na superfície externa da raiz ⁽¹⁴³⁾.

Neste teste a DX apresentou a maior área de inibição, demonstrando um melhor efeito antibacteriano e/ou capacidade de difusão quando comparada com a NIT, PC e controlo positivo (CHX). A NIT e o PC não tiveram capacidade de exercer qualquer atividade antimicrobiana na superfície externa da raiz, durante o período de incubação.

Nesta metodologia, quando a área de inibição microbiana é igual a zero pode significar que a medicação não apresentou qualquer efeito antimicrobiano, ou que não teve capacidade de difusão através dos túbulos dentinários e cimento.

Apesar de a NIT ter apresentado efeito antibacteriano sobre *E. faecalis* na 1ª fase experimental, a maior viscosidade da formulação pode ter dificultado a sua difusão através dos túbulos dentinários, justificando, assim, a ausência de halo observada

neste teste de difusão. Devido à maior viscosidade, acredita-se que sendo aumentada a quantidade de detergente da medicação, poderia ser possível observar melhores resultados antimicrobianos na superfície externa da raiz.

A presença de cimento pode afetar a capacidade de difusão das substâncias para o agar, embora este aspeto possa, segundo alguns autores, não interferir significativamente com as zonas de inibição de crescimento bacteriano⁽¹⁴³⁾.

Nesta fase, continuou-se a usar a CHX como controlo positivo, quer pelos motivos supracitados, quer pelo facto de ter uma boa capacidade de difusão através da dentina⁽¹⁴³⁾.

Analizando todo o desempenho das medicações durante as duas primeiras fases experimentais, verifica-se que o grupo DX é o que demonstra ter os melhores resultados. Perante isto e pelo facto da eficácia antimicrobiana contra *E. faecalis* já ter sido demonstrada por outros autores⁽⁴⁰⁻⁴²⁾, optou-se por utilizar apenas esta medicação como grupo experimental na terceira e última fase do estudo.

6.4 TERCEIRA FASE DO TRABALHO EXPERIMENTAL

Nesta fase experimental pretendeu-se avaliar a ação antimicrobiana da DX em dentina infetada com *E. faecalis*, comparando-a com o controlo positivo (CHX).

Após os 14 dias com medicação, observou-se uma queda substancial dos números de UFC nos grupos DX e CHX, sugerindo que ambas as medicações apresentaram uma eficácia antibacteriana muito semelhante, sem diferenças significativas entre si. Outros autores tinham já demonstrado a eficácia antimicrobiana da solução de irrigação com doxiciclina (MTAD) e da medicação com clorhexidina contra *E. faecalis*^(23, 123, 182).

Depois do período de 7 dias com o caldo de BHI no interior dos canais, os grupos DX e CHX continuaram a apresentar uma diminuição do número de UFC. Apesar da redução não ter sido significativa, ela sugere alguma substantividade. A substantividade diz respeito à libertação progressiva e gradual de uma substância em níveis terapêuticos, num substrato, mais do que seria de se esperar através de um simples mecanismo de distribuição. É importante o uso de irrigantes e, principalmente, medicações intracanal com uma ação antimicrobiana residual, tanto para a prevenção de situações de reinfeção como para aumentar a probabilidade de sucesso do tratamento ⁽¹⁸³⁾.

No grupo SM, o número de UFC aumentou significativamente no mesmo período, igualando os valores obtidos na primeira colheita.

Várias são as metodologias propostas para se fazerem estudos em dentina infetada. Apesar de grande parte dos estudos serem realizados em dentina bovina, o facto do diâmetro do túbulos ser maior comparativamente com a dentina humana, pode condicionar o nível de contaminação dos mesmos pelos microrganismos ⁽¹⁸⁴⁾. Por este motivo, escolheu-se uma metodologia com dentina radicular humana já aplicada noutros estudos ^(96, 103). A diferença significativa do número de UFC observada entre os três grupos no final dos 21 dias de contaminação, pode ser explicada pela complexa variabilidade da estrutura dos túbulos dentinários ^(185, 186) em cada dente, e entre os vários tipos de dentes existentes ⁽¹⁸⁷⁾.

A contaminação inicial de 21 dias com *E. faecalis*, referida em vários estudos ^(76, 103), pretendeu recriar o ambiente das infeções persistentes, onde a desinfeção do sistema de canais radiculares é complicada devido à capacidade de invasão e de fixação das bactérias aos túbulos dentinários, em biofilmes organizados ⁽¹⁸⁸⁾.

Um aspeto que varia bastante nas várias metodologias é a colheita das amostras bacterianas ^(86, 189). Neste estudo, a colheita foi feita com pontas de papel esterilizadas introduzidas ao longo de todo o canal para absorver o seu conteúdo. Esta técnica tem a vantagem de poder ser realizada num estudo *in vitro* e/ou *in vivo*. Contudo, uma das suas limitações deve-se ao facto de só ser possível recolher os

microrganismos que se encontram à superfície do canal radicular, excluindo os que se encontram no interior dos túbulos dentinários ⁽⁸⁶⁾. Vários estudos ⁽¹⁹⁰⁻¹⁹²⁾ verificaram que as bactérias que sobrevivem à instrumentação e irrigação durante o tratamento endodôntico, rapidamente se multiplicam recolonizando os canais que ficaram vazios durante as sessões do tratamento. Assim, tal como foi feito por outros autores ⁽⁸⁶⁾, a terceira colheita do nosso ensaio experimental pretendeu verificar a capacidade de recolonização dos canais após 7 dias ^(86, 103).

O facto de termos optado pelo preenchimento dos poços com o caldo BHI deveu-se ao facto de a literatura sugerir que as bactérias existentes no interior dos túbulos dentinários podem recorrer aos fluídos do ligamento periodontal e osso alveolar para obter os nutrientes necessários para a sua sobrevivência ^(8, 66).

Os dados obtidos ao longo de todo este estudo indicam que as novas formulações têm ação antibacteriana contra vários tipos de microrganismos. No entanto, constatou-se que a DX foi a que apresentou melhor desempenho, podendo eventualmente ponderar-se o seu uso como agente antimicrobiano em situações clínicas de insucesso endodôntico.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que tanto a formulação NIT como a formulação DX apresentaram ação antibacteriana contra diversos tipos de microrganismos frequentemente encontrados nos insucessos endodônticos. No entanto, a DX foi a que mostrou maior eficácia em baixa concentrações.

Comparando a capacidade de difusão através dos túbulos dentinários, a DX foi a única, para além do controlo positivo (CHX), que apresentou ação antimicrobiana na superfície externa da raiz frente ao *E. faecalis*.

A DX mostrou uma eficácia semelhante à do controlo positivo (CHX) na eliminação de *E. faecalis* do sistema de canais radiculares quando usada como medicação intracanal.

CONCLUSÃO

As novas formulações, particularmente a DX pode ser considerada como uma medicação intracanal promissora, aumentando a probabilidade de sucesso do tratamento de infecções persistentes.

REFERÊNCIAS

1. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol*. 1990;6(4):142-9.
2. Baumgartner JC, Bakland LK, Sugita E. Microbiology of endodontics and asepsis in endodontic practice. *Endodontics* 2002. p. 63.
3. Spangberg LSW, Ingle JI, Bakland LK. Intracanal medication. *Endodontics*. 4th ed ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994. p. 627-40.
4. Haapasalo M, Shen Y. Current therapeutic options for endodontic biofilms. *Endod Top*. 2012;22:79-82.
5. Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM. Eradication of endodontics infection by instrumentation and irrigation and irrigation solutions. *Endod Top*. 2005;10:77-102.
6. Haapasalo M, Udnaes T, Endal U. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endod Top*. 2003;6:29-56.
7. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Polymerase chain reaction–based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97(1):85-94.

8. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(1):86-93.
9. Gomes BP, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(4):544-50.
10. Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *J Endod.* 1999;25(6):416-8.
11. Ercan E, Dalli M, Dulgergil CT. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(2):27-31.
12. Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J.* 2007;52:64-82.
13. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.* 1985;1(5):170-5.
14. Scarparo RK, Dondoni L, Bottcher DE, Grecca FS, Rockenbach MI, Batista EL, Jr. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. *J Endod.* 2011;37(8):1069-73.
15. Alencar AH, Leonardo MR, Silva LA, Silva RS, Ito IY. Determination of the p-monochlorophenol residue in the calcium hydroxide + P-monochlorophenol combination used as an intracanal dressing in pulpless teeth of dogs with induced chronic periapical lesion. *J Endod.* 1997;23(8):522-4.
16. Gomes BP, Sato E, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2003;36(9):604-9.
17. Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod.* 1981;7(1):17-21.
18. Torneck CD, Moe H, Howley TP. The effect of calcium hydroxide on porcine pulp fibroblasts in vitro. *J Endod.* 1983;9(4):131-6.
19. Gomes BP, Ferraz CC, Garrido FD, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, et al. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *J Endod.* 2002;28(11):758-61.

20. Lindskog S, Pierce AM, Blomlof L. Chlorhexidine as a root canal medicament for treating inflammatory lesions in the periodontal space. *Endod Dent Traumatol.* 1998;14(4):186-90.
21. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol.* 1986;57(6):370-7.
22. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6(3):437-9.
23. Khademi AA, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Aust Endod J.* 2006;32(3):112-5.
24. Ercan E, Dalli M, Duulgergil CT, Yaman F. Effect of intracanal medication with calcium hydroxide and 1% chlorhexidine in endodontic retreatment cases with periapical lesions: an in vivo study. *J Formos Med Assoc.* 2007;106(3):217-24.
25. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J.* 2009;42(4):288-302.
26. Valera MC, Salvia AC, Maekawa LE, Camargo SE, Carvalho CA, Camargo CH, et al. Antimicrobial analysis of chlorhexidine gel and intracanal medicaments against microorganisms inoculated in root canals. *Minerva Stomatol.* 2010;59(7-8):415-21.
27. Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod.* 2011;37(5):657-61.
28. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod.* 1997;23(4):229-31.
29. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod.* 1994;20(6):276-8.
30. Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99(6):768-72.
31. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2001;27(7):452-5.
32. Ohara P, Torabinejad M, Kettering JD. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. *Endod Dent Traumatol.* 1993;9(3):95-100.
33. Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Gogulnath D, Kindo AJ. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2010;43(5):419-23.

34. Neelakantan P, Sanjeev K, Subbarao CV. Duration-dependent susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide and chlorhexidine gel used as intracanal medicament: an in vitro evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104(4):138-41.
35. Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, et al. A new solution for the removal of the smear layer. *J Endod.* 2003;29(3):170-5.
36. Seymour RA, Heasman PA. Tetracyclines in the management of periodontal diseases. A review. *J Clin Periodontol.* 1995;22(1):22-35.
37. Sapadin AN, Fleischmajer R. Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications. *J Am Acad Dermatol.* 2006;54(2):258-65.
38. Molander A, Dahlen G. Evaluation of the antibacterial potential of tetracycline or erythromycin mixed with calcium hydroxide as intracanal dressing against *Enterococcus faecalis* in vivo. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96(6):744-50.
39. Torabinejad M, Johnson WB, inventors; Dentsply International (York, PA), assignee. Irrigation solution and methods for use . United States, patent 20030235804. 2003 December 25.
40. Kamberi B, Bajrami D, Stavileci M, Omeragiq S, Dragidella F, Kocani F. The Antibacterial Efficacy of Biopure MTAD in Root Canal Contaminated with *Enterococcus faecalis*. *ISRN Dent.* 2012;2012:390526.
41. Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. *J Endod.* 2003;29(6):400-3.
42. Shabahang S, Torabinejad M. Effect of MTAD on *Enterococcus faecalis*-contaminated root canals of extracted human teeth. *J Endod.* 2003;29(9):576-9.
43. Singla MG, Garg A, Gupta S. MTAD in endodontics: an update review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112(3):70-6.
44. Garcia-Godoy F, Loushine RJ, Itthagarun A, Weller RN, Murray PE, Feilzer AJ, et al. Application of biologically-oriented dentin bonding principles to the use of endodontic irrigants. *Am J Dent.* 2005;18(4):281-90.
45. Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Doyle MD, Gillespie WT, Weller RN, et al. Ultrastructure of smear layer-covered intraradicular dentin after irrigation with BioPure MTAD. *J Endod.* 2006;32(3):218-21.
46. Fadda G, Nicoletti G, Schito GC, Tempera G. Antimicrobial susceptibility patterns of contemporary pathogens from uncomplicated urinary tract infections isolated in a multicenter Italian survey: possible impact on guidelines. *J Chemother.* 2005;17(3):251-7.

47. Al-Zarouni M, Senok A, Al-Zarooni N, Al-Nassay F, Panigrahi D. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: in vitro susceptibility to fosfomycin, nitrofurantoin and tigecycline. *Med Princ Pract*. 2012;21(6):543-7.
48. Garau J. Other antimicrobials of interest in the era of extended-spectrum beta-lactamases: fosfomycin, nitrofurantoin and tigecycline. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14 (Suppl 1):198-202.
49. Hirsch-Kauffmann M, Herrlich P, Schweiger M. Nitrofurantoin damages DNA of human cells. *Klin Wochenschr*. 1978;56(8):405-7.
50. Butt T, Leghari MJ, Mahmood A. In-vitro activity of nitrofurantoin in enterococcus urinary tract infection. *J Pak Med Assoc*. 2004;54(9):466-9.
51. Zhanel GG, Laing NM, Nichol KA, Palatnick LP, Noreddin A, Hisanaga T, et al. Antibiotic activity against urinary tract infection (UTI) isolates of vancomycin-resistant enterococci (VRE): results from the 2002 North American Vancomycin Resistant Enterococci Susceptibility Study (NAVRESS). *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(3):382-8.
52. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(6):348-81.
53. Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod*. 1990;16(10):498-504.
54. Garcia CC, Sempere FV, Diago MP, Bowen EM. The post-endodontic periapical lesion: histologic and etiopathogenic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007;12(8):585-90.
55. Alves J, Walton R, Drake D. Coronal leakage: endotoxin penetration from mixed bacterial communities through obturated, post-prepared root canals. *J Endod*. 1998;24(9):587-91.
56. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Favieri A, Abad EC, Castro AJ, Gahyva SM. Bacterial leakage in coronally unsealed root canals obturated with 3 different techniques. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000;90(5):647-50.
57. Siqueira JF. Reaction of periradicular tissues to root canal treatment: benefits and drawbacks. *Endod Top*. 2005;10(1):123-47.
58. Veríssimo DM, Vale MS. Methodologies for assessment of apical and coronal leakage of endodontic filling materials - a critical review. *J Oral Sci*. 2006;48(3):93-8.
59. Madarati A, Rekab MS, Watts DC, Qualtrough A. Time-dependence of coronal seal of temporary materials used in endodontics. *Aust Endod J*. 2008;34(3):89-93.
60. Torabinejad M, Ung B, Kettering JD. In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *J Endod*. 1990;16(12):566-9.

61. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Lopes HP, Uzeda M. Coronal leakage of two root canal sealers containing calcium hydroxide after exposure to human saliva. *J Endod.* 1999;25(1):14-6.
62. Khayat A, Lee SJ, Torabinejad M. Human saliva penetration of coronally unsealed obturated root canals. *J Endod.* 1993;19(9):458-61.
63. Hancock H, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91(5):579-86.
64. Moller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr.* 1966;74(5):Suppl:1-380.
65. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J.* 2001;34(6):429-34.
66. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003;36(1):1-11.
67. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998;31(1):1-7.
68. Siqueira JF, Jr., Lopes HP, Uzeda M. Recontamination of coronally unsealed root canals medicated with camphorated paramonochlorophenol or calcium hydroxide pastes after saliva challenge. *J Endod.* 1998;24(1):11-4.
69. Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent.* 1996;24(1-2):47-55.
70. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002;35(3):221-8.
71. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18(4):234-9.
72. Robertson D, Smith AJ. The microbiology of the acute dental abscess. *J Med Microbiol.* 2009;58(2):155-62.
73. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(2):255-73.
74. Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res.* 2002;81(11):761-6.

75. Barbosa CA, Goncalves RB, Siqueira JF, Jr., Uzeda M. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. *J Endod.* 1997;23(5):297-300.
76. Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, et al. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2010;36(8):1389-93.
77. Sathorn C, Parashos P, Messer H. Australian endodontists' perceptions of single and multiple visit root canal treatment. *Int Endod J.* 2009;42(9):811-8.
78. Vianna ME, Gomes BP. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(4):585-9.
79. Chong BS, Pitt Ford TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J.* 1992;25(2):97-106.
80. Tartari T, Souza PARS, Almeida BVNA, Silva JOCJ, Pessoa OF, Souza MHS, Jr. . A new weak chelator in endodontics: effects of different irrigation regimens with etidronate on root dentin microhardness. *Int J Dent.* 2013;2013:743018.
81. Zehnder M. Root Canal Irrigants. *J Endod.* 2006;32(5):389-98.
82. Estrela C, Sydney GB, Pesce HF, Felipe O, Jr. Dentinal diffusion of hydroxyl ions of various calcium hydroxide pastes. *Braz Dent J.* 1995;6(1):5-9.
83. Padan E, Zilberstein D, Schuldiner S. pH homeostasis in bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1981;650(2-3):151-66.
84. Amorim CV, Aun CE, Mayer MP. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. *Braz Oral Res.* 2004;18(3):242-6.
85. Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M. In vitro evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. *Endod Dent Traumatol.* 1993;9(6):249-53.
86. Menezes MM, Valera MC, Jorge AO, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MN. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J.* 2004;37(5):311-9.
87. Siqueira JF, Jr., Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996;22(12):674-6.
88. Sukawat C, Srisuwan T. A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2002;28(2):102-4.

89. Siqueira JF, Jr., Uzeda M. Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *J Endod.* 1998;24(10):663-5.
90. Siqueira JF, Jr., Magalhaes KM, Rocas IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endod.* 2007;33(6):667-72.
91. Leonardo MR, Bezerra da Silva LA, Utrilla LS, Leonardo Rde T, Consolaro A. Effect of intracanal dressings on repair and apical bridging of teeth with incomplete root formation. *Endod Dent Traumatol.* 1993;9(1):25-30.
92. R. H, Souza V, Nery MJ, Mello W, Bernabe PFE, Otoboni Filho JA. A histological study of the effect of calcium hydroxide in treatment of pulpless teeth of dogs. *J Br Endod Soc.* 1979;12:15-23.
93. Carlo Ceschel G, Bergamante V, Calabrese V, Biserni S, Ronchi C, Fini A. Design and evaluation in vitro of controlled release mucoadhesive tablets containing chlorhexidine. *Drug Dev Ind Pharm.* 2006;32(1):53-61.
94. Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982;53(5):518-23.
95. Almyroudi A, Mackenzie D, McHugh S, Saunders WP. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an in vitro study. *J Endod.* 2002;28(3):163-7.
96. Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J.* 2003;36(4):267-75.
97. Hugo WB, Longworth AR. Some Aspects of the Mode of Action of Chlorhexidine. *J Pharm Pharmacol.* 1964;16:655-62.
98. Kontakiotis E, Nakou M, Georgopoulou M. In vitro study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *Int Endod J.* 1995;28(6):285-9.
99. Basrani BR, Manek S, Sodhi RNS, Fillery ED, Manzur A. Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate. *J Endod.* 2007;33(8):966-9.
100. Kumar S, Patel S, Tadakamadla J, Tibdewal H, Duraiswamy P, Kulkarni S. Effectiveness of a mouthrinse containing active ingredients in addition to chlorhexidine and triclosan compared with chlorhexidine and triclosan rinses on plaque, gingivitis, supragingival calculus and extrinsic staining. *Int J Dent Hyg.* 2013;11(1):35-40.
101. Frank ME, Gent JF, Hettinger TP. Effects of chlorhexidine on human taste perception. *Physiol Behav.* 2001;74(1-2):85-99.

102. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *Braz Dent J.* 2007;18(4):294-8.
103. Lima RK, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2012;45(4):311-6.
104. Sinha N, Patil S, Dodwad PK, Patil AC, Singh B. Evaluation of antimicrobial efficacy of calcium hydroxide paste, chlorhexidine gel, and a combination of both as intracanal medicament: An in vivo comparative study. *J Conserv Dent.* 2013;16(1):65-70.
105. Abbott PV, Hume WR, Pearman JW. Antibiotics and endodontics. *Aust Dent J.* 1990;35(1):50-60.
106. Abbott PV. Selective and intelligent use of antibiotics in endodontics. *Aust Endod J.* 2000;26(1):30-9.
107. Mohammadi Z, Abbott PV. On the local applications of antibiotics and antibiotic-based agents in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J.* 2009;42(7):555-67.
108. Leonardo MR. *Endodontia -Tratamento de Canais Radiculares* 2º ed: Artes Médicas; 2008.
109. Gilad JZ, Teles R, Goodson M, White RR, Stashenko P. Development of a clindamycin-impregnated fiber as an intracanal medication in endodontic therapy. *J Endod.*; 25(11):722-7.
110. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(4):498-521.
111. Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J.* 2001;34(3):184-8.
112. Mohammadi Z. Antibiotics as intracanal medicaments: a review. *J Calif Dent Assoc.* 2009;37(2):98-108.
113. Mittal N, Jain J. Antibiotics as an intracanal medicament in endodontics: A review. *Indian J Dent.* 2013;4(1):29-43.
114. Saber Sel D, El-Hady SA. Development of an intracanal mature *Enterococcus faecalis* biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; an in vitro study. *Eur J Dent.* 2012;6(1):43-50.
115. Grossman LI. Polyantibiotic treatment of pulpless teeth. *J Am Dent Assoc.* 1951;43(3):265-78.
116. Abbott PV. Medicaments: aids to success in endodontics. Part 1. A review of the literature. *Aust Dent J.* 1990;35(5):438-48.

117. Kim ST, Abbott PV, McGinley P. The effects of Ledermix paste on discolouration of mature teeth. *Int Endod J*. 2000;33(3):227-32.
118. Abbott PV, Hume WR, Heithersay GS. Effects of combining Ledermix and calcium hydroxide pastes on the diffusion of corticosteroid and tetracycline through human tooth roots in vitro. *Endod Dent Traumatol*. 1989;5(4):188-92.
119. Seow WK. The effects of dyadic combinations of endodontic medicaments on microbial growth inhibition. *Pediatr Dent*. 1990;12(5):292-7.
120. Tang G, Samaranayake LP, Yip HK. Molecular evaluation of residual endodontic microorganisms after instrumentation, irrigation and medication with either calcium hydroxide or Septomixine. *Oral Dis*. 2004;10(6):389-97.
121. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J*. 1996;29(2):125-30.
122. Gilbert DN, Moellering RC, Jr., Eliopoulos GM, Saag MS. *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy* 2011 41 st ed: Antimicrobial Therapy; 2011.
123. Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod*. 2006;32(2):138-41.
124. Newberry BM, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. The antimicrobial effect of biopure MTAD on eight strains of *Enterococcus faecalis*: an in vitro investigation. *J Endod*. 2007;33(11):1352-4.
125. Davis JM, Maki J, Bahcall JK. An in vitro comparison of the antimicrobial effects of various endodontic medicaments on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2007;33(5):567-9.
126. Jack R, Goodell G. In Vitro Comparison of Coronal Microleakage between Resilon Alone and Gutta-Percha with a Glass-ionomer Intraorifice Barrier Using a Fluid Filtration Model. *J Endod*. 2008;34(6):718-20.
127. Zakizadeh P, Marshall S, Hoover C, Peters O, Noblett W, Gansky S, et al. A Novel Approach in Assessment of Coronal Leakage of Intraorifice Barriers: A Saliva Leakage and Micro-computed Tomographic Evaluation. *J Endod*. 2008;34(7):871-5.
128. Friedman S. Prognosis of initial endodontic therapy. *Endod Top*. 2002;2:59–88.
129. Maloney S, McClanahan S, Goodell G. The Effect of Thermocycling on a Colored Glass Ionomer Intracoronary Barrier. *J Endod*. 2005;31(7):526-8.
130. Sauaia T, Gomes B, Pinheiro E, Zaia A, Ferraz C, Souza Filho F. Microleakage evaluation of intraorifice sealing materials in endodontically treated teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(2):242-6.

131. Barthel CR, Moshonov J, Shuping G, Orstavik D. Bacterial leakage versus dye leakage in obturated root canals. *Int Endod J*. 1999;32(5):370-5.
132. Kersten HW, Moorer WR. Particles and molecules in endodontic leakage. *Int Endod J*. 1989;22(3):118-24.
133. Ferreira AO, Souza GF. *Preparações Orais Líquidas - Formulário, Procedimento de Preparo, Flavorização, Estabilidade e Conservação*. São Paulo: Pharmabooks; 2005.
134. Trissel LA. *Trissel's Stability of Compounded Formulations*. Washington, DC: American Pharmacists Association 2005.
135. Estrela C. *Metodologia Científica - Ciência, Ensino, Pesquisa*. 2º ed: Editora Artes Médicas Ltda.; 2005.
136. Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. 2º ed. São Paulo: Atheneu Editora; 2003.
137. Clinical Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; 6th ed. Wayne (PA): NCCLS; 2007.
138. Roach RP, Hatton JF, Gillespie MJ. Prevention of the ingress of a known virulent bacterium into the root canal system by intracanal medications. *J Endod*. 2001;27(11):657-60.
139. Çiftçi A, Vardarlı DA, Sönmez IŞ. Coronal microleakage of four endodontic temporary restorative materials: An in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108(4):67-70.
140. Koagel S, Mines P, Apicella M, Sweet M. In Vitro Study to Compare the Coronal Microleakage of Tempit UltraF, Tempit, IRM, and Cavit by Using the Fluid Transport Model. *J Endod*. 2008;34(4):442-4.
141. Vanni JR, Santos R, Limongi O, Guerisoli DMZ, Capelli A, Pécora JD. Influence of cervical preflaring on determination of apical file size in maxillary molars: SEM analysis. *Braz Dent J*. 2005;16(3):181-6.
142. Valdrighi L, Biral RR, Pupo J, FJ. S-F. *Técnicas de instrumentação que incluem instrumentos rotatórios no preparo biomecânico dos canais radiculares. Endodontia: Tratamento de canais radiculares*. 3 rd ed. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda; 1998.
143. Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, et al. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent*. 2009;37(1):76-81.
144. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res*. 1987;66(8):1375-9.
145. Reis E. *Estatística descritiva*. 2nd ed. Lisboa: Edições Silabo; 2000.

146. Tabachnick B, Fidell L. Using multivariate statistic. 5th ed. USA: Pearson Education; 2007.
147. Field A. Discovering statistics using SPSS 3rd ed. London: Sage Publications; 2009.
148. Newson J. Basic longitudinal analysis approaches for continuous and categorical variables. In: Routledge, editor. Longitudinal data analysis: a practical guide for researchers in aging, health, and social sciences. New York, 2012. p. 143-79.
149. Taris TW. A primer in longitudinal data analysis. London: Sage; 2000.
150. Asna Ashari M, Fayaz F, Moezzi Ghadim N, Alim Marvesti L, Mehrabi Y. Evaluation of the antimicrobial effects of MTAD, NaOCl against selected endodontic pathogens. Iran Endod J. 2009;4(2).
151. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Rodriguez E, Liebana-Urena J, Espigares-Garcia M. Bactericidal activity of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008;106(2):84-9.
152. Siqueira JF, Jr., Batista MM, Fraga RC, Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. J Endod. 1998;24(6):414-6.
153. Krause TA, Liewehr FR, Hahn CL. The antimicrobial effect of MTAD, sodium hypochlorite, doxycycline, and citric acid on *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2007;33(1):28-30.
154. Wikesjö UM, Baker PJ, Christersson LA, Genco RJ, Lyall RM, Hic S, et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. J Periodontal Res. 1986;21(4):322-9.
155. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. J Endod. 2000;26(10):593-5.
156. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. Int Endod J. 2001;34(6):429-34.
157. Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. Int Endod J. 1996;29(4):235-41.
158. Miyamoto T, Takahashi S, Ito H, Inagaki H, Noishiki Y. Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. J Biomed Mater Res. 1989;23(1):125-33.
159. Vivacqua-Gomes N, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. Int Endod J. 2002;35(9):791-5.

160. Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J*. 2001;34(5):399-405.
161. Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *J Med Microbiol*. 2001;50(11):940-6.
162. Siqueira JF, Jr., Rôças IN, Alves FRF, Silva MG. Bacteria in the apical root canal of teeth with primary apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(5):721-6.
163. Yazdi KA, Sabeti M, Jabalameli F, Eman eini M, Kolahdouzan SA, Slots J. Relationship between human cytomegalovirus transcription and symptomatic apical periodontitis in Iran. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23(6):510-4.
164. Leonardo MR, Silva RABd, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci*. 2004;12:93-8.
165. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(1):86-93.
166. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1998;31(1):1-7.
167. Caroff M, Karibian D, Cavaillon JM, Haefner-Cavaillon N. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2002;4(9):915-26.
168. Siqueira JF, Jr., Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97(5):632-41.
169. Pinheiro CR, Nishiyama CK, Hussne RP, Bortolo MV, Sipert CR, Torres SA. Antimicrobial activity of chlorhexidine and calcium hydroxide gels: an in vitro evaluation. *Perspect Oral Sci*. 2009;1(2):13-8.
170. Salem-Milani A, Balaei-Gajan E, Rahimi S, Moosavi Z, Abdollahi A, Bolourian M, et al. Antibacterial Effect of Diclofenac Sodium on *Enterococcus faecalis*. *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences* 2013;10(1):16-22.
171. Clinical Laboratory Standards Institute. 21st Informational Supplement Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne (PA): NCCLS; 2011. p. M100-S21.
172. Leonardo MR, da Silva LAB, Filho MT, Bonifácio KC, Ito IY. In Vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of Sealers and Pastes Used in Endodontics. *J Endod*. 2000;26(7):391-4.
173. Sipert C, Hussne R, Nishiyama C, Torres S. In vitro antimicrobial activity of fill canal, sealapex, mineral trioxide aggregate, Portland cement and endorez. *Int Endod J*. 2005;38(8):539-43.

174. Arslan S, Ozbilge H, Kaya EG, Er O. In vitro antimicrobial activity of propolis, BioPure MTAD, sodium hypochlorite, and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. Saudi Med J. 2011;32(5):479-83.
175. Ruff ML, McClanahan SB, Babel BS. In vitro antifungal efficacy of four irrigants as a final rinse. J Endod. 2006;32(4):331-3.
176. Zhanel GG, Karlowsky JA, Harding GK, Carrie A, Mazzulli T, Low DE, et al. A Canadian national surveillance study of urinary tract isolates from outpatients: comparison of the activities of trimethoprim-sulfamethoxazole, ampicillin, mecillinam, nitrofurantoin, and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(4):1089-92.
177. Zhanel GG, Hoban DJ, Karlowsky JA. Nitrofurantoin is active against vancomycin-resistant enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(1):324-6.
178. Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine. 3rd ed. Baltimore: William & Wilkins; 1991.
179. Cunha BA. New uses for older antibiotics: nitrofurantoin, amikacin, colistin, polymyxin B, doxycycline, and minocycline revisited. Med Clin North Am. 2006;90(6):1089-107.
180. Linden PK. Treatment options for vancomycin-resistant enterococcal infections. Drugs. 2002;62(3):425-41.
181. Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J Endod. 2004;30(5):315-20.
182. Mohammadi Z, Abbott PV. Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: a review. Aust Endod J. 2009;35(3):131-9.
183. Greenstein G, Polson A. The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: a comprehensive review. J Periodontol. 1998;69(5):507-20.
184. Schilke R, Lisson JA, Bauß O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. Arch Oral Biol. 2000;45(5):355-61.
185. Versiani MA, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Microcomputed tomography analysis of the root canal morphology of single-rooted mandibular canines. Int Endod J. 2013;46(9):800-7.
186. Vertucci F. Root canal morphology and its relationship to endodontic procedures. Endod Top. 2005;10(1):3-29.
187. Ketterl W. The dentin in permanent human teeth. Stoma (Lisb). 1961;14:79-96.
188. Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 2008;41(10):873-82.
189. Siqueira JF, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro. Int Endod J. 1997;30(4):279-82.

190. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res*. 1981;89(4):321-8.
191. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1983;55(3):307-12.
192. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J*. 1985;18(1):35-40.

ANEXOS

ANEXO 1

Documento de aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da
Universidade Estadual de Ponta Grossa (COEP-UEPG) **Protocolo:8876/12.**



PARECER Nº 38/2012

Protocolo: 8876/12

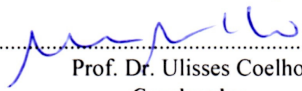
No dia 31 de Maio de 2012, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado **"Ação antibacteriana de diferentes medicações intracanaís frente a Enterococcus faecalis"** de responsabilidade do pesquisador João Carlos Gomes.

Conforme Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a esta Comissão, relatórios sobre andamento da pesquisa, conforme modelo (<http://www.uepg.br/coep/>).

Data para entrega do relatório Final: Novembro de 2012.

Ponta Grossa, 05 de Junho de 2012.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP


Prof. Dr. Ulisses Coelho
Coordenador

ANEXO 2

Esquema de microdiluição (1:2 – 1:512) para a avaliar a CIM de cada solução contra a bactéria *E. faecalis* (E.f.).

PLACA 1 E. f.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CHX	E. f. 1/2	E. f. 1/4	E. f. 1/8	E. f. 1/16	E. f. 1/32	E. f. 1/64	E. f. 1/128	E. f. 1/256	E. f. 1/512	E. f. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
CHX	E. f. 1/2	E. f. 1/4	E. f. 1/8	E. f. 1/16	E. f. 1/32	E. f. 1/64	E. f. 1/128	E. f. 1/256	E. f. 1/512	E. f. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
PC	E. f. 1/2	E. f. 1/4	E. f. 1/8	E. f. 1/16	E. f. 1/32	E. f. 1/64	E. f. 1/128	E. f. 1/256	E. f. 1/512	E. f. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
PC	E. f. 1/2	E. f. 1/4	E. f. 1/8	E. f. 1/16	E. f. 1/32	E. f. 1/64	E. f. 1/128	E. f. 1/256	E. f. 1/512	E. f. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
NIT	E. f. 1/2	E. f. 1/4	E. f. 1/8	E. f. 1/16	E. f. 1/32	E. f. 1/64	E. f. 1/128	E. f. 1/256	E. f. 1/512	E. f. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
NIT	E. f. 1/2	E. f. 1/4	E. f. 1/8	E. f. 1/16	E. f. 1/32	E. f. 1/64	E. f. 1/128	E. f. 1/256	E. f. 1/512	E. f. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
DX	E. f. 1/2	E. f. 1/4	E. f. 1/8	E. f. 1/16	E. f. 1/32	E. f. 1/64	E. f. 1/128	E. f. 1/256	E. f. 1/512	E. f. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
DX	E. f. 1/2	E. f. 1/4	E. f. 1/8	E. f. 1/16	E. f. 1/32	E. f. 1/64	E. f. 1/128	E. f. 1/256	E. f. 1/512	E. f. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria

Legenda:

-  Sem crescimento bacteriano
-  Com crescimento bacteriano
-  Caldo de BHI

ANEXO 3

Esquema de microdiluição (1:2 – 1:512) para a avaliar a CIM de cada solução contra a bactéria *S. aureus* (S.a.).

PLACA 2 S.a.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CHX	S.a. 1/2	S.a. 1/4	S.a. 1/8	S.a. 1/16	S.a. 1/32	S.a. 1/64	S.a. 1/128	S.a. 1/256	S.a. 1/512	S.a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
CHX	S.a. 1/2	S.a. 1/4	S.a. 1/8	S.a. 1/16	S.a. 1/32	S.a. 1/64	S.a. 1/128	S.a. 1/256	S.a. 1/512	S.a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
PC	S.a. 1/2	S.a. 1/4	S.a. 1/8	S.a. 1/16	S.a. 1/32	S.a. 1/64	S.a. 1/128	S.a. 1/256	S.a. 1/512	S.a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
PC	S.a. 1/2	S.a. 1/4	S.a. 1/8	S.a. 1/16	S.a. 1/32	S.a. 1/64	S.a. 1/128	S.a. 1/256	S.a. 1/512	S.a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
NIT	S.a. 1/2	S.a. 1/4	S.a. 1/8	S.a. 1/16	S.a. 1/32	S.a. 1/64	S.a. 1/128	S.a. 1/256	S.a. 1/512	S.a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
NIT	S.a. 1/2	S.a. 1/4	S.a. 1/8	S.a. 1/16	S.a. 1/32	S.a. 1/64	S.a. 1/128	S.a. 1/256	S.a. 1/512	S.a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
DX	S.a. 1/2	S.a. 1/4	S.a. 1/8	S.a. 1/16	S.a. 1/32	S.a. 1/64	S.a. 1/128	S.a. 1/256	S.a. 1/512	S.a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
DX	S.a. 1/2	S.a. 1/4	S.a. 1/8	S.a. 1/16	S.a. 1/32	S.a. 1/64	S.a. 1/128	S.a. 1/256	S.a. 1/512	S.a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria

Legenda:

- Sem crescimento bacteriano
- Com crescimento bacteriano
- Caldo de BHI

ANEXO 4

Esquema de microdiluição (1:2 – 1:512) para avaliar a CIM de cada solução contra a bactéria *E. coli* (E.coli).

PLACA 3 E. coli	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CHX	E. coli 1/2	E. coli 1/4	E. coli 1/8	E. coli 1/16	E. coli 1/32	E. coli 1/64	E. coli 1/128	E. coli 1/256	E. coli 1/512	E. coli 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
CHX	E. coli 1/2	E. coli 1/4	E. coli 1/8	E. coli 1/16	E. coli 1/32	E. coli 1/64	E. coli 1/128	E. coli 1/256	E. coli 1/512	E. coli 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
PC	E. coli 1/2	E. coli 1/4	E. coli 1/8	E. coli 1/16	E. coli 1/32	E. coli 1/64	E. coli 1/128	E. coli 1/256	E. coli 1/512	E. coli 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
PC	E. coli 1/2	E. coli 1/4	E. coli 1/8	E. coli 1/16	E. coli 1/32	E. coli 1/64	E. coli 1/128	E. coli 1/256	E. coli 1/512	E. coli 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
NIT	E. coli 1/2	E. coli 1/4	E. coli 1/8	E. coli 1/16	E. coli 1/32	E. coli 1/64	E. coli 1/128	E. coli 1/256	E. coli 1/512	E. coli 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
NIT	E. coli 1/2	E. coli 1/4	E. coli 1/8	E. coli 1/16	E. coli 1/32	E. coli 1/64	E. coli 1/128	E. coli 1/256	E. coli 1/512	E. coli 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
DX	E. coli 1/2	E. coli 1/4	E. coli 1/8	E. coli 1/16	E. coli 1/32	E. coli 1/64	E. coli 1/128	E. coli 1/256	E. coli 1/512	E. coli 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
DX	E. coli 1/2	E. coli 1/4	E. coli 1/8	E. coli 1/16	E. coli 1/32	E. coli 1/64	E. coli 1/128	E. coli 1/256	E. coli 1/512	E. coli 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria

Legenda:

- Sem crescimento bacteriano
- Com crescimento bacteriano
- Caldo de BHI

ANEXO 5

Esquema de microdiluição (1:2 – 1:512) para avaliar a CIM de cada solução contra a bactéria *P aeruginosa* (P.a.).

PLACA 4 P. a.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CHX	P. a. 1/2	P. a. 1/4	P. a. 1/8	P. a. 1/16	P. a. 1/32	P. a. 1/64	P. a. 1/128	P. a. 1/256	P. a. 1/512	P. a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
CHX	P. a. 1/2	P. a. 1/4	P. a. 1/8	P. a. 1/16	P. a. 1/32	P. a. 1/64	P. a. 1/128	P. a. 1/256	P. a. 1/512	P. a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
PC	P. a. 1/2	P. a. 1/4	P. a. 1/8	P. a. 1/16	P. a. 1/32	P. a. 1/64	P. a. 1/128	P. a. 1/256	P. a. 1/512	P. a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
PC	P. a. 1/2	P. a. 1/4	P. a. 1/8	P. a. 1/16	P. a. 1/32	P. a. 1/64	P. a. 1/128	P. a. 1/256	P. a. 1/512	P. a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
NIT	P. a. 1/2	P. a. 1/4	P. a. 1/8	P. a. 1/16	P. a. 1/32	P. a. 1/64	P. a. 1/128	P. a. 1/256	P. a. 1/512	P. a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
NIT	P. a. 1/2	P. a. 1/4	P. a. 1/8	P. a. 1/16	P. a. 1/32	P. a. 1/64	P. a. 1/128	P. a. 1/256	P. a. 1/512	P. a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
DX	P. a. 1/2	P. a. 1/4	P. a. 1/8	P. a. 1/16	P. a. 1/32	P. a. 1/64	P. a. 1/128	P. a. 1/256	P. a. 1/512	P. a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
DX	P. a. 1/2	P. a. 1/4	P. a. 1/8	P. a. 1/16	P. a. 1/32	P. a. 1/64	P. a. 1/128	P. a. 1/256	P. a. 1/512	P. a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria

Legenda:

- Sem crescimento bacteriano
- Com crescimento bacteriano
- Caldo de BHI

ANEXO 6

Esquema de microdiluição (1:2 – 1:512) para avaliar a CIM de cada solução contra o fungo *C. albicans* (C.a.).

PLACA 5 C. a.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CHX	C. a. 1/2	C. a. 1/4	C. a. 1/8	C. a. 1/16	C. a. 1/32	C. a. 1/64	C. a. 1/128	C. a. 1/256	C. a. 1/512	C. a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
CHX	C. a. 1/2	C. a. 1/4	C. a. 1/8	C. a. 1/16	C. a. 1/32	C. a. 1/64	C. a. 1/128	C. a. 1/256	C. a. 1/512	C. a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
PC	C. a. 1/2	C. a. 1/4	C. a. 1/8	C. a. 1/16	C. a. 1/32	C. a. 1/64	C. a. 1/128	C. a. 1/256	C. a. 1/512	C. a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
PC	C. a. 1/2	C. a. 1/4	C. a. 1/8	C. a. 1/16	C. a. 1/32	C. a. 1/64	C. a. 1/128	C. a. 1/256	C. a. 1/512	C. a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
NIT	C. a. 1/2	C. a. 1/4	C. a. 1/8	C. a. 1/16	C. a. 1/32	C. a. 1/64	C. a. 1/128	C. a. 1/256	C. a. 1/512	C. a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
NIT	C. a. 1/2	C. a. 1/4	C. a. 1/8	C. a. 1/16	C. a. 1/32	C. a. 1/64	C. a. 1/128	C. a. 1/256	C. a. 1/512	C. a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
DX	C. a. 1/2	C. a. 1/4	C. a. 1/8	C. a. 1/16	C. a. 1/32	C. a. 1/64	C. a. 1/128	C. a. 1/256	C. a. 1/512	C. a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria
DX	C. a. 1/2	C. a. 1/4	C. a. 1/8	C. a. 1/16	C. a. 1/32	C. a. 1/64	C. a. 1/128	C. a. 1/256	C. a. 1/512	C. a. 1/ 1024	Caldo	Caldo + Bactéria

Legenda:

-  Sem crescimento bacteriano
-  Com crescimento bacteriano
-  Caldo de BHI

ANEXO 7

Número de UFC's dos diferentes grupos/medicações em função do tempo

Grupo	UFC 21d	UFC 14d	UFC 7d
SM	1200,00	6733,33	43200,00
SM	1133,33	8566,67	20733,00
SM	9166,67	9900,00	26318,52
SM	25033,33	49666,67	40733,33
SM	11200,00	4800,00	25266,67
SM	18766,67	6933,33	20800,00
SM	51666,67	11192,59	22266,67
SM	35000,00	5300,00	19066,67
SM	8566,67	2800,00	21133,33
SM	18466,67	6033,33	23666,67
CHX	92000,00	40,00	116,67
CHX	38000,00	0,00	700,00
CHX	55666,67	23,33	153,33
CHX	128333,33	643,33	506,67
CHX	33666,67	20,00	60,00
CHX	114666,67	6,67	16,67
CHX	70000,00	143,33	120,00
CHX	343333,33	6786,67	140,00
CHX	44666,67	346,67	190,00
CHX	138666,67	210,00	313,33
DX	179333,33	5826,67	2406,67
DX	35766,67	1013,33	3106,67
DX	76333,33	333,33	1051,11
DX	47766,67	1196,67	383,33
DX	60600,00	4240,00	1943,33
DX	406000,00	106,67	146,67
DX	83666,67	293,33	13,33
DX	87666,67	2306,67	1076,67
DX	138666,67	1193,33	230,00
DX	73666,67	320,00	153,33

Resumo do poster publicado no *Abstract book* (página 115:S0946) no congresso Internacional:

91th General Session & Exhibition of the IADR.

Seattle, Washinton, USA, Março de 2013

New intracanal formulations: antimicrobial effect on the external root surface

Authors: Ana Rita Marques da Silva, Elisabete Brasil dos Santos, Fábio André dos Santos, João Carlos Gomes, Manuel Fontes Carvalho

Objectives: to investigate the diffusion through dentine and antimicrobial effect of new intracanal preparations against *E. faecalis*

Methods: 2% clorhexidine digluconate gel, 3% nitrofurantoin gel and 3% doxycycline hydrochloride gel were prepared and placed inside root canal. After seal of apical and coronal openings, the teeth were placed on Muller Hinton agar, where *E. faecalis* was previously seeded. After 24 h of incubation period at 36C, the zone of inhibition of microbial growth was measured.

Results: the antimicrobial properties of these formulations can be ranked from the high to the low effect: 3% doxycycline hydrochloride gel, 2% clorhexidine digluconate gel and 3% nitrofurantoin gel. Significant differences between groups were observed by the Kruskal-Wallis test.

Conclusion: The intracanal formulations with doxycycline and chlorhexidine diffused better into the dentin and reached the outer surface, showing antimicrobial effect against *E. faecalis*.

ANEXO 9

Resumo do poster publicado no *Abstract book* (página 12: R32) no congresso Internacional (16th Biennial Congress of the European Society of Endodontology - Lisboa, Portugal, Setembro de 2013)

blue O followed by PAD (620–640 nm) for 30 s. Microbiological sampling were carried out: S1) field of work S2) upon access S3) after instrumentation, and S4) after PAD. Qualitative analysis of microbial samples was performed by traditional methods and diagnosis by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight (MALDI-TOF).

Results S1 presented two out of 15 samples (13%) with actinomyces species and non-haemolytic streptococci. Microbial flora before instrumentation (S2) was detected in 12 samples out of 15 (80%): (*Corynebacterium* sp., non-haemolytic streptococci, *Staphylococcus epidermidis*, *Bifidobacterium dentium*, *Propionibacterium* sp., anaerobic gram negative rods, *Streptococcus sanguinis* and *E. faecalis*). After instrumentation (S3), two out of 15 samples showed growth (13%) of *Propionibacterium acnes* and *M. luteus* indicating contamination. After PAD (S4), two samples out of 15 (13%) showed growth of *Staphylococcus* species and gram positive rods.

Conclusions Results from the microbiological analysis of root canal samples neither proves nor rejects the effect of photo activated disinfection. MALDI-TOF is a fast and feasible method for performing microbiological diagnosis, but a complete evaluation of the accuracy in diagnosing pathogenic bacteria of endodontic origin needs further investigation.

Acknowledgements The study was supported by a research grant from the dental company CMS Dental, and the Department of Cariology and Endodontics, Copenhagen Dental School, University of Copenhagen, Denmark.

R32

A.R. Silva¹*, E.B. Santos², P.V. Farago³, J.C. Gomes⁴ & M.F. Carvalho¹

¹Department of Endodontics, Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, Porto, Portugal, Departments of ²Microbiology, ³Pharmacology & ⁴Dental Materials, Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil

New intracanal formulations containing doxycycline or chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*

Aim To evaluate the antimicrobial effectiveness of new intracanal preparations against *E. faecalis*.

Methodology Thirty extracted single-rooted human canine teeth were used. The crown was removed and the roots were instrumented using a conventional technique. The teeth were irrigated with 5.25% sodium hypochlorite, and smear layer removed with EDTA. Three groups of 10 teeth each were infected with 10^8 CFU mL⁻¹ of *E. faecalis* for 21 days. The root canals were filled with new intracanal medications based on MTAD, containing 2% chlorhexidine digluconate (CHX) or 3% doxycycline hydrochloride (DX). Ten teeth received no medication (WM). Microbial samples were obtained after irrigating the roots with saline and drying with paper points, after 21 days of contamination: 14 days under the action of the intracanal medications and 7 days after replacing the medications by BHI broth. The samples were homogenized, diluted, plated on BHI agar and incubated for 48 h/36°C. The number of colony forming unit (CFU mL⁻¹) was submitted and analysed statistically.

Results *E. faecalis* was recovered from all teeth after 21 days, being $2.63 \pm 2.77 \times 10^4$ CFU mL⁻¹; $10.6 \pm 9.2 \times 10^4$ CFU mL⁻¹ and $11.90 \pm 10.95 \times 10^4$ CFU mL⁻¹ respectively to WM, CHX and DX groups. After 14 days, the CFU countings decreased considerably in CHX ($0.82 \pm 2.11 \times 10^3$ CFU mL⁻¹) and DX ($4.57 \pm 9.16 \times 10^3$ CFU mL⁻¹) and slightly in group WM ($1.12 \pm 1.37 \times 10^4$ CFU mL⁻¹). With 7 days, the number of CFU equalled the first count in WM group ($2.63 \pm 0.86 \times 10^4$ CFU mL⁻¹), while in the groups with the new

formulations, it continued to decreased to $0.23 \pm 0.22 \times 10^3$ CFU mL⁻¹ to CHX and $1.05 \pm 1.09 \times 10^3$ CFU mL⁻¹ to DX.

Conclusions Both 2% chlorhexidine digluconate gel and 3% doxycycline hydrochloride gel were effective in eliminating *E. faecalis* from the root canal system.

R33

T. Denisova¹*, D. Pasqualini¹, N. Mandras², J. Roana², V. Allizond², P. Crosasso³, M. Burlando³, G. Banche², A.M. Cuffini² & E. Berutti¹

¹Department of Surgical Sciences "Dental School" Endodontics,

²Department of Public Health and Pediatrics & ³Sc Pharmacy, AOU Città della Salute e della Scienza, University of Turin, Turin, Italy

Evaluation of bactericidal efficacy of antibiotic associations and incidence of root discoloration in revascularization therapy

Aim To compare the antibacterial efficacy of four mixture antibiotics on bacteria from infected root canals and the incidence of root discoloration.

Methodology Microbiological analysis: bacterial samples were taken from 29 teeth with a diagnosis of pulpal necrosis with acute or chronic apical periodontitis, using sterile paper points and an anaerobic transport media. In the microbiology laboratory bacterial samples were added to thyoglycollate medium enriched with vitamin K1 and hemin agar plates with four antibiotic groups: TRIMIX (minocycline, ciprofloxacin, metronidazole); TRI-FOSFO (fosfomicin, metronidazole, ciprofloxacin) TRICLARITRO (clarithromycin, metronidazole, ciprofloxacin); BIMIX (ciprofloxacin, metronidazole) and a control group. Bacterial load reduction in percentage and survival index observed and compared in both group (Kruskal-Wallis and post-hoc Dunn's test, $P < 0.05$). Discoloration test: 65 root canals of extracted human single-rooted teeth were divided after preparation into five groups and brought into contact with the antibiotics for 3 weeks.

Results Microbiological analysis: median of bacterial load reduction in percentage was: TRIMIX (97.06%); TRI FOSFO (99.42%); TRI CLARITRO (99.98%); BIMIX (88.46%). Median survival index: TRIMIX (1029); TRI FOSFO (1006); TRI CLARITRO (1); BIMIX (1115). Difference between groups was statistically significant ($P < 0.0001$). TRICLARITRO demonstrated superior antibacterial efficacy compared to TRIMIX and BIMIX ($P < 0.001$), with no differences compared to TRIFOSFO ($P > 0.05$).

Discoloration test: only TRIMIX (minocycline, ciprofloxacin, metronidazole) caused a strong discoloration of the roots. In the other four groups the colour of the roots remained unchanged.

Conclusions More studies are needed to evaluate the ability of new MIX to penetrate dentinal tubules in the complex internal canal system and eliminate the bacterial infection. The protocol can be changed in future to avoid some disadvantages and complications of revascularization therapy.

R34

H.E. Guldass¹*, T. Ozurk², A.D. Kececi¹, E. Sesli Cetin² & B. Ureyen Kaya¹

Department of ¹Endodontics, Faculty of Dentistry, & ²Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Suleyman Demirel University, Isparta, Turkey

The efficacy of Glycyrrhiza glabra extract and Cetrime against *Enterococcus faecalis* compared to NaOCl: a preliminary study

Aim To evaluate the antibacterial efficacy of Glycyrrhiza glabra extract and Cetrime on *Enterococcus faecalis* compared to



ANEXO 10

Artigo científico com o título:

***New intracanal formulations containing doxycycline or chlorhexidine
against Enterococcus faecalis***

Aceite para publicação na revista

“The Journal of Contemporary Dental Practice”



**New intracanal formulations containing doxycycline or chlorhexidine against
*Enterococcus faecalis***

Authors: Ana Rita Silva¹, Shelon Cristina Souza Pinto², Elizabete Brasil dos Santos², Fábio André dos Santos², Paulo Vitor Farago², João Carlos Gomes², Irene Pina-Vaz¹, Manuel Fontes Carvalho¹

¹Department of Endodontics, School of Dentistry, University of Porto, 4200-393 Porto, Portugal, anaritavlis@gmail.com

²State University of Ponta Grossa, Postgraduate Program in Dentistry, CEP 84030-900, Uvaranas, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

Corresponding Author :

Ana Rita Marques da Silva

Rua Comandante Sacadura Cabral, nº22 – 3030-333 Coimbra – Portugal

Telef: (+351) 912481678

e-mail: anaritavlis@gmail.com

Abstract

The present study aims to evaluate the antimicrobial effect of two new intracanal preparations against *E. faecalis*. Thirty single-rooted human canine teeth were used. The crowns were removed and the roots were instrumented using a conventional technique. Three groups of ten teeth each were infected with 10^8 CFU/ mL of *E. faecalis* for 21 days. The root canals were filled with new intracanal medications containing 3% doxycycline hydrochloride (DX) or 2% chlorhexidine digluconate (CHX). Ten teeth received no medication (NM) – negative control. Microbial samples were obtained 21 days after contamination: 14 days under the effect of the intracanal medications and 7 days after replacing the medications by BHI broth. The samples were homogenized, diluted, seeded on BHI agar and incubated for 48h/36°C. The number of colony forming units (CFU/ mL) was obtained and analyzed statistically. All intracanal dressings significantly reduced the number of bacterial cells in the root canal after 14 days with medication. After the period with 7 days with BHI broth, the CFU counts of *E. faecalis* remained at low values. However, the NM group showed a significant increase of CFU in this period to similar values of the initial contamination. 3% doxycycline hydrochloride gel and 2% chlorhexidine digluconate gel were effective to eliminate *E. faecalis* from the root canal system.

Key words: Endodontics, *Enterococcus faecalis*, Doxycycline, Chlorhexidine

Introduction

The specie *Enterococcus faecalis* is one of the pathogens that shows high resistance to a wide range of antimicrobial agents used in root canal treatment. This microorganism is a Gram-positive bacterium that can be found in the oral cavity and

is frequently isolated from root filled teeth with persistent lesions¹ leading to the failure of endodontic therapy.

Once these bacteria have infected the dentinal tubules, their eradication is very difficult even with the use of several irrigation solutions and medications during endodontic treatment. This could be due to their ability to invade and attach to the dentinal tubules as organized biofilms².

The aim of root canal treatment is to disinfect and to eliminate the bacteria from the root canal system, or at least reduce the bacterial counts to a very low level so it could be possible to prevent periapical disease or the need for treatment³. In order to achieve this purpose, several antiseptic irrigation solutions and intracanal medications are often used during the root canal treatment in combination with mechanical instrumentation.

Despite the great variety of intracanal medications, the search for a potent substance with a high antimicrobial spectrum and low cytotoxicity continues to be a relevant issue.

A promising candidate is chlorhexidine gluconate, which is commonly used in periodontics due to its broad spectrum antibacterial activity⁴. Some studies propose its use in endodontics too, as an irrigant or intracanal dressing^{5, 6}. Its antibacterial spectrum includes most of the microorganism present in the oral cavity, such as Gram positive and Gram negative bacteria, bacterial spores, lipophilic viruses, yeasts and dermatophytes⁷⁻⁹. Chlorhexidine has also the ability to inhibit dentin matrix metalloproteinase⁷, presents a high substantivity^{8, 10} and is more effective in eliminating *E. faecalis* from dentinal tubules than calcium hydroxide^{11, 12}.

Tetracyclines are a group of broad-spectrum antibiotics effective against a wide range of microorganisms. They are bacteriostatic, which provides a more advantageous use since there is no bacterial lysis and consequently no release of antigenic by-products such as endotoxins¹³. Besides the antibacterial activity, tetracyclines have anti-inflammatory properties with several intracellular and extracellular effects¹⁴. These antibiotics have already been used in endodontics as irrigants of root-end cavity and as intracanal medicaments¹⁵. A new irrigant solution, MTAD¹³, containing a mixture of 3% doxycycline, 4,25% citric acid and a detergent (0.5% Polysorbate 80)¹⁶ was also introduced and some studies suggest that MTAD has a potent antibacterial effect against *E. faecalis*^{17, 18}. MTAD presents an acidic condition (pH=2.15), which could explain the changes on the structure of the dentinal tubules, helping its diffusion through them¹⁹.

After these considerations, the aim of this study was to create an innovative intracanal dressing gels based on the formulation of MTAD containing doxycycline, along with another one containing chlorhexidine, to compare their ability to eliminate *E. faecalis* from root canals.

Material and Methods

The same operator has prepared all the medications and the substances tested were:

- 3% doxycycline hydrochloride gel - DX (3,33g doxycycline hydrochloride; 0,1g sodium metabisulfite; 50% propylene glycol; 0,5% polysorbate 80; 0,76g NaH₂PO₄; 1,94g Na₂HPO₄, and 43.37g 2% hydroxyethylcellulose gel) – DX - 2% clorhexidine digluconate gel - CHX (10g chlorhexidine digluconate; 50% propylene glycol; 0,5% polysorbate 80 and 39,5g 2% hydroxyethylcellulose gel).

The specie of microorganism used was *E. faecalis* (ATCC 29203) that was grown on Brain Heart Infusion Agar plates (BHI). Gram staining and colony morphology were used to confirm the purity of the positive cultures of *E. faecalis*.

The method followed in this study was a modification of the one described by Gomes *et al.* and Lima *et al.*^{20, 21}. Thirty extracted human canine teeth were selected and the presence of a single root canal was confirmed radiographically. Curettes were used to remove soft tissues and debris from teeth surfaces and when any kind of anomaly, such as a fracture, was detected, the tooth was excluded from this study. Teeth crowns were removed 3 mm above the cemento-enamel junction and the roots were standardized to a length of 15 mm with a water-cooled diamond saw. A size 10K-file was introduced into each canal until it could be seen at the apical foramen. The working length was established subtracting 1mm from this measurement (14 mm). In order to preserve patency, the same K-file was used to recapitulate the canal 1 mm beyond its length between each file. The anatomic diameter of apical foramen was sized using manual K-files (Dentsply/Maillefer), beginning with size 10 files, inserted until the working length was reached. Files' sizes were progressively increased until obtaining an instrument that bound at the working length. The size of the instrument obtained was recorded for each root²². The roots were enlarged with K-files, three numbers up to apical file size determined at the working length

The teeth were instrumented using the crown-down principles, combining Gates Glidden drills with K-files. The cervical two-thirds (10mm) of the canals were prepared using K-files 25 to 35, followed by a size 2 Gates Glidden bur and then by a size 3,1 mm shorter. The apical stop was established using files three numbers up to the anatomic diameter file. At each file change the root canals were irrigated with 1 mL of 5,25% NaOCl. After mechanical preparation, the teeth were rinsed with 5mL of

17% ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) solution for 3 minutes, to remove the smear layer, followed by 1 mL 5,25% of NaOCl and finally with 5mL of saline solution.

The teeth were placed into glass tubes containing 5mL of Brain Heart Infusion (BHI) broth, autoclaved at 121°C, for 30 min and then incubated at 36°C for 24h to confirm sterility^{8, 10}. Once confirmed, the teeth were randomly divided in three groups according to their anatomic diameter. Two milliliters of BHI were removed from the tubes and replaced by 2 mL of a suspension of *E. faecalis* (ATCC □29203), containing 10⁸ cells/mL, standardized by spectrophotometry and McFarland scale. The tubes were again incubated at 36°C for 21 days.

In order to avoid saturation of the media during this contamination period of 21 days, 2 mL of contaminated BHI were replaced by 2mL of freshly prepared broth, every 2 days. After the contamination period the specimens were fixed in a sterile aluminium apparatus and were irrigated with sterile saline. They were dried with 3 paper points, calibrated with the last file used along the full length of the canal (14 mm). The third paper points were kept inside the canal for 60 seconds and were used to recover *E. faecalis* from the root canal. They were transferred to vials containing 1mL of saline solution, homogenized and 100 µL seeded on BHI agar plates. The number of CFU/mL was obtained after incubation at 36°C/48h.

Intracanal dressings and *E. faecalis* recovery from root canal

After the first bacterial sampling, the root canals were filled with the proposed medicaments. The intracanal dressings DX and CHX were applied using a syringe and needle with the specimens fixed in the aluminum apparatus. The medication excess was removed and the coronal and apical communications were sealed with

sterile sticky wax. In the negative control (NM), the coronal and apical communications of the root canals with no medication were also sealed with sterile sticky wax. The teeth were then fixed with sticky wax at the bottom of the wells of the cell culture plates. The wells were filled with BHI broth up to the dental-enamel junction, covered with humid sterile gauzes and incubated at 36°C for 14 days (Figure 1)^{20, 23}.

The second sampling was made by the same method after 14 days of intracanal dressing. Before collection of the samples and under aseptic conditions, the specimens were fixed in the sterile aluminium apparatus, irrigated with sterile saline, neutralized with a solution of 0.5% Tween 80% in 0.07% soy lecithin and again irrigated with sterile saline²³. After fixing the specimens in the 24-well cell culture plates with sterile sticky wax, the canals were filled with BHI broth and the coronal surface was sealed with the sticky wax. The wells were filled with BHI broth up to the dental-enamel junction and covered with humid sterile gauzes and the plates were incubated at 36°C for 7 days, when the third group of samples was obtained, using the same procedures applied to both anterior samplings.

The data were statistically analysed using analysis of variance with repeated measures (ANOVA) to indicate differences among the experimental groups.

Results

Table 1 shows the number of CFU/mL of *E. faecalis* recovered from root canals after the 3 experimental periods. After 21 days of contamination, *E. faecalis* was recovered from all teeth.

The mean values of CFUs decreased in all groups after 14 days with intracanal dressings. However, the difference was higher in the groups with intracanal dressings DX and CHX, when compared to the NM group.

After 7 days with BHI inside the root canals, the CFU numbers remained low in the groups DX and CHX, while in the NM group the CFU counting returned to the initial level. The Kinetics description of these 3 moments of the experiment can be seen in the Figure 2.

In order to test if these changes over time were statistically significant, a repeated measure ANOVA, assuming the significant value of at least .05 was used. The assumption of normality and homogeneity of variance was also tested, using Mauchly's sphericity test, allowing us to proceed with correction of Greenhouse-Geisser.

The repeated measures ANOVA showed a significant difference between CFU during the different moments of time ($p < 0.0001$), and that even the interaction between time and groups was significant ($p = 0.012$). Looking inside each group, all revealed significant differences (NM $p = 0.010$, DX $p = 0.031$ and CHX $p < 0.001$). Between the first and the second moment all groups exhibited a reduction of the amount of CFU, where it was noticed a significant difference between DX ($p = 0.999$) and CHX ($p = 0.015$). Yet in the NM group the difference was not enough to indicate statistical significance. After the second moment the CHX and DX group reduced the number of CFU, but it wasn't enough to indicate statistical difference, however in the NM it was revealed a significant increase of UFC ($p = 0.006$).

Discussion

In the present study, after 14 days with medication with doxycycline or chlorhexidine, the numbers of *E. faecalis* dropped off substantially, indicating that both intracanal dressing gels presented similar antibacterial efficacy, without significant difference between these groups. This antimicrobial activity against *E. faecalis* has also been demonstrated by others authors, both through an irrigating solution with Doxycycline (MTAD) or a chlorhexidine dressing^{24, 25}.

After seven days with BHI broth inside the root canal, the DX and CHX groups continued to present a decrease in CFU numbers. These results suggest some substantivity, which is the prolonged and gradual release of a material at therapeutic levels in a substrate, higher than would be expected from a simple deposition mechanism. In the root canal treatment it is important to use irrigants and specially dressings with a residual antimicrobial activity, to prevent re-infection and improve the outcome of the treatment²⁶.

In the NM group the number of CFU has increased significantly after the same period, equalling the number of the initial counting.

The use or not of BHI broth outside the roots is not universal^{20, 23}. We choose to fill the well with BHI because some literature suggests that bacteria within radicular dentinal tubules may use the tissue fluid from periodontal ligament and alveolar bone to get the nutrients that they need to survive^{1, 27}.

The significant difference observed in the numbers of CFU between the three groups after the 21 days of contamination, could be explained by the complex variability of the root canal structure²⁸, since this method has already been used in other studies^{20, 21}.

In this study, DX was very effective in eliminating *E. faecalis* from the root canal system. The efficacy of this antibiotic has been demonstrated in a new root canal irrigant solution called MTAD^{13, 29}. Our formulation, as in MTAD, contains also a detergent (Tween 80) that decreases the surface tension and improves its penetration through the dentinal tubules¹⁸. Although the DX was very similar to MTAD, its consistency has been changed, together with the pH, turning it from acidic to neutral. This property is important because although DX will remain in the root canal for a longer time, a higher pH will avoid dentin structure damage^{33, 34}.

The recommended concentration of chlorhexidine in endodontics is 2%^{30, 31} and it can be used in both forms, liquid or gel³². Chlorhexidine gel is soluble, easy to remove and does not interfere with the sealing ability of obturation cements³³. Chlorhexidine has some disadvantages, such as the precipitate that forms with the interaction with sodium hypochlorite³⁴ and the deposition of extrinsic stains in the teeth³⁵. In this way it is also advisable to look for alternatives.

This study has just tested single specie of microorganism (*E. faecalis*) to evaluate the intracanal medication. Nevertheless, the results of this investigation indicate that the new intracanal formulation with doxycycline was so effective in eliminating *E. faecalis* from the root canal as the 2% chlorhexidine and it could be considered an alternative of intracanal dressings.

Conclusion

The discoveries of this study confirmed the efficacy of new formulations of intracanal medicament with 3% doxycycline or 2% chlorhexidine in eliminating *E. faecalis* from root canals system, and suggest their use as possible intracanal dressings.

References

1. G Sundqvist, D Figdor, S Persson and U Sjogren. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 1998;85(1):86-93.
2. P Chivatxaranukul, SG Dashper and HH Messer. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*. 2008;41(10):873-882.
3. JF Siqueira, Jr. and IN Rocas. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *Journal of endodontics*. 2008;34(11):1291-1301 e1293.
4. G Greenstein, C Berman and R Jaffin. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *Journal of periodontology*. 1986;57(6):370-377.
5. CC Ferraz, BP Gomes, AA Zaia, FB Teixeira and FJ Souza-Filho. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *Journal of Endodontics*. 2001;27(7):452-455.
6. P Ohara, M Torabinejad and JD Kettering. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. *Endodontics & dental traumatology*. 1993;9(3):95-100.
7. R Gendron, D Grenier, T Sorsa and D Mayrand. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 1999;6(3):437-439.
8. AA Khademi, Z Mohammadi and A Havaee. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Australian endodontic journal : the journal of the Australian Society of Endontology Inc*. 2006;32(3):112-115.
9. Z Mohammadi and PV Abbott. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *International Endodontic Journal*. 2009;42(4):288-302.
10. FR Dametto, CC Ferraz, BP Gomes, AA Zaia, FB Teixeira and FJ de Souza-Filho. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2005;99(6):768-772.
11. D Kandaswamy, N Venkateshbabu, D Gogulnath and AJ Kindo. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*. 2010;43(5):419-423.
12. P Neelakantan, K Sanjeev and CV Subbarao. Duration-dependent susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide and chlorhexidine gel used as intracanal medicament: an in vitro evaluation. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2007;104(4):e138-141.
13. M Torabinejad, AA Khademi, J Babagoli, Y Cho, WB Johnson, K Bozhilov, J Kim and S Shabahang. A new solution for the removal of the smear layer. *Journal of Endodontics*. 2003;29(3):170-175.
14. AN Sapadin and R Fleischmajer. Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2006;54(2):258-265.
15. A Molander and G Dahlen. Evaluation of the antibacterial potential of tetracycline or erythromycin mixed with calcium hydroxide as intracanal dressing against *Enterococcus faecalis* in vivo. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2003;96(6):744-750.
16. M Torabinejad and WB Johnson. Irrigation solution and methods for use. US Patent 20030235804. United States: Dentsply International, York, PA;2003.
17. B Kamberi, D Bajrami, M Stavileci, S Omeragiq, F Dragidella and F Kocani. The Antibacterial Efficacy of Biopure MTAD in Root Canal Contaminated with *Enterococcus faecalis*. *ISRN dentistry*. 2012;2012:390526.
18. S Shabahang and M Torabinejad. Effect of MTAD on *Enterococcus faecalis*-contaminated root canals of extracted human teeth. *Journal of Endodontics*. 2003;29(9):576-579.

19. FR Tay, DH Pashley, RJ Loushine, MD Doyle, WT Gillespie, RN Weller and NM King. Ultrastructure of smear layer-covered intraradicular dentin after irrigation with BioPure MTAD. *Journal of Endodontics*. 2006;32(3):218-221.
20. BP Gomes, SF Souza, CC Ferraz, FB Teixeira, AA Zaia, L Valdrighi and FJ Souza-Filho. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *International Endodontic Journal*. 2003;36(4):267-275.
21. RK Lima, JM Guerreiro-Tanomaru, NB Faria-Junior and M Tanomaru-Filho. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*. 2012;45(4):311-316.
22. JR Vanni, R Santos, O Limongi, DMZ Guerisoli, A Capelli and JD Pécora. Influence of cervical preflaring on determination of apical file size in maxillary molars: SEM analysis. *Brazilian dental journal*. 2005;16(3):181-186.
23. RJ Delgado, TH Gasparoto, CR Sipert, CR Pinheiro, IG Moraes, RB Garcia, CM Bramante, AP Campanelli and N Bernardineli. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*. 2010;36(8):1389-1393.
24. I Portenier, T Waltimo, D Orstavik and M Haapasalo. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *Journal of Endodontics*. 2006;32(2):138-141.
25. Z Mohammadi and PV Abbott. Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: a review. *Australian endodontic journal : the journal of the Australian Society of Endodontology Inc*. 2009;35(3):131-139.
26. G Greenstein and A Polson. The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: a comprehensive review. *Journal of periodontology*. 1998;69(5):507-520.
27. ET Pinheiro, BP Gomes, CC Ferraz, EL Sousa, FB Teixeira and FJ Souza-Filho. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003;36(1):1-11.
28. MA Versiani, JD Pecora and MD Sousa-Neto. Microcomputed tomography analysis of the root canal morphology of single-rooted mandibular canines. *International Endodontic Journal*. 2013.
29. MG Singla, A Garg and S Gupta. MTAD in endodontics: an update review. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2011;112(3):e70-76.
30. BP Gomes, CC Ferraz, ME Vianna, VB Berber, FB Teixeira and FJ Souza-Filho. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*. 2001;34(6):424-428.
31. JF Siqueira, Jr., MM Batista, RC Fraga and M de Uzeda. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *Journal of Endodontics*. 1998;24(6):414-416.
32. M Zehnder. Root canal irrigants. *Journal of Endodontics*. 2006;32(5):389-398.
33. N Vivacqua-Gomes, CC Ferraz, BP Gomes, AA Zaia, FB Teixeira and FJ Souza-Filho. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. *International Endodontic Journal*. 2002;35(9):791-795.
34. BR Basrani, S Manek, RNS Sodhi, E Fillery and A Manzur. Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate. *Journal of endodontics*. 2007;33(8):966-969.
35. S Kumar, S Patel, J Tadakamadla, H Tibdewal, P Duraiswamy and S Kulkarni. Effectiveness of a mouthrinse containing active ingredients in addition to chlorhexidine and triclosan compared with chlorhexidine and triclosan rinses on plaque, gingivitis, supragingival calculus and extrinsic staining. *International Journal of Dental Hygiene*. 2013;11(1):35-40.

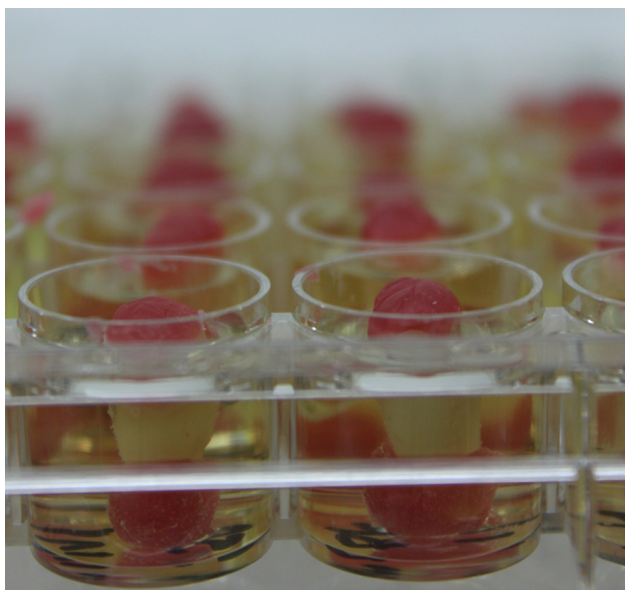


Figure 1 - Cell culture plates filled with BHI broth and specimens fixed with sticky wax.

Bacterial samplings*	Experimental Groups (CFU/mL x 10 ⁴)		
	No Medication (NM) (n=10)	Doxycycline (n=10)	Chlorhexidine (n=10)
1° (21 days)	2,63 ± 2,77	11,89 ± 10,95	10,59 ± 9,17
2° (14 days)	1,12 ± 1,37	0,17 ± 0,19	0,08 ± 0,21
3° (7 days)	2,63 ± 0,86	0,11 ± 0,11	0,02 ± 0,02

* Time F (1,009) = 25,087; p = 0,000
Time x Group/Medication F (2,018) = 5,231; p = 0,012

1st - 21 days of contamination with *E. faecalis*; 2nd - 14 days filled with the medications and 3rd - 7 days filled with BHI.

Table 1 – Mean value of CFU's (CFU/mL) of the two intracanal medicaments during the three moments of the experiment.

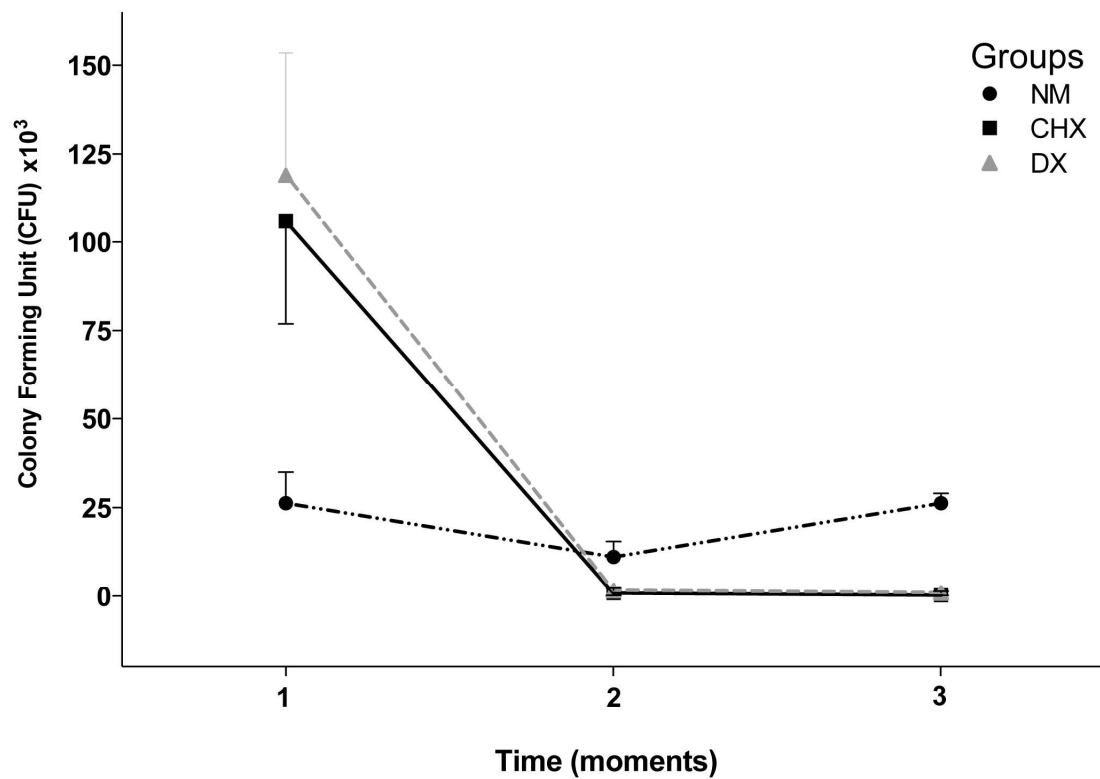


Figure 2 – Kinetics of Groups/Medications versus time: **(1)** 1st moment – after 21 days of contamination with *E. faecalis*, **(2)** 2nd moment – after 14 days with the intracanal medication, **(3)** 3rd moment – after 7 days with BHI broth. Repeated measures, ANOVA, to analyze time and the interaction time versus group.

ANEXO 11

Artigo científico com o título:

***Antimicrobial effect and ability to diffuse through dentin of new
intracanal formulations with nitrofurantoin or doxycycline***

Submetido à revista

“Brazilian Dental Journal”

Antimicrobial effect and ability to diffuse through dentin of new intracanal formulations with nitrofurantoin or doxycycline

Short title: New intracanal dressings study

Ana Rita SILVA

Elizabete Brasil. SANTOS

Shelon Cristina Souza PINTO

João Carlos GOMES

Irene Pina VAZ

Manuel Fontes CARVALHO

Department of Endodontics, University of Oporto, Oporto, Portugal,

Department of Dentistry Ponta Grossa State University, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

Author responsible:

Name: Ana Rita Marques da Silva

Address: Rua Comandante Sacadura Cabral, nº22 – 3030-333 Coimbra – Portugal

Phone: (+351) 912481678

E-mail: anaritavlis@gmail.com

SUMMARY

Aim: To investigate the *in vitro* antimicrobial effect and the diffusion of new intracanal medications in the external root surface, against *E. faecalis*. **Methods:** A 2% chlorhexidine gel (CHX) was used as a positive control. The medications tested were a placebo gel (PC) and the new formulations that include on their composition either 3% nitrofurantoin (NIT) or 3% doxycycline hydrochloride (DX). *E. faecalis* was firstly seeded on the agar plates. The new formulations were tested using the traditional agar diffusion test (ADT) and an adapted agar diffusion method (AADM), where the teeth were filled with the medications and placed on the agar. After 24h of incubation, the zones of microbial inhibition growth were measured. **Results:** In the ADT, the larger inhibitory zones were seen in DX, followed by CHX and NIT. In the AADM test the new formulations were left to diffuse through the dentinal tubules and reach the agar surfaces seeded with *E. faecalis*, only DX and CHX showed antimicrobial effect. The PC showed no antibacterial effect in both tests. Significant differences between groups were observed by the Kruskal-Wallis test ($\chi^2=47.126$; $p<.001$). **Conclusion:** The new intracanal formulations with DX and NIT have demonstrated antimicrobial effect against *E. faecalis*, but only DX was able to diffuse through the dentinal tubules and exert antimicrobial effect outside the roots.

Key words: endodontics, *enterococcus faecalis*, doxycycline, nitrofurantoin

INTRODUCTION

Endodontic infections are essentially polymicrobial and in most of cases the microorganisms grow in the root canal system as sessile biofilms (1). A variety of bacterial species can be isolated from primary periapical infections. For the secondary infections, one of the species most often isolated is *Enterococcus faecalis*, which is seen as an opportunistic pathogen and a natural inhabitant of the oral cavity that survives as a mono-infection (2).

Despite the action of the chemo-mechanical preparation with antimicrobial irrigating solutions, some microorganisms including *E. faecalis* may survive in the root canal system. The use of an intracanal dressing that could act through the root canal system would certainly improve the outcome of the endodontic treatment (3).

The intracanal medication should have a broad antimicrobial spectrum, should be able to diffuse through the dentinal tubules and all ramifications of the root canal system including the areas that neither the instruments nor the irrigating solution can reach, and should not be cytotoxic to live tissues (4). Several substances have been tested and improved in order to achieve the ideal results. Calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) is believed to have most of the properties of an ideal root canal dressing due to its high pH (5). However, it is not equally effective against all species of microorganism found in the root canal system (6).

Chlorhexidine gluconate has been used in endodontics as an irrigant. Recently, due to its antimicrobial effect and adsorption to dental hard tissues, it has also been suggested as an intracanal medication (7). Authors have demonstrated that chlorhexidine is more effective than $\text{Ca}(\text{OH})_2$ when used against *E. faecalis* (7).

Antibiotics have been used in endodontics and dental traumatology systemically and locally. Although local application of antibiotics could cause side effects such as discoloration (8), this may be a more effective way in delivering the antibiotics (9) and reducing the bacterial load inside the root canal system. This effectiveness is due to the fact that it is not dependent on circulation to reach the infected sites with compromised vasculature (10).

Recently, an alternative root canal irrigant – MTAD, a mixture of 3% doxycycline, 4,25% citric acid and 0,5% polysorbate 80 detergent (Tween 80) – was introduced as a final irrigant in the root canal preparation (11). Studies concluded that it is a promising irrigating solution due to its biocompatibility (12) and clinical effectiveness against *E. faecalis* (13, 14) and other microorganisms (15).

However, regarding the antimicrobial component of MTAD (doxycycline), some authors claim that nitrofurantoin, a synthetic nitrofurantoin commonly used in urinary tract infections where *E. faecalis* is usually implicated (16, 17), has demonstrated a better efficacy than doxycycline against the same bacteria (17, 18).

The purpose of this experiment was to create an intracanal medication based on the formulation of MTAD. The better efficacy of nitrofurantoin to treat *E. faecalis* infections when compared with doxycycline led us to choose it for the new formulation. This study allows us to compare the antimicrobial effect of each new formulation against *E. faecalis* and their ability to diffuse through dentine.

MATERIALS AND METHODS

The antibacterial effect of the new formulations against *E. faecalis* was determined by an agar diffusion test (ADT) and an adapted agar diffusion method (AADM) through the external surface of the roots.

Agar diffusion test (ADT)

The methodology for the ADT was adapted from Vianna & Gomes. 2009. A 24h culture of *E. faecalis* (ATCC 29203) in BHI agar was used to prepare a bacterial suspension containing 10^8 viable bacterial cells/mL. The suspension was standardized at 0.5 in the spectrophotometer and McFarland scale. A sterile swab was used to plate *E. faecalis* suspension on Muller Hinton agar plates. After drying for 10 minutes at 36°C, a sterile glass tube was used to create wells of 4mm diameter and 4mm depth in the agar. The wells were filled with the substances described below:

- 2% *Clorhexidine* (CHX) (10g clorhexidine digluconate; 50% propylene; 0,5% Tween 80 and 39,5g 2% natrosol gel)
- Placebo gel (PC) (50% propylene; 0,5% Tween 80; 0,76g sodium phosphate monobasic anhydrous (NaH_2PO_4); 1,94g disodium phosphate anhydrous (Na_2HPO_4), and 41.8g natrosol gel).
- 3% *Nitrofurantoin* (NIT) (3,33g nitrofurantoin; 50% propylene; 0,5% Tween 80; 0,76g NaH_2PO_4 ; 1,94g Na_2HPO_4 , and 41.8g 2% natrosol gel)
- 3% Doxycycline (DX)- (3,33g doxycycline hydrochloride; 0,1g sodium metabisulfite; 50% propylene; 0,5% Tween 80; 0,76g NaH_2PO_4 ; 1,94g Na_2HPO_4 , and 43.37g 2% natrosol gel);

After incubation at 36°C for 24h, the zones of inhibition of microbial growth were measured and recorded. The inhibitory zone was considered the smaller distance between the outer margin of the well and the beginning of the microbial growth. The mean and standard deviation were used to compute the differences in efficacy of the tested substances.

Adapted Agar diffusion method (AADM)

The methodology adopted for the AADM was a modification of one previously described by Gomes *et al.* 2003 and 2009. Fifty extracted human canine teeth were selected and the presence of a single root canal was confirmed radiographically. Curettes were used to remove

soft tissues and debris from teeth surfaces and if any kind of anomaly, such as a fracture, was detected, the tooth was excluded from this study. Teeth crowns were removed 3 mm above the cemento-enamel junction and the roots were standardized to a length of 15 mm with a water-cooled diamond saw. A size 10K-file (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Switzerland) was introduced into each canal until it could be seen at the apical foramen. The working length was established subtracting 1mm from this measurement (14 mm). In order to preserve patency, the same K-file was used to recapitulate the canal 1 mm beyond its length between each file. The anatomic diameter of apical foramen was sized using manual K-files, beginning with size 10 files, inserted until the working length was reached. Files' sizes were progressively increased until an instrument that bound at the working length was obtained. The size of the instrument obtained was recorded for each root (19). The roots were enlarged with K-files three numbers up to apical file size determined at the working length.

The teeth were instrumented using the crown-down principles, combining Gates Glidden drills (Dentsply/Maillefer) with K-files. The cervical two-thirds (10mm) of the canals were prepared using K-files 25 to 35, followed by a size 2 Gates Glidden bur and then by a size 3, 1mm shorter. The apical stop was established using files three numbers up to the anatomic diameter file. At each file change the root canals were irrigated with 1mL of 5,25% NaOCl. After mechanical preparation, the teeth were rinsed with 5mL of 17% ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) solution for 3 minutes, to remove the smear layer, followed by 1 mL 5,25% of NaOCl and finally with 5mL of saline solution.

The teeth were sterilized in individual tubes containing 5mL of Brain Heart Infusion Broth (BHI) and the process confirmed by overnight incubation of the specimens at 36°C. Then, they were divided in 5 groups of 10 teeth each, according to the substance used as intracanal dressing (20), which were the same described in the agar diffusion test (ADT): a) Teeth sealed without medication (WM - negative control); b) CHX - positive control, c) PC; d) NIT and e) DX.

Immediately after filling the root canals, the foramen and the pulp chamber were sealed with wax. The Muller Hinton agar plates were first seeded with a swab with the *E. faecalis* 10⁸ cells/mL suspension and the teeth were then placed inside. The plates were kept 2h at room temperature to allow the diffusion of the agents through the dentinal tubules and the agar, and then incubated at 36°C for 48h. After this period the inhibition zones of bacterial growth were

measured, considering the shortest distance from the outer margin of the tooth to the initial growth.

The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to verify any significant difference between groups. In the post-hoc procedures the Tamhane test was used for multiple group comparisons, allowing the assumption that variances are not equal and the adjustment for type I errors.

RESULTS

Agar diffusion test (ADT)

Figure 1 and table 1 show that, with the exception of the PC, all formulations tested had potential to eliminate *E. faecalis*. DX was the one that demonstrated the larger inhibition zone followed by NIT and CHX.

Adapted Agar diffusion method (AADM)

Figure 2 shows the area of microbial inhibition of the different intracanal medications, through the external root surface, against *E. faecalis*. Only CHX and DX showed an area of inhibitory zones, of 11,17 ($\pm 2,17$) mm and 5,52($\pm 2,9$) mm respectively, while PC and NIT did not inhibit *E. faecalis* growth as in the negative control (WM). The Kruskal-Wallis test ($\chi^2=47.126$; $p<.001$) revealed statistical differences between the groups (Figure 3). In a multiple comparisons post-hoc procedure it was possible to observe significant differences between CHX and DX and the other groups.

DISCUSSION

In both tests (ADT and AADM) DX presented the larger inhibitory zones, demonstrating a better antibacterial effect and/or a better diffusion ability comparing to NIT and CHX. NIT was not able to exert any antimicrobial action on the external root surface (AADM) during the incubation period. With the methodology used in this study, when the mean area of microbial inhibition is equal to zero it means either the medication did not presented any antibacterial effect or the substances were not able to diffuse through the agar or through the dentinal

tubules. When ADT was applied, DX, NIT and CHX were effective in inhibiting *E. faecalis* growth, as also showed by other authors (16).

Although the size of the inhibition zones would indicate activity against the microorganisms, their effectiveness will depend on many factors such as molecular size, solubility and diffusion of the materials through the agar medium, the sensitivity of the drug, bacterial source, the number of bacteria inoculated, pH of the substrate in plates, agar viscosity, storage conditions of the agar plates, time of incubation and the metabolic activity against the microorganisms (6, 21).

In the test AADM the presence of the cementum layer could affect the diffusion of substances to the agar. However, some authors observed that the presence or absence of cementum layer does not interfere significantly in the inhibition zones (20).

The NIT formulation presented a higher viscosity than DX. Although it demonstrated antimicrobial effect against *E. faecalis* in the ADT, this factor could have prevented it from reaching the external root surface, explaining the lack of diffusion observed in AADM. Therefore, we understand that the methods applied in this study could be used to analyze and verify the existence of antibacterial activity and diffusion ability through dentinal tubules, but further studies are required.

The detergent used in intracanal formulations, Tween 80, is responsible for reducing surface tension allowing an increased wetting effect, and consequently a better penetration of intracanal medication into dentinal tubules and irregular spaces of difficult access (22). Since NIT presented still a high viscosity, we believe that it may be beneficial to increase the detergent weight percentage in the medication to observe better antimicrobial results outside the roots.

Since the low pH of MTAD induces dentin demineralization (23), in this study a phosphate buffer was used to induce a neutral pH, with the goal of making it possible for the new formulations to be inside the root canals for longer periods.

The main purpose of this study was to create an intracanal medication based on MTAD with good activity against *E. faecalis* (13, 14), respecting the requirements of an ideal medication.

Chlorhexidine 2% is used as the gold standard in *in house assay* due to its broad spectrum and effectiveness against *E. faecalis* (24). For the CHX group, a proportion of 2% was chosen

because the effectiveness using this concentration is well established. In the new formulations containing DX or NIT, the concentration of 3% was used since they were based on MTAD solution.

The use of antibiotics in irrigant solutions opened the possibility of creating new formulations of intracanal dressings using these products.

In the present study, the formulation with DX was the most effective against *E. faecalis*, showing larger inhibition zones than NIT. Nitrofurantoin is effective against many Gram positive and negative bacteria, including *E. faecalis* (16, 17) and doxycycline is a tetracycline broad-spectrum antibiotic, effective against a wide range of microorganisms (22). In some studies, DX showed low activity against most strains of *E. faecalis* (25). These results could also be explained by the use of a strain more susceptible to doxycycline than nitrofurantoin and this characteristic deserves further investigation.

Despite the limitations of this study, such as the fact that *in vitro* models present different conditions of infections from *in vivo* and the fact that we are using a mono-infection (*E. faecalis*) assay to test the intracanal medication, the results are promising and indicate the efficacy of a new intracanal formulation proposed by us. Further studies are needed to corroborate our findings and expand the efficacy of these formulations.

CONCLUSIONS

The study suggests that both the new formulation with DX or NIT presented antimicrobial effect against *E. faecalis*. However, only the DX was able to reach the dentinal tubules. These new formulations can be promising as intracanal dressing, increasing the outcome of the endodontic treatment in persistent infections

RESUMO

Objetivo: Investigar a ação antimicrobiana *in vitro* e a difusão de novas medicações intracanal frente a *E. faecalis*, na superfície externa da raiz.

Metodologia: Um gel de clorexidina a 2% foi usado como controle positivo. As medicações testadas consistiram de um gel placebo (PC) e duas novas formulações que incluíram na sua composição nitrofurantoína a 3% (NIT) ou doxiciclina a 3% (DX). As novas formulações

foram testadas usando-se o tradicional teste de difusão em agar (ADT) e um método de difusão adaptado (AADM), onde os dentes foram preenchidos com a medicação e colocados sobre o agar Muller Hinton previamente semeados com suspensões padronizadas de *E. faecalis*. Após 24h de incubação foram medidas as áreas de inibição de crescimento bacteriano em ambos os testes.

Resultados: No teste ADT, a maior área de inibição foi registrada para DX, seguida pela CHX e NIT. No teste AADM onde as novas formulações foram deixadas para difundir através dos túbulos dentinários e alcançar a superfície do agar semeada com *E. faecalis*, apenas DX e CHX demonstraram ação antimicrobiana. PC não demonstrou comportamento antimicrobiano em nenhum dos testes. Foram observadas diferenças significativas entre os grupos através do teste Kruskal-Wallis ($\chi^2=47.126$; $p<.001$).

Conclusão: As novas formulações intracanaís contendo DX e NIT demonstraram ação antimicrobiana quando em contacto com *E. faecalis*, entretanto apenas DX teve capacidade de difundir através dos túbulos dentinários e exercer ação antimicrobiana fora das raízes.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Prof. Dr. Fábio André Santos for his help with the statistical analysis and Prof. Dr. Paulo Vitor Farago for technical support.

REFERENCES

1. Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM. Eradication of endodontics infection by instrumentation and irrigation and irrigation solutions. *Endod Topics* 2005;10:77-102.
2. Siqueira Jr JF, Rocas IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:85-94.
3. Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J* 2007;52:S64-82.
4. Alencar AH, Leonardo MR, Silva LA, Silva RS, Ito IY. Determination of the p-monochlorophenol residue in the calcium hydroxide + P-monochlorophenol combination used as an intracanal dressing in pulpless teeth of dogs with induced chronic periapical lesion. *J Endod* 1997;23:522-4.

5. Torneck CD, Moe H, Howley TP. The effect of calcium hydroxide on porcine pulp fibroblasts in vitro. *J Endod* 1983;9:131-6.
6. Gomes BP, Ferraz CC, Garrido FD, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, et al. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *J Endod* 2002;28:758-61.
7. Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J* 2003;36:267-75.
8. Day PF, Duggal MS, High AS, Robertson A, Gregg TA, Ashley PF, et al. Discoloration of teeth after avulsion and replantation: results from a multicenter randomized controlled trial. *J Endod* 2011;37:1052-7.
9. Mohammadi Z. Antibiotics as intracanal medicaments: a review. *J Calif Dent Assoc* 2009;37:98-108.
10. Gilad JZ, Teles R, Goodson M, White RR, Stashenko P. Development of a clindamycin-impregnated fiber as an intracanal medication in endodontic therapy. *J Endod* 1999;25:722-7.
11. Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, et al. A new solution for the removal of the smear layer. *J Endod* 2003;29:170-5.
12. Singla MG, Garg A, Gupta S. MTAD in endodontics: an update review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:e70-6.
13. Torabinejad M, Shabahang S, Apécio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. *J Endod* 2003;29:400-3.
14. Davis JM, Maki J, Bahcall JK. An in vitro comparison of the antimicrobial effects of various endodontic medicaments on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007;33:567-9.
15. Tong Z, Zhou L, Kuang R, Lv H, Qu T, Ni L. In vitro evaluation of MTAD and nisin in combination against common pathogens associated with root canal infection. *J Endod* 2012;38:490-4.
16. Al-Zarouni M, Senok A, Al-Zarooni N, Al-Nassay F, Panigrahi D. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: in vitro susceptibility to fosfomycin, nitrofurantoin and tigecycline. *Med Princ Pract* 2012;21:543-7.
17. Butt T, Leghari MJ, Mahmood A. In-vitro activity of nitrofurantoin in enterococcus urinary tract infection. *J Pak Med Assoc* 2004;54:466-9.
18. Zhanel GG, Laing NM, Nichol KA, Palatnick LP, Noreddin A, Hisanaga T, et al. Antibiotic activity against urinary tract infection (UTI) isolates of vancomycin-resistant enterococci (VRE): results from the 2002 North American Vancomycin Resistant Enterococci Susceptibility Study (NAVRESS). *J Antimicrob Chemother* 2003;52:382-8.
19. Vanni JR, Santos R, Limongi O, Guerisoli DMZ, Capelli A, Pécora JD. Influence of cervical preflaring on determination of apical file size in maxillary molars: SEM analysis. *Braz J Dent* 2005;16:181-6.
20. Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, et al. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent* 2009;37:76-81.
21. Salem-Milani A, Balaei-Gajan E, Rahimi S, Moosavi Z, Abdollahi A, Bolourian M, et al. Antibacterial Effect of Diclofenac Sodium on *Enterococcus faecalis*. *Journal Dent (Tehran)* 2013;10:16-22.
22. Torabinejad M, Johnson WB. Irrigation solution and methods for use. US Patent 20030235804. United States: Dentsply International, York, PA; 2003.
23. Wikesjö UM, Baker PJ, Christersson LA, Genco RJ, Lyall RM, Hic S, et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *J Period Res* 1986;21:322-9.
24. Sinha N, Patil S, Dodwad PK, Patil AC, Singh B. Evaluation of antimicrobial efficacy of calcium hydroxide paste, chlorhexidine gel, and a combination of both as intracanal medicament: An in vivo comparative study. *J Conserv Dent* 2013;16:65-70.
25. Cunha BA. New uses for older antibiotics: nitrofurantoin, amikacin, colistin, polymyxin B, doxycycline, and minocycline revisited. *Med Clin North Am* 2006;90:1089-107.

FIGURES AND TABLES LEGENDS

Table 1 – Mean and standart desviation of Inhibition zone (mm) of *E. faecalis* growth produced by the intracanal medication used in the experimental groups.

Figure 1 - Inhibition zones of microbial growth in ADT of the intracanal dressings against *E. faecalis* (CHX – 2% chlorhexidine; PC – placebo; NIT – 3% nitrofurantoin and DX – 3% doxycycline)

Figure 2- Inhibition haloes (mm) formed by the intracanal medications studied agaisnt *E. faecalis* after diffusion through dentinal tubules. a) WM - without medication; CLX – 2% chlorhexidine and DX – 3% doxycycline; b) PC – placebo and NIT – 3% nitrofurantoin.

Figure 3 - Box-plot graphic of inhibition haloes (mm) formed by the different intracanal medications after 24h of diffusion through canal dental system. Kruskal-Wallis test ($\chi^2=47.126$; $p<.001$). WM - without medication; CLX – 2% chlorhexidine; PC – placebo; NIT – 3% nitrofurantoin and DX – 3% doxycycline.

TABLES AND FIGURES

Table 1

Intracanal medication	Inhibition zones (mm)
CHX	20,70 ($\pm$ 0,30)
PC	0 ($\pm$ 0,0)
NIT	24,33 ($\pm$ 0,10)
DX	36,27 ($\pm$ 0,24)

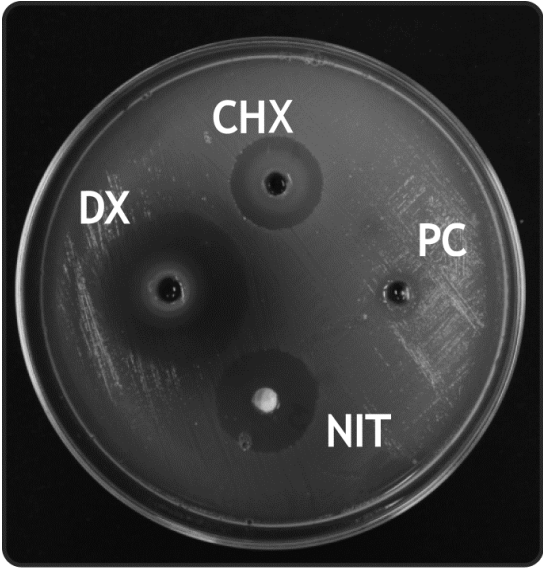


Figure 1

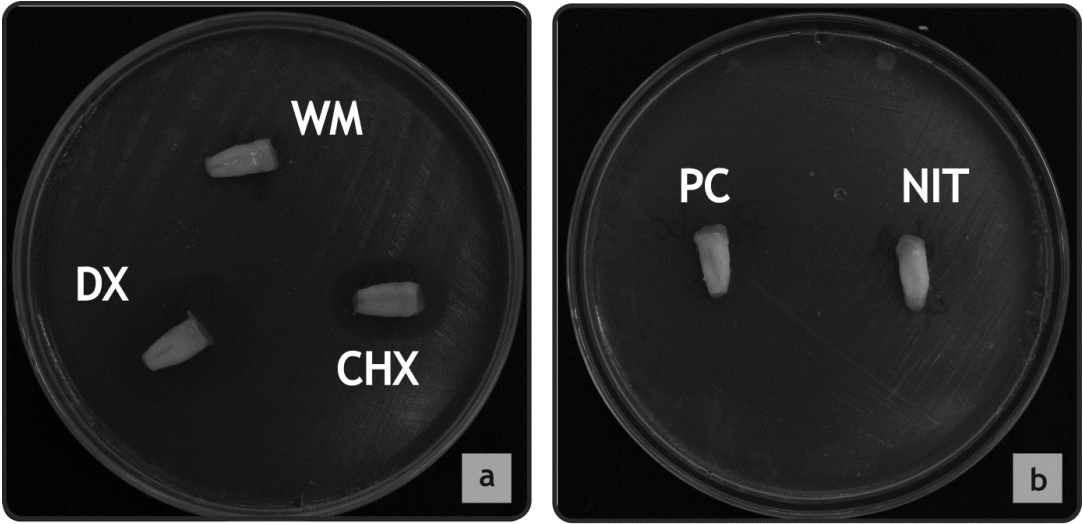


Figure 2

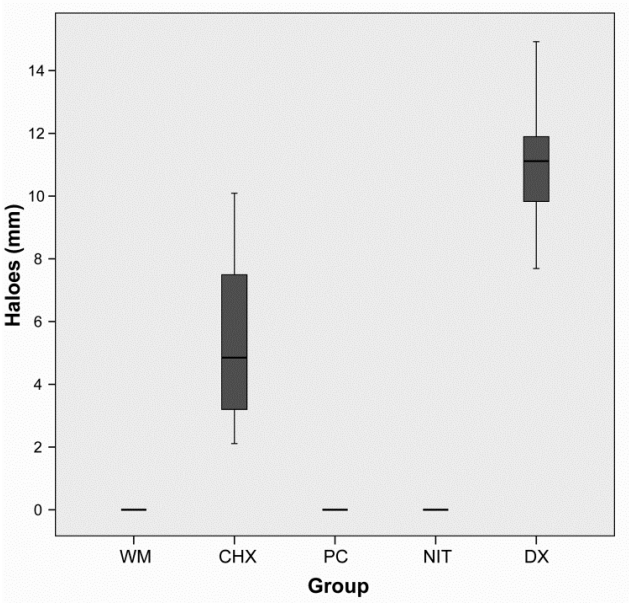


Figure 3

