

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA**

DANIEL RODRIGO HERRERA MORANTE

***Uncaria tomentosa* NA DESINFECÇÃO DE CANAIS RADICULARES
CONTAMINADOS POR PATÓGENOS ENDODÔNTICOS**

**PONTA GROSSA
2010**

DANIEL RODRIGO HERRERA MORANTE

***Uncaria tomentosa* NA DESINFECÇÃO DE CANAIS RADICULARES
CONTAMINADOS POR PATÓGENOS ENDODÔNTICOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia - Área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador Prof^a. Dra. Elizabete Brasil dos Santos

**PONTA GROSSA
2010**

Ficha catalográfica elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

H565u Herrera Morante, Daniel Rodrigo
 Uncaria tomentosa na desinfecção de canais radiculares
 contaminados por patógenos endodônticos. / Daniel Rodrigo Herrera
 Morante, 2010.
 63f.

 Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração :
 Clínica Integrada)- Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Orientadora: Profa. Dra. Elizabete Brasil dos Santos

 1. Substância auxiliar. 2. Medicação intracanal. 3. . *Uncaria*
 tomentosa. I. Santos, Elizabete Brasil dos. II. T

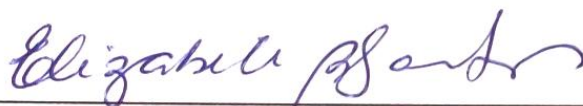
CDD : 617.67

DANIEL RODRIGO HERRERA MORANTE

***Uncaria tomentosa* NA DESINFECÇÃO DE CANAIS RADICULARES
CONTAMINADOS POR PATÓGENOS ENDODÔNTICOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia - Área de concentração em Clínica Integrada.

Ponta Grossa, 12 de Março de 2010



Prof.ª. Dr.ª. Elizabete Brasil dos Santos – Orientadora
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof.ª. Dr.ª. Maria Ângela Naval Machado
Universidade Federal do Paraná

DADOS CURRICULARES

Daniel Rodrigo Herrera Morante

NASCIMENTO 05.05.1976	Lima, Perú
FILIAÇÃO	Eulogio Puclio Herrera Fernández-Dávila Maria del Rosário Morante Falconi
1995 – 2002	Curso de Graduação em Odontología Facultad de Odontología da Universidad San Martín de Porres. Lima – Perú.
2007 – 2008	Curso de Aperfeiçoamento em Odontologia Geral Avançada. Facultad de Estomatología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Lima – Perú.
2009 – 2010	Membro ativo do International Asociation of Dental Research (IADR).
2008 – 2010	Membro ativo da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (SBPqO).
2008 – 2010	Curso de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração em Clínica Integrada. Nível Mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Ponta Grossa, PR – Brasil.

Dedico este trabalho,

*ao amor da minha vida, a mulher que
fez crescer em mim o verdadeiro e
grande amor, minha esposa, Yileng;*

*quando namorados, nos amamos e
chegamos ao Brasil; no Brasil,
noivamos e nos amamos ainda mais;
agora esposos, nos amaremos por
sempre, onde a vida nos leve, sempre
juntos;*

*obrigado por ter acreditado em mim,
por ter me apoiado sempre, por ser
minha fortaleza, minha bússola, meu
todo, por sempre “minha rainha”.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida mesma, vida que me permite desfrutar de experiências inesquecíveis e gratificantes, como as vividas nestes últimos dois anos no Brasil.

À memória do meu pai, Eulógio, que com seu exemplo de vida inspirou-me para lutar pelos meus sonhos.

A minha mãe, Charito, pelo incentivo e apoio que sempre têm me dado em cada nova aventura que decido empreender em procura de alcançar meus sonhos.

A meu irmão, Mo, por sempre ter me apoiado e acreditado em mim; Mo, eu sou dentista por você, seu trabalho me inspira.

A minha irmã, Milí, por todo seu carinho e apoio, adoro você.

Ao Prof. Dr. João Carlos Gomes, pela amizade e simpatia, pela oportunidade incomparável que me brindou para realizar o Mestrado na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Elizabete Brasil dos Santos, pela sua bela amizade, pelo seu espírito alegre que contagia por onde for, pela confiança ainda quando as coisas pareciam não dar certo, pela sua dedicação e valiosa contribuição acadêmica na orientação desta dissertação. Todo o que vem de você sempre é bom demais.

À Coordenação do Curso de Mestrado em Odontologia da UEPG, na pessoa da Prof^a. Dr^a. Osmara Maria Mongruel Gomes, pelo seu carinho, dedicação e preocupação pelos “filhos” estrangeiros.

Aos Professores Dr. Alessandro Loguercio e Dr^a. Alessandra Reis pelos conhecimentos, tempo, apoio, amizade, e incentivo na pesquisa que me brindaram.

À Prof^a. Dr^a. Janaína Habib Jorge, pela amizade, simpatia, alegria e otimismo que transmite, podendo fazer que uma idéia torne-se um projeto, e um projeto uma realidade.

Ao Prof. Dr. Witoldo Kozłowski Jr. pela amizade, simpatia, e conhecimentos adquiridos nossas prolongadas conversas.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Berger, pela dedicação com que transmite suas experiências nas aulas de Endodontia.

Aos Professores do Curso de Mestrado em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Abraham Lincoln Calixto, Benjamim de Melo Carvalho, Denise Stadler Wambier, Fábio André dos Santos, Gibson Luiz Pilatti, Gislaïne Denise Czulskiak, Leide Mara Schmidt, Nara Hellen Campanha, Stella Kossatz Pereira, Ulisses Coelho; pelo apoio, pelo aprendido em cada aula.

A minha família “estrangeira”, colegas e amigos, Alexandra, Eugênio, Lucho e Miguelito, por todo o apoio e companheirismo, obrigado por fazer que o mundo não tenha fronteiras, e sim laços de amizade.

Aos meus colegas de turma e amigos brasileiros, Eliana, Rafa, Yasmíne, Carlos, , Giovanna, Juliana, Sândianara, Tatiana, Tamí, João Paulo, Rícelia e Stella, por todo o apoio, confiança, gratos e inesquecíveis momentos aprendendo do Brasil ao seu lado.

Ao Sr. Noel Pires, pela sua amizade e carinho, fazendo da Residencial Pires um lar para ter sempre no coração.

À Secretária do Curso de Mestrado em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Morgana, por toda sua atenção e colaboração brindada nas atividades do programa.

À Luzia, do laboratório de Microbiologia pela sua colaboração e apoio técnico, na realização deste trabalho.

À Ivaní, da Biblioteca do Campus Uvaranas da UEPG, pela sua valiosa colaboração na procura de artigos que fazem parte da revisão deste trabalho.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho.

Fonte do resumo: HERRERA DR. ***Uncaria tomentosa* na desinfecção de canais radiculares contaminados por patógenos endodônticos**. Ponta Grossa, 2010. 62 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração – Clínica Integrada). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR-Brasil.

***Uncaria tomentosa* NA DESINFECÇÃO DE CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS POR PATÓGENOS ENDODÔNTICOS**

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de testes *in vitro*, o potencial antimicrobiano de quatro substâncias auxiliares sobre microrganismos comumente isolados nos casos de insucesso do tratamento endodôntico, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*; Foram testados: gel de digluconato clorexidina a 2% (CHX), gel de *Uncaria tomentosa* a 2% (UG), gel de CHX e UG a 2% em partes iguais (1:1) (CHX+UG) e Natrosol (NAT). Primeiramente foi utilizado o método de difusão em ágar. Os valores coletados pela mensuração dos halos de inibição foram analisados estatisticamente com ANOVA de um critério e o teste de Tukey ($p<0,05$). A substância auxiliar que mostrou-se mais efetiva sobre *E. faecalis* e *C. albicans* foi CHX+UG, seguida da CHX e UG. Frente a *S. aureus*, CHX+UG apresentou um efeito semelhante ao mostrado pela CHX e UG. O Grupo NAT não mostrou capacidade de inibição sobre nenhum dos microrganismos. A segunda parte do estudo visou avaliar a capacidade antimicrobiana das substâncias auxiliares em dentina contaminada. Foi utilizado um total de 120 pré-molares inferiores distribuídos em 4 grupos para cada microrganismo ($n=10$). Foram feitas coletas microbiológicas antes do preparo químico-mecânico (PQM) (S1), após PQM (S2), e após 7 dias com medicação intracanal (MIC) (S3). A contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL) foi analisada estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney ($p<0,05$). Em (S2), todos os grupos apresentaram uma redução significativa de UFC/mL em comparação com S1. Nos grupos CHX, UG e CHX+UG não houve a presença de UFC/mL; para S3, os espécimes contaminados com *E. faecalis* dos grupos CHX e NAT apresentaram carga microbiana significativamente maior à apresentada em S2; porém o grupo CHX+UG manteve o valor obtido em S2, valor que foi semelhante ao obtido pelo grupo UG. Os espécimes contaminados com *S. aureus* e *C. albicans* dos grupos CHX, UG e CHX+UG mantiveram os valores negativos de S2, assim não apresentaram UFC/mL. Concluiu-se que a associação CHX+UG apresenta capacidade de inibição do crescimento microbiano sobre *E. faecalis* e *C. albicans* superior ao mostrado por CHX e UG. Frente a *S. aureus*, CHX e UG apresentaram efeito semelhante. Concluiu-se também que CHX, UG e CHX+UG foram eficazes na desinfecção do canal após PQM, porém após 7 dias só os grupos que receberam CHX+UG e UG como MIC, mantiveram os canais livres de UFC de *E. faecalis*. Assim, UG só ou em associação com CHX, se mostrou eficaz na desinfecção de canais radiculares.

Palavras-chave: Substância auxiliar. Medicação intracanal. *Uncaria tomentosa*.

Fonte do resumo: HERRERA DR. ***Uncaria tomentosa* na desinfecção de canais radiculares contaminados por patógenos endodônticos**. Ponta Grossa, 2010. 62 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração – Clínica Integrada). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR-Brasil.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Uncaria tomentosa* AGAINST ENDODONTIC PATHOGENS IN INFECTED ROOT CANALS

ABSTRACT

The aim of this *in vitro* study was to evaluate antimicrobial activity of four auxiliary substances against *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, commonly isolated microorganisms in endodontic failure cases, on which was tested: 2% chlorhexidine gel (CHX), 2% *Uncaria tomentosa* gel (UG), 2% CHX gel and UG in equal parts (1:1) (CHX + UG) and Natrosol (NAT). Firstly, the agar diffusion method was used; the inhibition halos were measured and significance was determined using ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$). The more effective auxiliary substance against *E. faecalis* and *C. albicans* was CHX + UG, followed by CHX and UG. Against *S. aureus*, CHX+UG had a similar effect to that shown by CHX and UG. The NAT group had not effect against any microorganism. Secondly was evaluating antimicrobial activity of auxiliary substances in infected dentin. It was used a total of 120 pre-molars, which were divided for each organism into 4 groups ($n = 10$). Microbiological samples were collected before the chemomechanical preparation (PQM) (S1), after PQM (S2) and after 7 days of intracanal medication (MIC) for each group (S3). The count of colony forming units (CFU/mL) was statistically analyzed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test ($p < 0.05$). In S2, all groups showed a significant reduction of CFU/mL compared with S1. In groups CHX, CHX+UG and UG there was no CFU/mL. In S3, specimens contaminated with *E. faecalis* of the CHX and NAT groups had significantly higher microbial load compared with S2, but CHX+UG group kept the value obtained in S2, similar to that obtained by UG group. Specimens contaminated with *S. aureus* and *C. albicans* of the CHX, CHX+UG and UG groups remained the negative values of S2. With results obtained it was concluded, that the association CHX+UG has the ability to inhibit microbial growth of *E. faecalis* and *C. albicans* higher than shown by CHX and UG. Against *S. aureus*, CHX and UG had a similar effect. It was also found that CHX, CHX+UG and UG were effective in disinfecting the canal after PQM, but only after 7 days the groups that received CHX+UG and UG as MIC, remained root canals free of CFU of *E. faecalis*. Thus, UG alone or in combination with CHX, was effective in disinfecting root canals.

Keywords: Auxiliary substance. Intracanal medicament. *Uncaria tomentosa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Semeadura das suspensões dos microrganismos e preparo para método de difusão em ágar.....	33
Figura 2	- Mensuração dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano.....	34
Figura 3	- Radiografia em sentido vestibulo-lingual e mesio-distal de pré-molar inferior.....	35
Figura 4	- Máquina de corte calibrada, vista frontal e lateral do corte da porção coronal do pré-molar.....	35
Figura 5	- Padronização do canal radicular.....	36
Figura 6	- Remoção da <i>smear layer</i> formada durante a padronização do canal...	37
Figura 7	- Contaminação dos espécimes.....	38
Figura 8	- Plataforma de aço inoxidável para disposição dos espécimes.....	40
Figura 9	- Seqüência de limas e brocas utilizadas no PQM.....	41
Figura 10	- Espécimes com a MIC, fixados em placas para incubação.....	44
Gráfico 1	- Protocolo de irrigação dos espécimes durante o PQM.....	43
Quadro 1	- Distribuição dos espécimes (n) por grupo.....	38
Tabela 1	- Média e desvio padrão dos halos de inibição do crescimento (mm) dos microrganismos avaliados.....	47
Tabela 2	- Média e desvio padrão das UFC/mL de <i>Enterococcus faecalis</i> nas diferentes coletas microbiológicas.....	47
Tabela 3	- Média e desvio padrão das UFC/mL de <i>Staphylococcus aureus</i> nas diferentes coletas microbiológicas.....	47
Tabela 4	- Média e desvio padrão das UFC/mL de <i>Candida albicans</i> nas diferentes coletas microbiológicas.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	O PAPEL DOS MICRORGANISMOS NAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS.....	16
2.2	MICROBIOTA DO INSUCESSO ENDODÔNTICO.....	17
2.3	SUBSTÂNCIAS AUXILIARES NO TRATAMENTO ENDODÔNTICO.....	20
2.4	O USO DE PRODUTOS NATURAIS NA ENDODONTIA.....	26
2.5	<i>Uncaria tomentosa</i> Willd D.C.....	27
3	PROPOSIÇÃO.....	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	CEPAS DE MICRORGANISMOS.....	32
4.2	PREPARO DAS SUBSTÂNCIAS AUXILIARES A SEREM UTILIZADAS.	32
4.2.1	Gel de digluconato de clorexidina a 2%.....	32
4.2.2	Gel de <i>Uncaria tomentosa</i> a 2%.....	32
4.2.3	Gel de digluconato de clorexidina e <i>Uncaria tomentosa</i> a 2%.....	32
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	32
4.3.1	Ação antimicrobiana das substâncias auxiliares através do método de difusão em ágar.....	32
4.3.2	Ação antimicrobiana das substâncias auxiliares em dentina infectada....	34
4.3.2.1	Obtenção, seleção e padronização dos espécimes.....	34
4.3.2.2	Esterilização dos espécimes.....	37
4.3.2.3	Grupos experimentais.....	37
4.3.2.4	Contaminação dos espécimes.....	38
4.3.2.5	Coleta microbiológica inicial.....	39
4.3.2.6	Técnica de instrumentação.....	40
4.3.2.7	Irrigação dos canais radiculares.....	41

4.3.2.8	Coleta microbiológica após PQM.....	42
4.3.2.9	Medicação intracanal.....	42
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4.4.1	Ação antimicrobiana das substâncias auxiliares através do método de difusão em ágar.....	44
4.4.2	Ação antimicrobiana das substâncias auxiliares em dentina infectada.....	44
5	RESULTADOS	46
5.1	AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS SUSTÂNCIAS AUXILIARES ATRAVÉS DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	46
5.2	AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS SUSTÂNCIAS AUXILIARES EM DENTINA INFECTADA.....	46
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXO A: Aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa.....	62
	ANEXO B: Aprovação da emenda no protocolo de pesquisa 14195/08 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa.....	63

1 INTRODUÇÃO

A importância das bactérias no desenvolvimento e na perpetuação das doenças pulpares e perirradiculares foi confirmada através do estudo clássico de Kakehashi et al.¹ (1965).

A remoção de tecido necrótico, a eliminação das bactérias presentes no canal e dentina radicular, assim como a prevenção da re-contaminação após o tratamento são os objetivos da terapia endodôntica. Estes objetivos são atingidos através do preparo químico-mecânico (PQM) do sistema de canais radiculares, do selamento e obturação, e da colocação de uma restauração definitiva (Schilder² 1974).

A etiologia associada ao insucesso endodôntico pode ser multifatorial. Embora os casos de fracasso do tratamento endodôntico possam estar associados a fatores não microbianos, endógenos ou exógenos, tais como ausência ou inadequada restauração coronal; técnica e condições operatórias; assim como às condições inerentes de cada paciente; são os microrganismos e seus produtos os principais responsáveis pelo insucesso no tratamento (Sjögren et al.³ 1997, Molander et al.⁴ 1998).

Infelizmente, devido à sua complexa anatomia, restos orgânicos, inorgânicos e microrganismos não podem ser completamente removidos do sistema de canais radiculares, mostrando-se com frequência resistentes aos tratamentos e protocolos clínicos empregados (Byström, Sundqvist⁵ 1981, Byström et al.⁶ 1985, Peters⁷ 2004). Os gêneros microbianos mais persistentes incluem *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. (Gomes et al.⁸ 1996) e a espécie *Candida albicans* (Sena et al.⁹ 2006).

É importante a utilização de substâncias antimicrobianas auxiliares com o intuito de se promover uma significativa redução dos depósitos bacterianos nos canais radiculares, além de auxiliar na lubrificação do canal radicular durante a ação de corte dos instrumentos, na remoção de *smear layer*, na desinfecção, dissolução do exsudado, dissolução do tecido pulpar necrosado e pré-dentina (Byström, Sundqvist¹⁰ 1983).

Uma grande variedade de irrigantes e medicações intracanaís tem sido utilizada para atingir os objetivos da terapia endodôntica (Bystrom, Sundqvist⁵ 1981, Ørstavik, Haapasalo¹¹ 1990, Peters, Wesselink¹² 2002). A substância auxiliar mais utilizada na endodontia, como medicação intracanal desde o ano 1920, e ainda em vigência é o hidróxido de cálcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$, porém, este não tem se mostrado capaz de manter os canais livres de microrganismos (Haapasalo, Ørstavik¹³ 1987, Gomes et al.¹⁴ 2006).

O digluconato de clorexidina (CHX) é um agente antimicrobiano de amplo espectro que tem mostrado maior efetividade nos tratamentos endodônticos em comparação com o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Jeansonne, White¹⁵ 1994, White et al.¹⁶ 1997, Ferguson et al.¹⁷ 2002, Mohammadi, Abbott¹⁸ 2009). A efetividade antimicrobiana da CHX 2% (solução ou gel) tem sido amplamente estudada e comparada ao irrigante por excelência na endodontia, o hipoclorito de sódio (NaOCl), ambos apresentando atividade antimicrobiana muito similar sobre microrganismos isolados dos sistemas de canais radiculares (Vianna et al.¹⁹ 2004). Além de ser efetiva sobre algumas espécies e cepas de microrganismos resistentes ao NaOCl (Vianna et al.¹⁹ 2004, Wang et al.²⁰ 2007), são muitas as vantagens clínicas do uso da CHX sobre o NaOCl como desinfetante de canais radiculares, como por exemplo sua baixa toxicidade (Yesilsoy²¹ 1995, Tanomaru Filho et al.²² 2002), substantividade (White et al.¹⁶ 1997, Komorowski et al.²³ 2000, Rosenthal et al.²⁴ 2004), e odor e gosto mais toleráveis (Wang et al.²⁰ 2007). Porém, a CHX não possui todos os quesitos de uma substância auxiliar ideal. A CHX tem se mostrado incapaz de dissolver tecidos pulpares remanescentes, e por este motivo, protocolos propondo sua associação com NaOCl estão sendo descritos na literatura. Recentemente foi relatado que a interação da CHX com o NaOCl pode formar um precipitado cancerígeno, conhecido como para-cloroanilina (PCA), em quantidades diretamente relacionadas à concentração do NaOCl (Basrani et al.²⁵ 2007).

Na procura pela substância auxiliar ideal, tem sido observado um aumento no número de pesquisas usando substâncias naturais, e sua possível aplicação nos canais radiculares (Murray et al.²⁶ 2008). Assim, a fitoterapia tem se mostrado uma alternativa potencial para se atingir, de forma segura, o objetivo de limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares.

A mais promissora das plantas conhecidas da Amazônia peruana na área da saúde é a *Uncaria tomentosa* Willd D.C., conhecida como “unha de gato” (UG). A UG possui propriedades terapêuticas que incluem potencial antiinflamatório, antiviral, antibacteriano, antioxidante, e imunomodelador (Heitzman et al.²⁷ 2005). Pesquisas têm mostrado as propriedades químicas e farmacológicas da UG, permitindo aos pesquisadores e clínicos indicarem sua adequada utilização (Obregón Vilches²⁸ 1996, Santa María et al.²⁹ 1997).

Após criterioso levantamento bibliográfico, não foram encontrados estudos visando avaliar o potencial antimicrobiano da UG em procedimentos endodônticos. Assim, com base nos relatos acima, o objetivo do estudo foi avaliar por meio de testes *in vitro*, o potencial antimicrobiano da UG sobre microrganismos comumente isolados em casos de insucesso do tratamento endodôntico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O PAPEL DOS MICRORGANISMOS NAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS

Os agentes microbianos são essenciais para a propagação e perpetuação de doenças inflamatórias periapicais (Takehashi et al.¹ 1965, Möller³⁰ 1966, Sundqvist³¹ 1976, Möller et al.³² 1981).

Miller³³ (1894) foi o primeiro em descrever a presença de bactérias no canal radicular. Após examinar esfregaços obtidos de canais radiculares com câmara pulpar aberta e polpas necróticas, observou os três tipos morfológicos básicos de células bacterianas, cocos, bacilos e espirilos. Da variedade de formas bacterianas observadas, algumas se localizavam na câmara pulpar, associadas a patologias pulpares, e outras no interior do canal radicular, associadas a patologias perirradiculares.

Após os achados de Miller³³ (1894), Takehashi et al.¹ (1965) expuseram a polpa dental de molares de ratos “*germ-free*” e convencionais à cavidade bucal, observando a resposta do tecido por meios histológicos. Foi observada a presença de necrose pulpar e lesão perirradicular apenas nos ratos convencionais, mostrando assim a importância das bactérias no desenvolvimento das doenças pulpares e perirradiculares.

Sundqvist³¹ (1976) avaliou as condições bacteriológicas de 32 canais radiculares de dentes hígidos unirradiculares com polpas necrosadas como consequência de trauma dentário. Radiograficamente foi detectada lesão periapical em 19 dos 32 dentes avaliados. Destes 19 dentes com lesão periapical, 18 apresentavam canais infectados, sendo que 94,3% das cepas isoladas eram de bactérias anaeróbias estritas, assim foi confirmada a importância da infecção bacteriana nas patologias pulpares e perirradiculares e descartada a idéia de que a polpa necrosada sem infecção poderia ser um irritante para os tecidos periapicais.

Möller et al.³² em 1981 induziram necrose pulpar em nove macacos (*Macaca fascicularis*), de forma asséptica. Dos 78 dentes escolhidos para o estudo, a câmara pulpar de 26 foi selada, ficando livre de bactérias, enquanto as 52 restantes foram expostas à microbiota bucal por 7 dias, seguido do selamento. Foi feito o acompanhamento clínico, radiográfico e microbiológico depois de 6-7 meses. Os resultados mostraram que as polpas necróticas não infectadas não induziram

reação inflamatória periapical alguma, enquanto que 23,1% dos dentes com polpas infectadas apresentaram reação inflamatória perceptível clinicamente e 90,4% radiograficamente.

Lin et al.³⁴ (2006) induziram necrose pulpar em 48 dentes de 4 cães de raça beagle, dividindo-os em dois grupos. Grupo A (24 dentes), caracterizado por necrose asséptica com câmara pulpar selada. Grupo B (24 dentes), com câmara pulpar exposta à microbiota bucal por 7 dias, seguido do selamento coronal. Os animais foram sacrificados após 1 ano do tratamento para análise histológica dos tecidos perirradiculares. Os autores concluíram que os dentes não infectados não têm uma liberação constante de mediadores químicos da inflamação por isso não desenvolveram nenhuma reação inflamatória periapical. Por outro lado, os dentes que foram expostos à microbiota bucal desenvolveram diversos graus de inflamação.

2.2 MICROBIOTA DO INSUCESSO ENDODÔNTICO

A etiologia associada ao insucesso endodôntico pode ser multifatorial. Embora os casos de fracasso do tratamento endodôntico possam estar associados a fatores não microbianos, endógenos ou exógenos, tais como ausência ou inadequada restauração coronal; técnica e condições operatórias; assim como as condições inerentes de cada paciente; são os microrganismos e seus produtos os principais responsáveis pelo insucesso no tratamento. O objetivo do tratamento endodôntico é a eliminação da infecção, através do PQM e obturação dos canais radiculares, propiciando um ambiente favorável à manutenção da saúde periapical ou o reparo de lesões periapicais pré-existent. Assim, nos casos de insucesso endodôntico, procedimentos inadequados e insatisfatórios nas diferentes etapas do tratamento não permitem atingir estes objetivos, propiciando o desenvolvimento de infecção, reinfecção ou persistência de infecção nos tecidos periapicais (Nair et al.³⁵ 1999).

As infecções endodônticas primárias são polimicrobianas, dominadas principalmente pelos anaeróbios estritos. O número de bactérias presentes nos canais infectados é restrito em comparação a microbiota total da cavidade bucal. Os microrganismos mais comumente isolados incluem anaeróbios Gram-negativos, cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, *Lactobacillus spp.* e *Streptococcus spp.* (Sundqvist³⁶ 1994). Os anaeróbios estritos são geralmente

eliminados durante o preparo químico-mecânico (PQM). Porém, os microrganismos facultativos como *Enterococcus spp.* e *Lactobacillus spp.* uma vez estabelecidos, se apresentam mais resistentes ao PQM e à medicação intracanal (MIC) (Chávez de Paz et al.³⁷ 2003). Embora enterococos sejam raramente encontrados em casos de infecção primária, eles são os microrganismos mais comumente isolados de casos de insucesso endodôntico.

A microbiota de dentes com fracasso do tratamento endodôntico difere de modo marcante daquela encontrada em canais radiculares de dentes com polpas necrosadas e não tratados endodônticamente (Sundqvist et al.³⁸ 1989, Gomes et al.⁸ 1996).

As bactérias anaeróbias facultativas, geralmente se apresentam mais resistentes à atividade antimicrobiana das substâncias auxiliares do que os anaeróbios estritos, podendo persistir em canais radiculares após o tratamento endodôntico. Os microrganismos anaeróbios facultativos podem permanecer em fase latente, com uma baixa taxa metabólica, e assim na presença de mudanças ambientais, como uma infiltração coronária, pode-se gerar a ativação destes microrganismos e a conseqüente proliferação dos mesmos (Molander et al.⁴ 1998).

Num estudo de 654 canais radiculares de dentes com polpas vitais, polpas necróticas e com tratamento endodôntico prévio associado a lesões periapicais, Möller³⁰ (1966) encontrou que a microbiota de dentes com fracasso endodôntico era composta por um número menor de microrganismos quando comparada a dos dentes com polpas necróticas. Dos 264 dentes estudados com tratamento endodôntico prévio, 120 (45,5%) apresentaram culturas positivas para microrganismos. Os autores relataram que existia equilíbrio entre as bactérias anaeróbias facultativas e estritas, com um predomínio de 80% de bactérias Gram-positivas. Espécies dos gêneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus* e *Eubacterium* foram isoladas freqüentemente; *Prevotella* e *Fusobacterium* foram menos freqüentes. *E. faecalis* foi isolado em 29% dos casos que apresentavam culturas positivas.

Em 1997, Sjögren et al.³ avaliaram 55 dentes com periodontite apical tratados em sessão única. Utilizando técnicas de anaerobiose, fizeram coletas após PQM obtendo uma baixa taxa de cultura bacteriana em 40% dos dentes. Foi feito o acompanhamento clínico e radiográfico por 5 anos e os resultados mostraram completa cicatrização da lesão periapical em 94% dos casos que apresentaram

cultura negativa após o PQM. Nos casos onde a cultura bacteriana foi positiva após PQM, o índice de sucesso foi de apenas 68%. Os autores ressaltam a importância de se ter canais livres de bactérias antes da obturação.

Sundqvist et al.³⁹, em 1998 avaliaram 54 dentes tratados endodônticamente que apresentavam lesão periapical persistente. Após a remoção da obturação foram coletadas amostras microbiológicas do canal, os dentes receberam retratamento endodôntico e foi feito o acompanhamento por 5 anos. Os resultados mostraram a prevalência de infecções monobacterianas, predominando microrganismos Gram-positivos. A espécie mais comumente encontrada foi *E. faecalis*. Os autores concluíram que a microbiota dos canais radiculares associados a insucesso endodôntico é muito diferente da apresentada em infecções primárias.

Molander et al.⁴ (1998) avaliaram 100 dentes tratados endodônticamente que apresentavam imagem radiolúcida periapical (Grupo P) e 20 dentes tratados endodônticamente sem sinais de patologia periapical (Grupo T). No grupo P, as espécies bacterianas mais predominantes foram anaeróbias facultativas (69% das espécies isoladas), principalmente *Enterococcus*. Com base em seus achados, os autores concluíram que a microbiota de canais obturados difere da apresentada por canais com polpa necrótica não tratados, tanto quantitativa quanto qualitativamente.

Peciulienė et al.⁴⁰, em 2000 avaliaram 25 dentes sem sintomatologia clínica que apresentavam lesão periapical persistente. Foi feito o retratamento utilizando NaOCl e EDTA durante o PQM. Foram feitas coletas para análise microbiológica antes e depois do PQM. Os resultados mostraram que 20 dos 25 dentes (80%) apresentavam cultura positiva, sendo que em 70% delas *E. faecalis* foi isolado como cultura pura. As coletas feitas após o PQM foram positivas em 7 dos 20 dentes (35%) e em 71,5% (5) destas *E. faecalis* também estava presente como cultura pura. Concluiu-se que são as condições próprias dos dentes que determinam a presença de *E. faecalis*. Os mesmos autores, em 2001 (Peciulienė et al.⁴¹), após avaliar 40 dentes sem sintomatologia clínica que apresentavam periodontite apical crônica encontraram culturas positivas de microrganismos em 82,5% dos dentes, nos quais *E. faecalis* foi isolado no 63,7% dos casos, sendo mais da metade (52%) como cultura pura. Após o PQM, 25% dos dentes tiveram culturas positivas, sendo 60% delas apenas para *E. faecalis*. Os autores relatam a alta incidência de *E. faecalis* nos casos de insucesso endodôntico.

Pelo método de cultura microbiológica, Adib et al.⁴² (2004) identificaram a microbiota de dentes tratados endodonticamente com lesão periapical persistente. Concluíram que o grupo bacteriano predominante foi dos anaeróbios facultativos Gram-positivos, principalmente *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp.

Utilizando a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) para identificação de espécies de microrganismos em casos de insucesso endodôntico, Siqueira e Rôças⁴³ (2004) coletaram amostras de 22 dentes com lesão periapical persistente. Todas as amostras foram positivas pelo menos para um dos microrganismos alvos do estudo, sendo *E. faecalis* o de maior prevalência (77%). *C. albicans* foi encontrada em 9% dos casos.

2.3 SUBSTÂNCIAS AUXILIARES NO TRATAMENTO ENDODÔNTICO

A ação mecânica dos instrumentos endodônticos é incapaz de promover a completa desinfecção de algumas áreas de complexa anatomia dentro dos canais. Daí a importância na utilização de substâncias auxiliares com capacidade antimicrobiana para promover uma significativa redução da carga bacteriana nos canais radiculares; além de auxiliar na lubrificação do canal, prevenindo a fratura dos instrumentos durante a ação de corte; promover a remoção de *smear layer*; a dissolução do exsudado, do tecido pulpar necrosado e da pré-dentina (Spangberg et al.⁴⁴ 1973, Byström, Sundqvist¹⁰ 1983).

A ação mecânica dos instrumentos endodônticos associada ao fluxo contínuo de uma substância irrigadora promove uma significativa redução bacteriana (Byström, Sundqvist¹⁰ 1983), inclusive se a substância utilizada não tiver capacidade antimicrobiana, porém esta situação facilitaria a recontaminação do canal pela presença de microrganismos no interior dos túbulos dentinários (Berber et al.⁴⁵ 2006).

Dametto et al.⁴⁶ (2005) avaliaram, *in vitro*, o efeito antibacteriano da CHX em gel 2% sobre *E. faecalis*, comparado à da CHX em solução 2% e ao NaOCl 5,25%. Foram utilizadas 80 raízes de dentes humanos que receberam instrumentação para padronização do canal, autoclavação e contaminação por 7 dias com *E. faecalis*. As raízes foram divididas em 5 grupos de acordo com a substância auxiliar a ser utilizada durante o PQM. Foram realizadas três coletas microbiológicas, inicial (antes do PQM); pós-tratamento (imediatamente depois do

PQM); e final (7 dias após o PQM). A CHX em gel e solução reduziram consideravelmente as unidades formadoras de colônias (UFC) de *E. faecalis* nas coletas pós-tratamento e final. O NaOCl também reduziu as UFC na coleta pós-tratamento, mas não foi eficaz para manter o canal livre de *E. faecalis* na coleta final. Os autores concluíram que a CHX a 2% (gel ou solução) foi mais efetiva que o NaOCl 5,25 na redução de *E. faecalis* após 7 dias do PQM.

Em 2005, Zerella et al.⁴⁷ avaliaram, *in vivo*, a atividade antibacteriana de uma pasta de Ca(OH)_2 com CHX em solução a 2% (grupo experimental) versus pasta de Ca(OH)_2 com solução salina (grupo controle) na desinfecção de canais que apresentaram insucesso endodôntico. Foram incluídos no estudo 40 dentes unirradiculares tratados endodônticamente associados a lesão perirradicular. Os dentes receberam retratamento endodôntico e MIC em três sessões programadas em intervalos de 7-10 dias. Foi determinada por meio de cultura microbiológica a presença de *Enterococcus* spp. Os resultados mostraram que do total de canais, 12 deram positivo para *Enterococcus* spp. antes de receber a MIC. A MIC controle desinfetou 12 dos 20 canais, enquanto a MIC experimental foi efetiva na desinfecção de 16 canais, sendo que a diferença entre as MIC não foi estatisticamente significativa. Concluiu-se que a pasta de Ca(OH)_2 com CHX 2% em solução foi tão eficaz quanto a pasta de Ca(OH)_2 com solução salina na desinfecção de canais radiculares.

Ercan et al.⁴⁸ (2006) avaliaram *in vitro* o efeito antibacteriano do Ca(OH)_2 com CHX 2%, CHX gel a 2%, e Ca(OH)_2 com água estéril sobre *E. faecalis* e *C. albicans*. Foram utilizados 80 dentes humanos inferiores unirradiculares que receberam PQM para padronização do canal, autoclavação e contaminação por 5 dias com os microrganismos a serem testados. Em seguida, as raízes foram divididas em quatro grupos de acordo com a MIC recebida. Grupo 1: Ca(OH)_2 + água; Grupo 2: Ca(OH)_2 + CHX a 2%; Grupo 3: gel de CHX a 2%; Grupo 4: solução salina (controle negativo). Foram realizadas coletas microbiológicas depois de 7, 15 e 30 dias. Os resultados mostraram o grupo 3 (CHX gel a 2%) como a MIC mais efetiva ($p < 0,05$). Com base em seus resultados, os autores concluíram que o gel de CHX a 2% foi efetivo na eliminação de *E. faecalis* e *C. albicans* dos canais radiculares.

Sena et al.⁹ (2006) avaliaram *in vitro* a capacidade antimicrobiana do NaOCl a 2,5% e 5,25% e da CHX gel e solução a 2% como irrigantes endodônticos, sobre biofilme experimental de *E. faecalis*, *S. aureus*, *C. albicans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Fusobacterium nucleatum* formados sobre filtros de membrana. Os biofilmes foram imersos nas substâncias irrigantes por 30 s e por 5, 10, 15, 30 e 60 min, com e sem agitação mecânica. Após cada período experimental os filtros de membrana foram transferidos para tubos contendo 2mL de caldo nutriente adicionado de neutralizadores específicos de cada substância irrigadora usada, para evitar qualquer efeito residual. Após homogeneização e diluição seriada, amostras foram semeadas para determinação do número de UFC de cada microrganismo recuperado dos filtros. Os resultados mostraram que a agitação mecânica aumenta a ação das substâncias irrigadoras, sendo necessário um tempo menor para a eliminação do mesmo microrganismo, com exceção de *S. aureus* quando foi utilizado NaOCl a 2,5%. Os autores concluíram que a agitação mecânica melhora as propriedades antimicrobianas das substâncias testadas no modelo experimental de biofilme.

Berber et al.⁴⁵ (2006) avaliaram *in vitro* a eficácia do NaOCl em diferentes concentrações (0,5%, 2,5% e 5,25%) como irrigante endodôntico associado a diferentes técnicas de preparo mecânico, na eliminação de *E. faecalis* do canal radicular de 180 pré-molares. Os espécimes foram divididos em 12 grupos: 1) NaOCl a 5.25% + técnica híbrida (Valdrighi et al.⁴⁹ 1998); 2) NaOCl a 5.25% + níquel-titânio (NiTi) técnica rotatória, 4 mm aquém do ápice (FOP-UNICAMP); 3) NaOCl a 5, 25%+ NiTi técnica rotatória (Hero 642); 4) NaOCl a 2.5% + técnica híbrida; 5) NaOCl a 2.5% + NiTi técnica rotatória, 4 mm aquém do ápice; 6) NaOCl a 2.5% + NiTi técnica rotatória (Hero 642); 7) NaOCl a 0.5% + técnica híbrida; 8) NaOCl a 0.5% + NiTi técnica rotatória, 4 mm aquém do ápice; 9) NaOCl a 0.5% + NiTi técnica rotatória (Hero 642); 10) solução salina esteril + técnica híbrida; 11) solução salina esteril + NiTi técnica rotatória, 4 mm aquém do ápice; 12) solução salina esteril + NiTi técnica rotatória (Hero 642). Foram obtidas coletas microbiológicas antes e depois do PQM para contagem de UFC. As raízes foram seccionadas em três partes e obtidas raspas dentinárias de cada terço, que foram semeadas para contagem de UFC. Os resultados mostraram que para todos os terços e para todos os grupos, o NaOCl a 5,25% foi a solução irrigante mais efetiva,

seguida de NaOCl a 2,5%, mostrando que principalmente em altas concentrações, o NaOCl é efetivo na desinfecção dos túbulos dentinários independente da técnica de preparo mecânico utilizada.

Tanomaru Filho et al.⁵⁰ (2006) avaliaram o efeito antimicrobiano do PQM com diferentes soluções irrigadoras em 78 canais radiculares de pré-molares de 4 cães. Após indução experimental das lesões periapicais, os canais radiculares foram divididos em quatro grupos de acordo com a solução irrigadora utilizada durante o PQM: NaOCl a 2,5%, CHX a 2%, soro fisiológico. No grupo 4 (controle) não foi realizado PQM. A avaliação microbiológica do canal radicular foi realizada pela contagem de UFC em diferentes meios de cultura. Foram utilizados 2 cones de papel absorvente em cada canal radicular para a realização da coleta microbiológica previa ao PQM e 30 dias após. Os resultados demonstraram que houve redução dos microrganismos nos grupos NaOCl e CHX ($p < 0,05$), com maior efetividade para a solução de CHX. Os grupos que utilizaram solução fisiológica e controle apresentaram aumento do número de microrganismos. Concluiu-se que o emprego de soluções irrigadoras antimicrobianas durante o preparo biomecânico promove a redução da microbiota endodôntica.

Gomes et al.¹⁴ (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana do Ca(OH)_2 associado a CHX em gel a 2%, sobre *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*, e compararam com os resultados obtidos com Ca(OH)_2 associado a água estéril e à CHX. Foram utilizados o método de difusão em ágar e o teste de contato direto. A associação de Ca(OH)_2 com CHX a 2% produziu halos de inibição de 2,84 – 6,5 mm, sendo necessário de 30 s – 6 h para eliminação do microrganismo testado. A CHX gel a 2% mostrou os maiores halos de inibição (4,33 – 21,67), com contato de menos de 1 min para inibição de todos os microrganismos testados. A pasta de Ca(OH)_2 com água estéril inibiu apenas os microrganismos em contato direto, com contato de 30 s – 24 h para eliminação de todos. Concluiu-se que o gel de CHX a 2% + Ca(OH)_2 apresentou melhor atividade antibacteriana que Ca(OH)_2 + água.

Ballal et al.⁵¹ (2007) avaliaram pelo método de difusão em ágar, a atividade antimicrobiana do Ca(OH)_2 , CHX em gel a 2% e a associação dos dois compostos. Os halos de inibição foram medidos após 24 e 72 h. Os resultados mostraram a CHX como a substância mais efetiva após 72 h na eliminação de *E. faecalis* e *C. albicans*. Entretanto, Ca(OH)_2 , no período de 24 h se mostrou mais

efetivo sobre *C. albicans*. Baseados em seus resultados os autores concluem, que nos casos de insucesso do tratamento endodôntico, a CHX a 2% é mais efetiva na eliminação de *E. faecalis* e *C. albicans* que o Ca(OH)_2 .

Ferraz et al.⁵² (2007) avaliaram pelo método de difusão em ágar, a atividade antimicrobiana da CHX gel como irrigante endodôntico, comparando-a ao NaOCl e a CHX em solução. As zonas de inibição de crescimento bacteriano produzidas pela CHX gel a 0,2%; 1% e 2% foram observados frente a 5 espécies de bactérias anaeróbias facultativas (*S. aureus*, *E. faecalis*, *Streptococcus sanguis*, *S. sobrinus*, *Actinomyces naeslundii*) e 4 espécies de anaeróbios estritos, Gram-negativos e produtores de pigmento negro (*P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. denticola*); e comparados com os resultados obtidos com NaOCl e CHX líquida. As maiores zonas de inibição foram produzidas quando as bactérias testadas ficaram em contato com a CHX a 2% em gel (11,79 mm), apresentando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparadas às zonas de inibição de crescimento bacteriano produzidas por todas as concentrações avaliadas de NaOCl (0.5% ,1%, 2.5%, 4% e 5.25%) (9,54 mm). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) comparando-se as zonas produzidas por concentrações equivalentes de CHX líquida ou gel. Os resultados indicaram que a CHX em gel tem grande potencial para ser usada como substância química auxiliar quanto às suas propriedades antimicrobianas.

Oliveira et al.⁵³ (2007) compararam a atividade antimicrobiana, *in vitro*, da CHX gel a 2 % sobre *E. faecalis*, com a atividade do NaOCl em duas concentrações (1,5% e 5,25%). Foram preparados 80 pré-molares humanos inferiores unirradiculares, autoclavados e infectados por 7 dias com cultura pura da bactéria. As raízes foram separadas em 5 grupos de acordo com a solução a ser utilizada como irrigante durante o PQM. Foram coletadas 3 amostras microbiológicas dos canais radiculares: Inicial (S1), pós tratamento (imediatamente após o PQM) (S2), e final (7 dias após o PQM) (S3). Os resultados mostraram uma redução significativa nas UFC dos grupos CHX gel e NaOCl a 5,25% para as coletas S2. O número de UFC de *E. faecalis* aumentou em S3, não mostrando diferenças significativas com S1. Concluiu-se, com estes resultados, que a CHX gel e o NaOCl 5,25 são efetivos na eliminação de *E. faecalis* até 7 dias após o PQM, sendo que com a maior concentração de NaOCl observou-se maior atividade antimicrobiana.

Siqueira et al.⁵⁴ (2007) avaliaram clinicamente as propriedades antimicrobianas do NaOCl a 2,5% comparado com a CHX 0,12%, utilizados como irrigantes endodônticos, na redução de bactérias em canais radiculares associados a lesão periapical, pela técnica de PCR. Foram selecionados 32 dentes com infecção endodôntica primária e periodontite apical crônica. Foram feitas coletas microbiológicas no momento inicial (S1), e após o PQM com a substância específica para cada grupo (S2). Os resultados foram positivos em S1 para todos os grupos, enquanto que para S2 foi observada uma redução significativa em ambos os grupos, sem significância entre eles. A grande maioria das bactérias isoladas em S2 foi Gram-negativa. Os autores concluíram que não existe diferença significativa na redução bacteriana em canais com periodontite apical crônica com o uso de CHX a 0,12% ou NaOCl a 2,5%.

Vianna et al.⁵⁵ (2007), em estudo clínico, determinaram a quantidade de endotoxinas e bactérias cultiváveis em 24 canais radiculares humanos necrosados, antes (S1), e depois do PQM (S2) utilizando CHX em gel a 2% como substância auxiliar, e depois de 7 dias com MIC (S3) de Ca(OH)_2 , CHX ou Ca(OH)_2 + CHX. Os resultados mostraram a presença de endotoxinas e bactérias em 100% de S1, porém foi observada uma redução de 44,4% das endotoxinas após o PQM. 33,3% dos canais ainda apresentaram bactérias após o PQM. Após MIC a presença de endotoxinas reduziu só em 1,4% em comparação com S2, sendo que 54,1% dos canais apresentaram bactérias. A diferença entre as substâncias auxiliares utilizadas como MIC não foi significativa. Concluiu-se que valores relativamente altos de endotoxinas ainda são encontrados depois do PQM, apesar da maioria das bactérias terem sido eliminadas. Não se observou melhora após os 7 dias com MIC.

Manzur et al.⁵⁶ (2007) avaliaram clinicamente o efeito antibacteriano do Ca(OH)_2 , CHX em gel e a associação de ambos. Foram selecionados 33 dentes que apresentavam periodontite apical crônica. Foi feita a coleta inicial (S1), após o PQM (S2) e depois de MIC por 7 dias (S3). Os resultados mostraram para todos os grupos diferença significativa entre S1 e S2, mas não entre S2 e S3 com relação ao número de UFC de microrganismos recuperados. Concluiu-se que o efeito antibacteriano do Ca(OH)_2 , CHX e Ca(OH)_2 + CHX foi semelhante.

2.4 O USO DE PRODUTOS NATURAIS NA ENDODONTIA

Nos últimos anos um grande número de substâncias naturais tem sido estudado com o objetivo de avaliar suas propriedades e possíveis aplicações na odontologia (Little⁵⁷ 2004).

Silva et al.⁵⁸ (2004) avaliaram o potencial irritativo de própolis, *Casearia sylvestris*, Otosporin e soro fisiológico (controle). Foram utilizados 28 ratos machos da linhagem Wistar. Os animais foram anestesiados e, em seguida receberam a injeção do corante azul de Evans a 2%, por via intravenosa na veia caudal. Em quatro pontos predeterminados e depilados da região dorsal de cada animal foi injetado 0,1 mL das substâncias teste. Os animais foram sacrificados meia, uma, três e seis horas após a injeção das substâncias, e cada pedaço de pele, contendo a lesão, foi colocado em frascos contendo formamida, que foram incubados a 45°C/72 h. Após esse período, as amostras foram filtradas e submetidas à análise em espectrofotômetro. No período de 3 h, foram observados os maiores valores de corante extraído, caracterizando o pico do processo inflamatório. A própolis foi a substância que apresentou menor potencial irritativo. Os autores concluíram que os produtos naturais testados neste trabalho podem ser uma alternativa para o tratamento endodôntico.

Gentil et al.⁵⁹ (2006) avaliaram, *in vitro*, a capacidade antimicrobiana de *Arctium lappa*, sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *S. mutans* e *C. albicans*. Foram utilizados 27 caninos divididos em três grupos de acordo com a MIC a ser utilizada: Grupo 1, CaOH₂ + propilenoglicol; Grupo 2, *A. lappa* + propilenoglicol; Grupo 3, propilenoglicol (controle). Coletas microbiológicas foram realizadas aos 7, 14 e 30 dias. Os resultados mostraram que para o grupo 2 o crescimento bacteriano foi significativo na primeira coleta, mas ausente entre os 14 e 30 dias. Concluiu-se que *A. lappa* inibiu o crescimento dos microrganismos testados.

Ferreira et al.⁶⁰ (2007) avaliaram a capacidade antimicrobiana do extrato alcoólico de própolis comparado com a MIC de Ca(OH)₂, paramonoclorofenol e formocresol pelo método de macrodiluição. As MIC foram seqüencialmente diluídas e testadas sobre *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces israelii*, *Clostridium perfringens* e *E. faecalis*. Os resultados mostraram

que todas as medicações foram efetivas sobre as bactérias testadas sem diferença significativa, sendo *E. faecalis* a menos susceptível.

Com o objetivo de avaliar a capacidade antibacteriana e de remoção da *smear layer* do canal radicular, em 2008, Murray et al.²⁶ testaram *in vitro* as propriedades do suco de *Morinda citrifolia*, conhecido como Noni, no canal radicular. Foram avaliadas associações de *M. citrifolia* com NaOCl e EDTA na remoção da *smear layer* formada pela instrumentação em 60 pré-molares humanos. Também foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) de *M. citrifolia* sobre *E. faecalis*. Os resultados mostraram que a 6% a *M. citrifolia* foi efetiva na inibição de *E. faecalis* e que as associações mais efetivas na remoção da *smear layer* foram *M. citrifolia* com EDTA e NaOCl com EDTA. Os autores concluem que o suco de *M. citrifolia* se apresenta como um potencial substituto do NaOCl na irrigação de canais radiculares.

Rezende et al.⁶¹ (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana de duas pastas experimentais, contendo própolis associada a hidróxido de cálcio, frente a culturas polimicrobianas coletadas de 16 molares decíduos necrosados e com fístulas, extraídos de crianças entre 4 e 6 anos de idade de ambos os sexos. A técnica de difusão em ágar foi utilizada para determinar a atividade antimicrobiana das seguintes pastas: (1) extrato etanólico de própolis a 11,0% + hidróxido de cálcio e (2) extrato de própolis sem álcool a 11,0% + hidróxido de cálcio. A associação de hidróxido de cálcio com propilenoglicol foi utilizada como grupo controle positivo. Os resultados mostraram que a Pasta 1 e a Pasta 2 apresentaram zonas de inibição maiores contra os microrganismos coletados dos canais radiculares do que o controle ($p=0,021$ e $0,003$ respectivamente). A Pasta 2 mostrou zonas de inibição um pouco maiores que a Pasta 1 ($p=0,053$). Os autores concluem que a associação entre própolis e hidróxido de cálcio foi efetiva no controle de infecções dentárias.

2.5 *Uncaria tomentosa* Willd D.C.

A mais promissora das plantas conhecidas da Amazônia peruana na área da saúde é a *Uncaria tomentosa* Willd D.C., conhecida como “unha de gato” (UG). Embora o gênero *Uncaria* se encontre amplamente distribuído em regiões tropicais da Ásia, África e América do Sul, a UG se encontra distribuída unicamente nas Américas Central e do Sul, principalmente na Amazônia do Peru. Relatos tem

mostrado a UG como a mais importante planta medicinal dos Ashaninkas, tribo da Amazônia peruana (Keplinger et al.⁶² 1999).

A UG é a espécie do gênero *Uncaria* com maior número de princípios ativos identificados. Aproximadamente 50 componentes foram identificados, dos quais 35 são encontrados unicamente em outras duas espécies que não a UG. Destes 35 componentes, 15 são descritos como constituintes originais da planta. Os componentes mais importantes da unha de gato são os alcalóides, sendo os mais importantes o rhynchophylline e isorhynchophylline (Heitzman et al.²⁷ 2005).

Pesquisas tem mostrado as propriedades químicas e farmacológicas da UG, permitindo aos pesquisadores e clínicos indicarem sua adequada utilização (Obregón Vilches²⁸ 1996, Santa María et al.²⁹ 1997). O uso terapêutico da UG inclui o tratamento de abscessos, alergias, artrite, asma, câncer, anticoncepcional, febre, úlceras, hemorragias, inflamação, infecções virais, etc. (Aquino et al.⁶³ 1991, Wurm et al.⁶⁴ 1998, Aguilar et al.⁶⁵ 2002, Mur et al.⁶⁶ 2002).

O uso de plantas medicinais não pode se basear unicamente em seu uso tradicional por determinadas populações. Testes para avaliar a potencial toxicidade dos componentes são parte das avaliações prévias necessárias para se garantir um uso seguro dos produtos naturais (Halkes⁶⁷ 2000). Santa Maria et al.²⁹ (1997) analisaram extratos aquosos de UG para determinar o potencial citotóxico de seus componentes. Sob quatro diferentes testes de citotoxicidade, os autores concluíram que a UG não apresentou toxicidade *in vitro*, nas concentrações testadas (10, 20, 30, 40, 50, 75 e 100 mg/mL).

Silva et al.⁶⁸ (1998) reportaram atividade inibitória da UG sobre 66% de cepas de *C. albicans*. As diferenças nos resultados com o estudo de Ccahuana-Vasquez et al.⁶⁹ (2007), que não observaram inibição do fungo até a concentração de 50 mg/mL, podem ser devido ao fato de que Silva et al.⁶⁷ (1998) utilizaram uma concentração de UG de 500 mg/mL, além de ter utilizado extrato liofilizado da planta, diferente de Ccahuana-Vasquez et al.⁶⁹ (2007), que utilizaram extrato micropulverizado.

Sheng et al.⁷⁰ (2001), por meio do teste ³H-timidina avaliaram o efeito de um extrato comercial de UG na indução de reparo de DNA em humanos. Foi induzido dano no DNA por meio de uma dose padrão de peróxido de hidrogênio em amostras de sangue de 12 voluntários. Dois grupos experimentais receberam

suplemento de 250 e 350 mg de UG respectivamente por 8 semanas consecutivas. Os resultados mostraram menor dano ao DNA e significativo reparo nas amostras dos grupos experimentais em comparação com o grupo controle, permitindo aos autores confirmar os resultados observados em ratos; o extrato de UG melhora a resposta imune do organismo.

Aguilar et al.⁶⁵ (2002) avaliaram as diferenças entre os extratos aquoso e hidroalcoólico de UG na atividade antiinflamatória. Os testes *in vitro* mostraram que ambos os extratos apresentam capacidade inibitória de enzimas COX-1 e COX-2. Quando comparados entre si, o extrato hidroalcoólico foi mais efetivo na inibição da COX-2 enquanto o extrato aquoso mostrou maior inibição da COX-1. Conclui-se que os extratos testados de UG apresentam atividade antiinflamatória.

Mur et al.⁶⁶ (2002) avaliaram a eficácia clínica do uso do extrato de UG em pacientes com artrite reumatóide ativa. Durante a primeira fase deste estudo duplo cego (24 semanas), os pacientes que receberam UG manifestaram uma redução significativa no número de articulações com sintomatologia dolorosa (53,2%) em comparação com o grupo placebo (24,1). Durante a segunda fase do estudo (28 semanas) ambos os grupos receberam UG, sendo que os pacientes que durante a primeira fase receberam placebo manifestaram uma redução significativa da sintomatologia dolorosa depois da segunda fase.

Apesar de não ter sido utilizada amplamente na medicina tradicional em casos de infecções, alguns estudos avaliaram atividade antimicrobiana da UG. Em 2007, Ccahuana-Vasquez et al.⁶⁹ avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações de UG micropulverizada sobre diferentes cepas de microrganismos isolados de cavidades bucais humanas (*S. mutans*, *Staphylococcus* spp., *C. albicans*, Enterobacteriaceae e *P. aeruginosa*). A UG foi testada *in vitro* para determinar a concentração inibitória mínima em isolados microbianos selecionados. Os resultados mostraram que a UG a 3% inibiu 8% de Enterobacteriaceae, 52% de *S. mutans* e 96% de *Staphylococcus* spp. As concentrações testadas não apresentaram efeito inibitório sobre *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Concluiu-se que a UG micropulverizada apresenta atividade antimicrobiana sobre cepas de Enterobacteriaceae, *S. mutans* e *Staphylococcus* spp.

Reis et al.⁷¹ (2008) avaliaram a atividade imunomoduladora e antiviral dos alcalóides da UG sobre o vírus da dengue tipo 2 (DENV-2) utilizando

um modelo *in vitro* de infecção. Monócitos humanos infectados por DENV-2 foram incubados com alcalóides da UG. Foi determinada a atividade antiviral, pela presença dos antígenos virais (DENV-Ag) e também foram determinados os níveis de citocinas (TNF- α , IFN- α , IL-6 e IL-10). Os resultados mostraram uma diminuição significativa nos níveis de DENV-Ag, TNF- α e IFN- α . Os autores concluíram que os alcalóides da UG são efetivos na redução da infecção de monócitos pelo DENV-2, possuindo um potencial terapêutico de aplicação clínica nos casos de dengue.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi analisar, *in vitro*, a ação antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* de *Uncaria tomentosa* (unha de gato) em gel a 2%.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a ação antimicrobiana da unha de gato sobre os microrganismos testados por meio do método de difusão em ágar.
2. Avaliar a ação antimicrobiana da unha de gato como substância auxiliar no preparo químico-mecânico de canais radiculares contaminados com os microrganismos testados.
3. Avaliar a ação antimicrobiana da unha de gato como medicação intracanal em canais radiculares contaminados com os microrganismos testados.
4. Avaliar o possível sinergismo antimicrobiano da associação de unha de gato com clorexidina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CEPAS DE MICRORGANISMOS

Todos os microrganismos utilizados neste estudo fazem parte de cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) pertencentes ao estoque do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Odontologia da UEPG: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 95106) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

4.2 PREPARO DAS SUBSTÂNCIAS AUXILIARES A SEREM UTILIZADAS

4.2.1 Gel de digluconato de clorexidina a 2%

A partir da solução a 2% de digluconato de clorexidina (Fleming Manipulações, Ponta Grossa, PR-Brasil) e utilizando Natrosol (NAT) 1% como base gel, foi obtido o gel de digluconato clorexidina 2% (CHX / Fleming Manipulações, Ponta Grossa, PR-Brasil).

4.2.2 Gel de *Uncaria tomentosa* a 2%

A partir do extrato liofilizado de *Uncaria tomentosa* Willd D.C. e a utilização de NAT 1% como base gel, foi obtido o gel de *Uncaria tomentosa* 2% (UG / Fleming Manipulações, Ponta Grossa, PR-Brasil).

4.2.3 Gel de digluconato de clorexidina e *Uncaria tomentosa* a 2%

Um gel misto foi obtido misturando-se os géis de CHX e UG a 2% em partes iguais (1:1) (CHX+UG / Fleming Manipulações, Ponta Grossa, PR-Brasil).

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental do estudo envolveu a utilização dos três microrganismos, sobre os quais foi testada a ação antimicrobiana das quatro substâncias auxiliares sob três diferentes cenários experimentais.

4.3.1 Ação antimicrobiana das substâncias auxiliares através do método de difusão em ágar

Foram preparadas e padronizadas em espectrofotômetro (Micronal B220, Santo Amaro, SP-Brasil) suspensões com 10^8 células/mL de cada

microrganismo, que foram semeadas em triplicata com auxílio de um *swab* em placas contendo ágar Muller Hinton (Figura 1a), e incubadas a 37°C/10 min para secagem. A seguir foram confeccionados, no ágar, poços de 4 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade (Figuras 1b e 1c), que foram preenchidos com as diferentes substâncias auxiliares a serem testadas (Figura 1d).

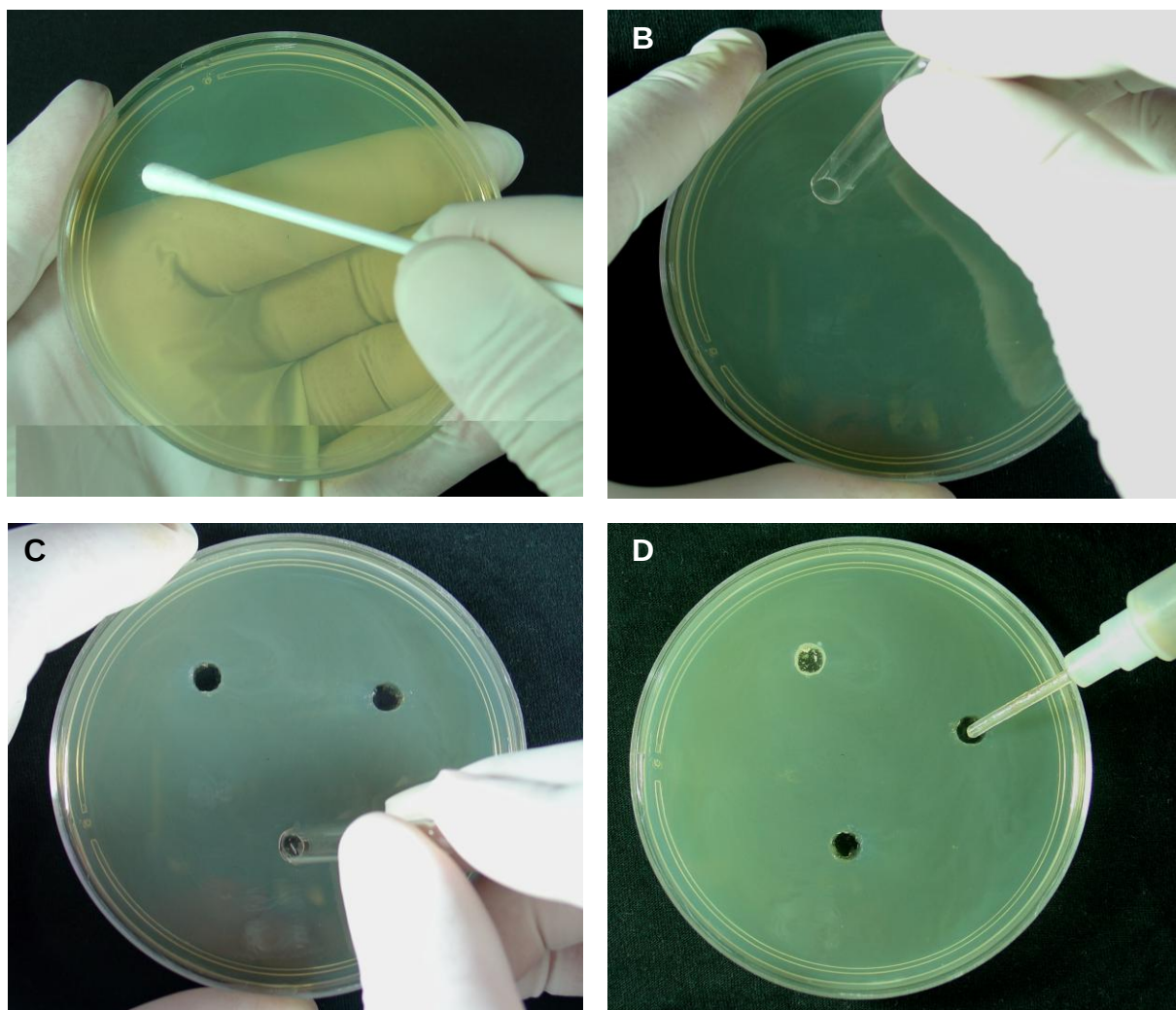


Figura 1- Semeadura das suspensões com 10^8 células/mL de cada microrganismo em placas contendo ágar Muller Hinton (A). Confeção de poços no ágar de 4 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade (B,C), que foram preenchidos com as diferentes substâncias auxiliares a serem testadas (D). Fonte: O autor.

Após incubação em estufa bacteriológica por 24h a 37°C e utilizando um paquímetro digital (Digimess, São Paulo, Brasil), foram medidos os diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano (Figura 2). As mensurações foram feitas colocando o paquímetro digital em três posições diferentes, obtendo assim a média de cada halo de inibição, para cada substância auxiliar sobre cada um dos microrganismos e em cada uma das placas.

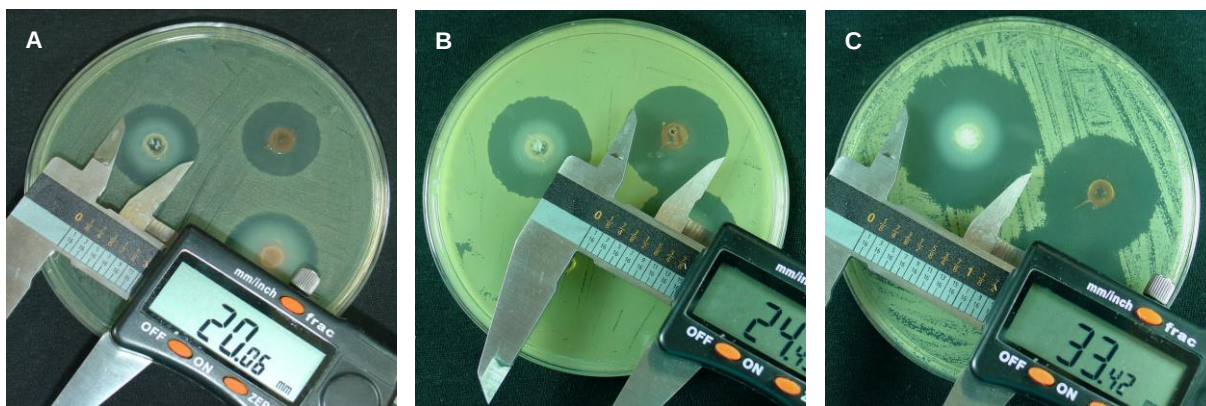


Figura 2- Mensuração dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento de *E. faecalis* (A), *S. aureus* (B) e *C. albicans* (C) frente as diferentes substâncias auxiliares. Fonte: O autor.

4.3.2 Ação antimicrobiana das substâncias auxiliares em dentina infectada.

4.3.2.1 Obtenção, seleção e padronização dos espécimes

Foi utilizado um total de 120 pré-molares inferiores com ápices completos e canal radicular único, conferido radiograficamente (Figura 3). Os dentes foram obtidos do Banco de Dentes Humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa (BDH-UEPG), sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP-UEPG) (parecer Nº 61/2008) (Anexo A).

Com a utilização de curetas periodontais (Hu-Friedy, Chicago, IL-EUA) as superfícies externas das raízes foram limpas de possíveis restos de tecido periodontal ou osso que estivessem aderidos.

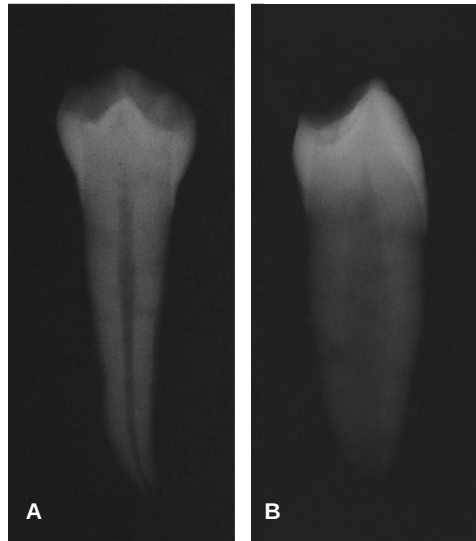


Figura 3- Radiografia em sentido vestibulo-lingual (A) e mesio-distal (B) de pré-molar inferior, confirmando a presença de canal radicular único. Fonte: O autor.

Utilizando uma máquina de corte (Isomet 1000, Buehler, IL, EUA) e um disco de diamante (Diamond Wafering Blade, Series 15LC, Buehler, EUA) a 350 rpm sob irrigação aquosa constante, as coroas foram removidas (Figura 4) e o comprimento das raízes padronizado em 15 mm. Os canais radiculares e o forame apical foram alargados com a utilização de limas tipo K (Maillefer Instruments, Ballaigues, Suíça) até o n° 25 (Figura 5) sob irrigação com água destilada. A fim de se evitar a desidratação, os dentes foram mantidos em gazes estéreis umedecidas durante toda a instrumentação.

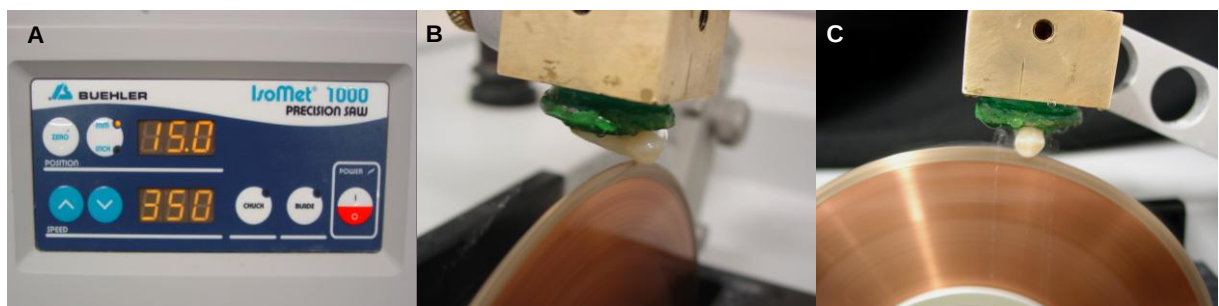


Figura 4- Máquina de corte calibrada a 350 rpm (A); vista frontal (B) e lateral (C) do corte da porção coronal do pré-molar, deixando o comprimento radicular padronizado em 15 mm. Fonte: O autor.

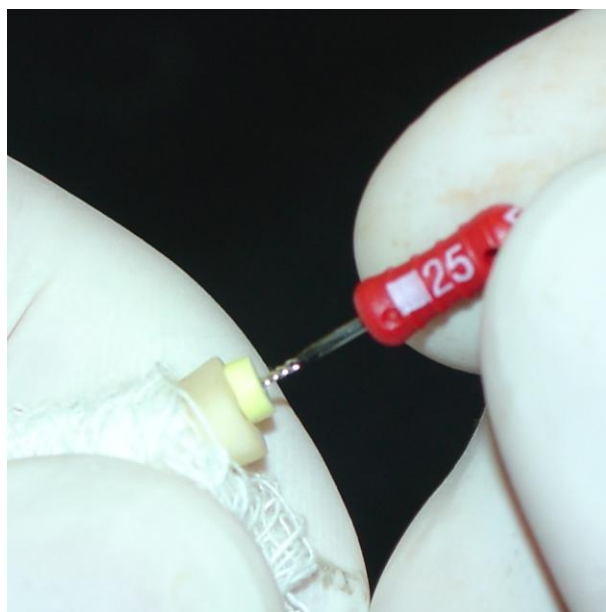


Figura 5- Os canais radiculares e o forame apical foram alargados até a lima K nº 25. Os dentes foram mantidos em gazes estéreis umedecidas a fim de se evitar a desidratação. Fonte: O autor.

A remoção da *smear layer* formada pela instrumentação nas paredes do canal durante a padronização dos espécimes foi feita adaptando o descrito por Perez et al.⁷² 1993 e Ferraz et al.⁷³ 2001. As raízes foram imersas em cuba ultra-sônica (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP-Brasil) contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 17% (Fleming Manipulações, Ponta Grossa, PR-Brasil) por 10 min (Figura 4a), seguido de hipoclorito de sódio a 5.25% (Perquim Rep. Com, Ponta Grossa, PR-Brasil) por 10 min (Figura 4b). Os espécimes então receberam banho por mais 10 min com tiosulfato de sódio a 5% (Figura 4c), e finalmente água destilada (Asfer Indústria Química Ltda, São Caetano do Sul, SP-Brasil) por 1 h (Figura 4d).

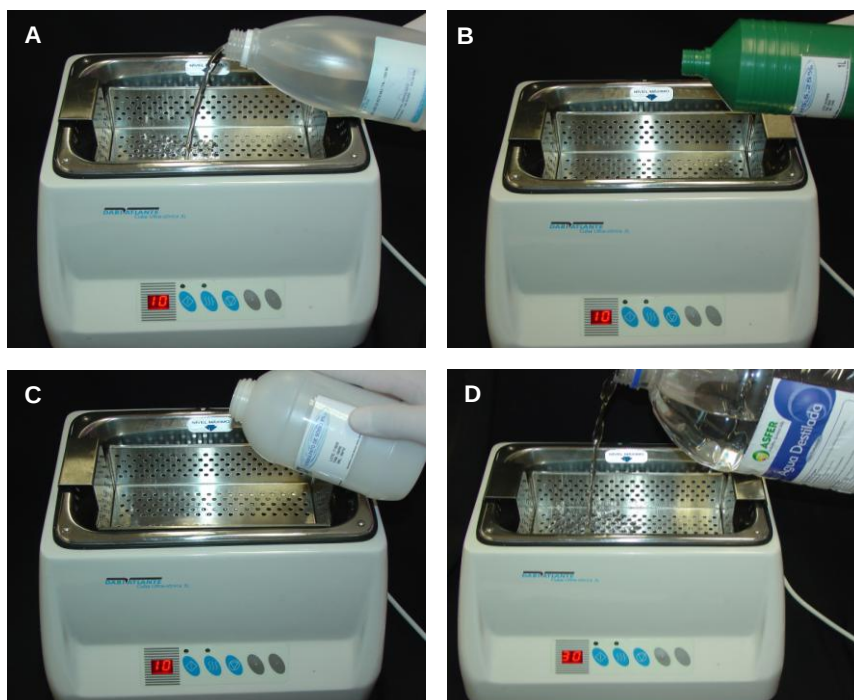


Figura 6- Remoção, em cuba ultra-sônica, da smear layer formada durante a padronização dos espécimes. Primeiramente com EDTA a 17% por 10 min (A), seguido de NaOCl a 5.25% por mais 10 min (B). Os espécimes então receberam banho por mais 10 min com tiosulfato de sódio a 5% (C), e finalmente água destilada por 1 h (D). Fonte: O autor.

4.3.2.2 Esterilização dos espécimes

A esterilização dos espécimes foi feita de acordo com o descrito por Gomes et al.⁷⁴ (2009). Os espécimes, em grupos de 5, foram colocados em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina e levados para autoclavação por 20 min, a 121°C. Após esterilização os espécimes foram colocados em tubos individuais contendo 5 mL de caldo BHI e incubados (37°C/48 h) para comprovação de esterilidade.

4.3.2.3 Grupos experimentais

As 120 raízes foram divididas em 12 grupos de acordo com o microrganismo inoculado e as substâncias auxiliares utilizadas durante o preparo químico-mecânico (PQM) dos canais (Quadro 1). As substâncias auxiliares utilizadas foram CHX 2%, UG 2%, CHX+UG 2% e NAT 1% como controle negativo.

Substância auxiliar	Microrganismo		
	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
CHX	10	10	10
UG	10	10	10
CHX + UG	10	10	10
NAT	10	10	10

Quadro 1- Distribuição dos espécimes (n) por grupo de acordo com as substâncias auxiliares testadas e o microrganismo inoculado.

CHX – gel de clorexidina 2%; UG – gel de *Uncaria tomentosa* 2%; NAT – Natrosol 1%.

Fonte: O autor.

4.3.2.4 Contaminação dos espécimes

A partir de culturas de 24h dos microrganismos, *E. faecalis*, *S. aureus* e *E. coli*, foram preparadas suspensões em 5 mL de caldo BHI com concentração equivalente a 0.5 da escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL). Os espécimes previamente preparados e esterilizados, foram então transferidos para estas suspensões, sendo 5 espécimes em cada tubo, perfazendo um total de 8 tubos e 40 espécimes para cada microrganismo. Os tubos contendo os espécimes foram homogeneizados em aparelho Vortex (Quimis Q220A, Diadema, SP-Brasil) e incubados a 37°C/7dias. A cada dois dias, e dentro da câmara de fluxo laminar, 2,0 mL do caldo contaminado era substituído por 2,0 mL de caldo fresco evitando assim a saturação do meio (Figura 7).

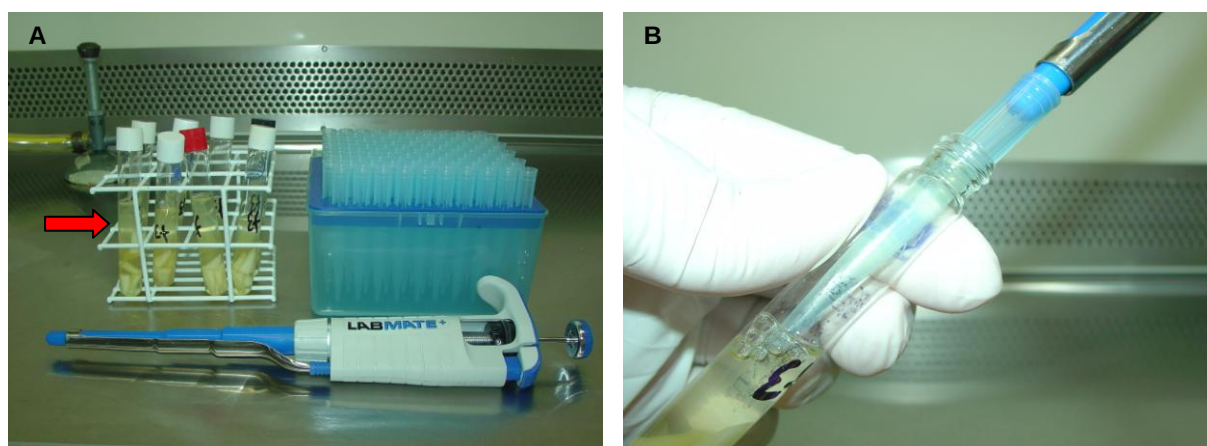


Figura 7- Dentro da câmara de fluxo laminar, os tubos contendo 5 espécimes cada, foram abertos (A / seta vermelha) a cada dois dias durante o período de contaminação para substituir 2mL do caldo contaminado (B) por 2 mL de caldo fresco. Fonte: O autor.

4.3.2.5 Coleta microbiológica inicial

Após a contaminação e sempre dentro da câmara de fluxo laminar, os espécimes foram dispostos em uma plataforma de aço inoxidável estéril (Procind Mecânica e Instalações Industriais Ltda, Piracicaba, SP-Brasil) (Figura 8), onde cada raiz foi irrigada com 1,0 mL de solução salina estéril e a seguir foram coletadas as primeiras amostras microbiológicas dos canais radiculares contaminados (S1). Primeiramente foram utilizados tantos cones de papel (estéreis) quantos fossem necessários para absorver o líquido do canal, porém mantendo-o úmido, seguido de mais um cone de papel # 20 (Dentsply Ind. e Com. Ltda, RJ-Brasil) que foi inserido no comprimento total do canal, permanecendo 1 min. A seguir, estes cones foram transferidos individualmente para tubos estéreis tipo *ependorf* contendo 1,0 mL de caldo BHI. Os tubos foram agitados em aparelho Vortex por 1 minuto e as suspensões obtidas foram diluídas em série 1/10, 1/100 em caldo BHI estéril. Com μL da diluição 10^{-2} foram semeados em duplicata, em ágar BHI e incubados em estufa de CO_2 a $37^\circ\text{C}/48\text{ h}$. Após o período de incubação, foi feita a contagem de colônias de microrganismos presentes nas placas, determinando-se assim o número de UFC/mL recuperado de cada microrganismo. A confirmação de que os microrganismos recuperados foram os mesmos semeados foi realizada através da morfologia das colônias e coloração de Gram. Após S1 foi realizado o preparo químico mecânico (PQM) dos espécimes, como descrito a seguir.

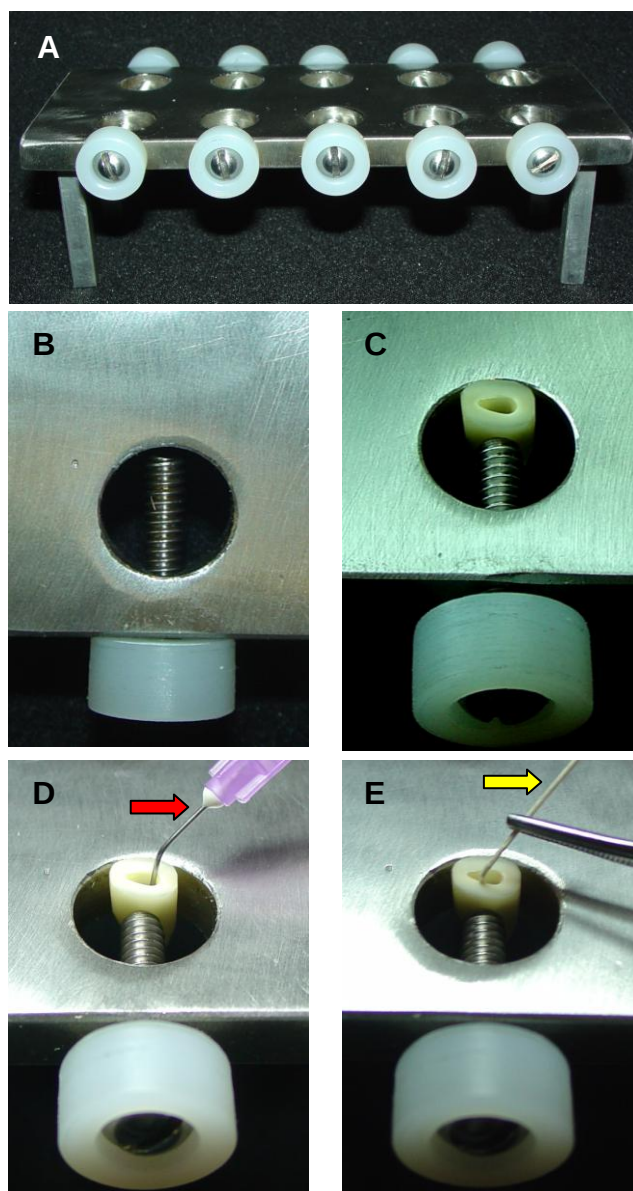


Figura 8- Plataforma de aço inoxidável com dez furos (A) para disposição dos espécimes individualmente (B). Espécime contaminado posicionado na plataforma (C). Cada raiz foi irrigada com 1,0 mL de solução salina estéril (D) utilizando uma agulha 24G (seta vermelha) e a seguir foram coletadas as primeiras amostras microbiológicas dos canais radiculares contaminados (E) utilizando cones de papel estéril #20 (seta amarela). Fonte: O autor.

4.3.2.6 Técnica de instrumentação

Foi feito o PQM em todos os grupos utilizando-se a técnica híbrida descrita por Valdrighi et al.⁴⁹ (1998). Os dois primeiros terços (10,0 mm) do canal foram inicialmente preparados com limas K até o #35; após o que foi utilizada uma broca Gates Glidden (GG / Maillefer Instruments, Ballaigues, Suíça) #2 nesse

comprimento, seguida de uma broca GG #3, que ficou 1,0 mm aquém do comprimento anterior. Uma lima K #10 foi utilizada na recapitulação do canal entre cada uma das limas e brocas 1,0 mm além do comprimento pré-estabelecido com o intuito de se manter a patência. A instrumentação do terço apical começou com uma lima K #20 e terminou na #35, estabelecendo o comprimento de trabalho 1,0 mm aquém do forame apical (14,0 mm), mesma lima que foi utilizada para recapitular o canal na técnica *step-back*, a qual terminou depois do uso de 3 limas maiores na seqüência do instrumento memória (lima #50) com recuo programado em intervalos de 1,0 mm (Figura 9).

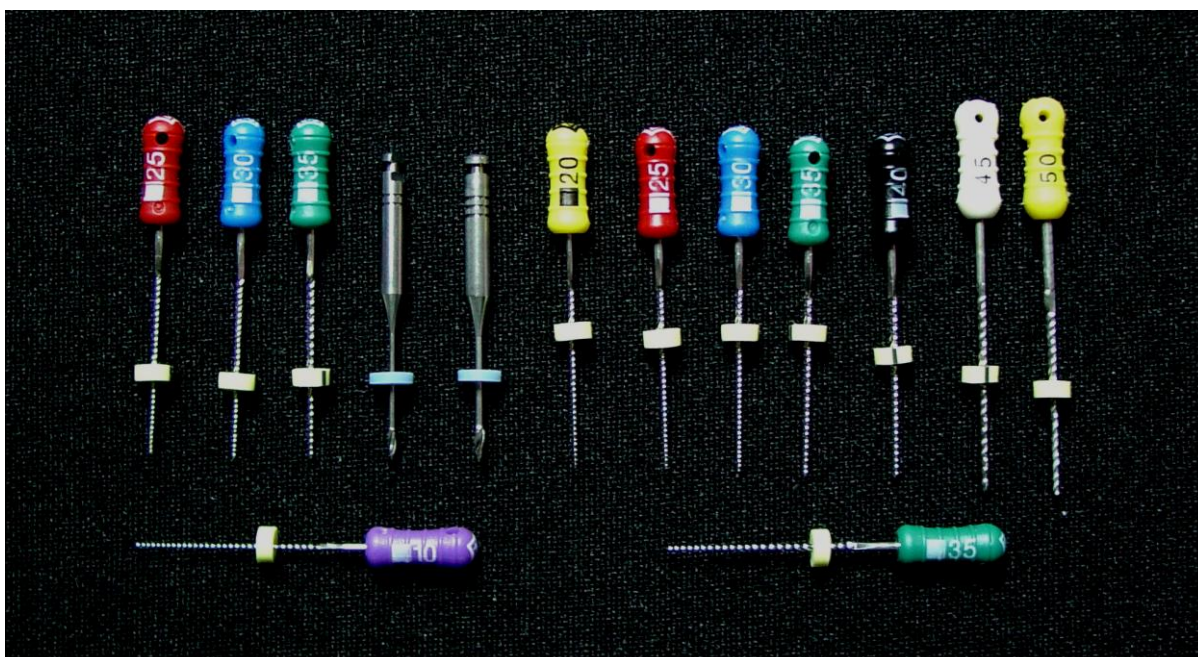


Figura 9- Seqüência de limas e brocas utilizadas no PQM dos espécimes. Fonte: O autor.

4.3.2.7 Irrigação dos canais radiculares

A irrigação durante o PQM ocorreu de acordo com cada grupo experimental. Assim, foi utilizado 0,5 mL da substância auxiliar específica de cada grupo (CHX, UG, CHX+UG ou NAT) antes de cada lima ou broca. Todos os grupos após cada lima ou broca foram irrigados com 1,0 mL de solução salina estéril (SS); após a última lima (n° 50) e depois da irrigação com o último mL de SS, todos os espécimes receberam irrigação com EDTA 17% por 3 min com trocas a cada minuto, para remoção de *smear layer*, seguido de 5 mL de SS (Gráfico 1).

Neste momento os espécimes que foram instrumentados com CHX e CHX+UG como substâncias auxiliares receberam irrigação com solução de *Tween*-80 a 0,5% + lecitina de soja a 0,07% (Fleming Manipulações, Ponta Grossa, PR-

Brasil), que é neutralizador específico da CHX, por 1 min, a fim de se evitar sua ação residual nas coletas microbiológicas. Por fim, 1,0 mL de SS foi utilizado para irrigação final antes de realizar a segunda coleta microbiológica do canal radicular.

4.3.2.8 Coleta microbiológica após PQM

Para esta coleta (S2), primeiramente foram utilizados tantos cones de papel (estéreis) quantos fossem necessários para absorver o líquido do canal, porém mantendo-o úmido, seguido de mais um cone de papel # 35 que foi inserido no comprimento total do canal preparado (14,0 mm) permanecendo 1 min, cone este que foi usado para a análise microbiológica, sendo processado como já descrito para S1.

4.3.2.9 Medicação intracanal

Após S2, as raízes foram mantidas em seus respectivos grupos para o preenchimento do canal. As substâncias usadas para o preenchimento, como medicações intracanal (MIC) foram as mesmas substâncias auxiliares utilizadas durante o PQM, mantendo o NAT como controle negativo.

Após o preenchimento total do canal, os espécimes foram fixados em placas de 24 poços de fundo plano (Corning Cell Culture, Corning, EUA), contendo cera utilidade no fundo de cada poço para fixação dos espécimes. O orifício de entrada do canal foi selado também com cera utilidade previamente desinfetada com NaOCl 5,25% por 1 min, e este neutralizado com tiosulfato de sódio 0,6% por mais 1 min. Os poços foram preenchidos com caldo BHI até a superfície dos espécimes (Figura 10) e a seguir foi colocada uma gaze estéril umedecida em SS, e a placa tampada e vedada para ser levada à estufa a 37°C/7 dias.

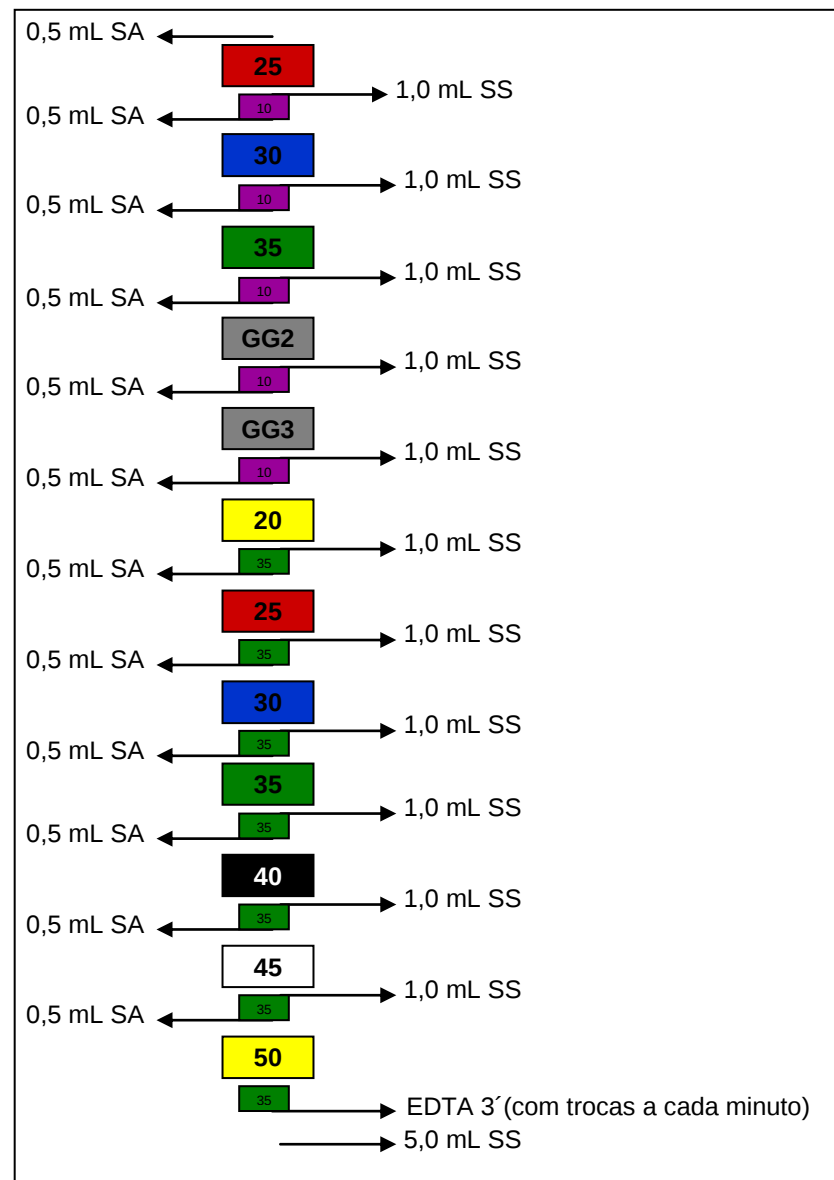


Gráfico 1- Protocolo de irrigação dos espécimes durante o PQM com a técnica híbrida. SA- substância auxiliar; SS- solução salina; GG- broca Gates-Glidden. Fonte: O autor.

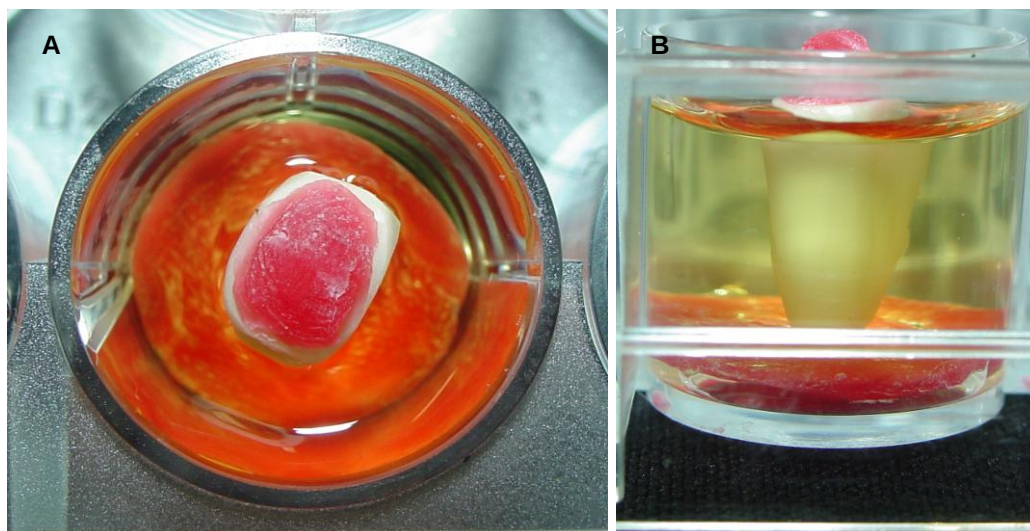


Figura 10- Vista superior (A) e lateral (B) do espécime fixado com cera utilidade no fundo do poço. O orifício de entrada do canal foi selado também com cera utilidade e os poços foram preenchidos com caldo BHI até a superfície dos espécimes. Fonte: O autor.

Após o período de incubação e em ambiente estéril, todos os grupos receberam irrigação com 5 mL de solução salina estéril e então foi realizada a terceira coleta microbiológica (S3), seguindo os procedimentos utilizados para S2.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.4.1 Ação antimicrobiana das substâncias auxiliares através do método de difusão em ágar

Os valores coletados pela mensuração dos halos de inibição foram analisados através de estatística descritiva, análise de variância com um critério de classificação (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças significativas entre as substâncias auxiliares analisadas. O nível de significância aplicado foi de 5%.

4.4.2 Ação antimicrobiana das substâncias auxiliares em dentina infectada

Antes da submissão dos dados obtidos nas diferentes coletas (S1, S2 e S3) a uma análise estatística apropriada, a normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste Kolmogorov-Smirnov e a igualdade de variâncias pelo teste de Barlett. O nível de significância aplicado foi de 5%.

Como não houve normalidade e nem igualdade de variância, os dados foram submetidos à análise estatística não-paramétrica. Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para cada uma das substâncias comparando-se os tempos e para cada tempo, variando as substâncias. A análise foi feita para cada um dos microrganismos. Para a comparação par-a-par, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. O nível de significância aplicado foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS AUXILIARES ATRAVÉS DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Na avaliação da capacidade de inibição do crescimento microbiano pelo método de difusão em agar, a substância auxiliar mais efetiva sobre *E. faecalis* e *C. albicans* foi a associação CHX+UG, enquanto que frente a *S. aureus* o efeito inibidor das 3 substâncias foi semelhante, conforme apresentado na Tabela 1. O controle negativo, Natrosol, não inibiu o crescimento de nenhum dos microrganismos testados.

Tabela 1- Média e desvio padrão dos halos de inibição do crescimento (mm) dos microrganismos avaliados, formados pelas substâncias auxiliares testadas.

Substância auxiliar	Microrganismo		
	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
CHX	20,45 ± 0,2 B	24,37 ± 0,3 E,F	31,69 ± 0,6 H
UG	18,85 ± 0,1 C	25,42 ± 0,4 E	26,51 ± 0,2 I
CHX+UG	21,70 ± 0,7 A	25,05 ± 0,3 F	33,47 ± 0,5 J
NAT	0,00 ± 0,0 D	0,00 ± 0,0 G	0,00 ± 0,0 K

Para cada coluna, médias seguidas de letras iguais não são significativamente diferentes. CHX – gel de clorexidina a 2%; UG – gel de *Uncaria tomentosa* a 2%; NAT – Natrosol a 1%. Fonte: O autor.

5.2 AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS SUBSTÂNCIAS AUXILIARES EM DENTINA INFECTADA

Nas Tabelas 2, 3 y 4 fez-se a compilação dos dados obtidos em S1, S2 e S3 para cada substância auxiliar e sobre os três microrganismos.

A carga microbiana inicial dos espécimes (S1) foi semelhante para cada grupo experimental dentro de cada um dos microrganismos. Após o PQM (S2), os microrganismos foram recuperados apenas dos canais tratados com NAT.

Após os 7 dias com a MIC, observa-se que apenas *E. faecalis* foi recuperado dos canais radiculares e que a UG foi significativamente mais eficaz que a CHX. No controle NAT, o numero de microrganismos recuperados em S3 foi maior que os valores obtidos em S2 (Tabela 2).

Tabela 2- Média e desvio padrão das UFC/mL de *Enterococcus faecalis* nas diferentes coletas microbiológicas.

Substância auxiliar	<i>Enterococcus faecalis</i>		
	S1	S2	S3
CHX	$1,30 \times 10^5 \pm 0,71 \times 10^5$ Aa	$0 \pm 0,00$ Fc	$11,5 \pm 10,30$ Db
UG	$1,15 \times 10^5 \pm 0,25 \times 10^5$ Ad	$0 \pm 0,00$ Ff	$2,5 \pm 5,40 \times 10^4$ Ee
CHX+UG	$1,11 \times 10^5 \pm 0,23 \times 10^5$ Ag	$0 \pm 0,00$ Fh	$0 \pm 0,00$ Eh
NAT	$1,00 \times 10^5 \pm 0,22 \times 10^5$ Aj	$1,30 \times 10^3 \pm 0,71 \times 10^3$ Ck	$1,15 \times 10^5 \pm 0,71 \times 10^5$ Bi

Para cada coluna, médias seguidas de letras maiúsculas iguais não são significativamente diferentes. Para cada linha, médias seguidas de letras minúsculas iguais não são significativamente diferentes. CHX – gel de clorexidina a 2%; UG – gel de *Uncaria tomentosa* a 2%; NAT – Natrosol a 1%. Fonte: O autor.

Tabela 3- Média e desvio padrão das UFC/mL de *Staphylococcus aureus* nas diferentes coletas microbiológicas.

Substância auxiliar	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	S1	S2	S3
CHX	$6,42 \times 10^4 \pm 2,29 \times 10^4$ Aa	$0 \pm 0,00$ Cb	$0 \pm 0,00$ Eb
UG	$6,44 \times 10^4 \pm 2,72 \times 10^4$ Ac	$0 \pm 0,00$ Cd	$0 \pm 0,00$ Ed
CHX+UG	$6,96 \times 10^4 \pm 1,54 \times 10^4$ Ae	$0 \pm 0,00$ Cf	$0 \pm 0,00$ Ef
NAT	$6,65 \times 10^4 \pm 1,62 \times 10^4$ Ag	$1,20 \times 10^3 \pm 1,36 \times 10^3$ Bi	$4,15 \times 10^3 \pm 1,00 \times 10^3$ Dh

Para cada coluna, médias seguidas de letras maiúsculas iguais não são significativamente diferentes. Para cada linha, médias seguidas de letras minúsculas iguais não são significativamente diferentes. CHX – gel de clorexidina a 2%; UG – gel de *Uncaria tomentosa* a 2%; NAT – Natrosol a 1%. Fonte: O autor.

Tabela 4- Média e desvio padrão das UFC/mL de *Candida albicans* nas diferentes coletas microbiológicas.

Substância auxiliar	<i>Candida albicans</i>		
	S1	S2	S3
CHX	$5,19 \times 10^4 \pm 1,60 \times 10^4$ Ba	$0 \pm 0,00$ Db	$0 \pm 0,00$ Eb
UG	$5,47 \times 10^4 \pm 1,59 \times 10^4$ Bc	$0 \pm 0,00$ Dd	$0 \pm 0,00$ Ed
CHX+UG	$5,38 \times 10^4 \pm 1,29 \times 10^4$ Be	$0 \pm 0,00$ Df	$0 \pm 0,00$ Ef
NAT	$5,52 \times 10^4 \pm 1,23 \times 10^4$ Bh	$1,50 \times 10^3 \pm 0,71 \times 10^3$ Ci	$7,40 \times 10^4 \pm 1,30 \times 10^4$ Ag

Para cada coluna, médias seguidas de letras maiúsculas iguais não são significativamente diferentes. Para cada linha, médias seguidas de letras minúsculas iguais não são significativamente diferentes. CHX – gel de clorexidina a 2%; UG – gel de *Uncaria tomentosa* a 2%; NAT – Natrosol a 1%. Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

Um dos principais objetivos da terapia endodôntica é a desinfecção do sistema de canais radiculares, o que promoverá o reparo dos tecidos periodontais (Gomes et al.⁸ 1996, Gomes et al.⁷⁵ 2004, Peters et al.⁷⁶ 2001).

A escolha dos microrganismos facultativos, *E. faecalis*, *S. aureus* e *C. albicans*, utilizados neste estudo, justifica-se no fato de serem considerados por muitos autores como as espécies mais resistentes da cavidade bucal e uma das possíveis causas do insucesso no tratamento endodôntico (Gomes et al.⁸ 1996, Cheung, Stock⁷⁷ 1993).

Antes da realização dos testes em dentina radicular humana achou-se conveniente determinar se a UG apresentava ação antimicrobiana frente aos microrganismos a serem testados e para tal foi utilizado o método de difusão em ágar, que por sua característica indica o potencial antimicrobiano de uma substância. Este método serviu como indicador preliminar de ação antimicrobiana das substâncias, e permitiu comprovar a capacidade da UG de inibir o crescimento microbiano.

Os produtos naturais têm sido utilizados por séculos na medicina popular. Porém, isso não pode ser justificativa para indicar seu uso, precisando-se assim evidência científica que sustente as propriedades terapêuticas dos produtos naturais e sua biocompatibilidade. A utilização da UG como substância auxiliar no tratamento endodôntico justifica-se nas propriedades terapêuticas consolidadas da planta e que até a data não tinham sido extrapoladas à endodontia, onde se pode abrir uma possibilidade de terapia natural, segura e de baixo custo (Heitzman et al.²⁷ 2005).

A razão de se escolher a CHX como controle positivo deste estudo foi baseado na grande quantidade de pesquisa desenvolvida com essa substância na área da microbiologia endodôntica, devido a sua grande capacidade antimicrobiana e alta biocompatibilidade (Mohammadi, Abbott¹⁸ 2009).

Foi escolhida a utilização do formato gel para todos os grupos experimentais, pelas vantagens que este apresenta em relação à solução como lubrificante do canal, o que pode promover uma melhor remoção dos restos orgânicos (Ferraz et al.⁷³ 2001). A base gel utilizada na preparação das substâncias auxiliares foi a hidroxietilcelulose, conhecida comercialmente como Natrosol, e que

tem se mostrado como uma substância inerte, sem capacidade antimicrobiana (Ferraz et al.⁵² 2007); o que foi corroborado em testes pilotos.

Nossos estudos pilotos mostraram que com concentrações maiores a 5%, a UG perde capacidade antimicrobiana sobre os microrganismos testados, sendo que concentrações de 2% e 5% não mostraram diferenças significativas. Assim, optou-se por padronizar a concentração das substâncias auxiliares em 2%. A concentração do controle negativo (NAT) foi de 1%, concentração que permitiu o escoamento ideal que deve ter o gel no canal radicular e que foi a concentração utilizada no preparo das outras substâncias experimentais.

Diversos modelos experimentais em dentina infectada têm sido propostos. A grande maioria deles utilizando dentina bovina, sendo que os túbulos dentinários dos dentes bovinos apresentam maior diâmetro comparado à dentina humana, o que poderia influenciar na capacidade de contaminação dos túbulos dentinários pelos microrganismos (Berber et al.⁴⁵ 2006, Dametto et al.⁴⁶ 2005). Assim, para o desenvolvimento deste estudo foi escolhido um modelo experimental em dentina radicular humana.

Foram estabelecidos 7 dias para contaminação dos espécimes, de acordo com Dametto et al.⁴⁶ (2005), tempo que permitiu aos microrganismos colonizar o canal e os túbulos dentinários.

Após o PQM foi utilizado o neutralizante específico da CHX para evitar qualquer efeito residual nas coletas microbiológicas. O neutralizante foi utilizado nos grupos CHX e CHX+UG, sendo que para o grupo UG, testes pilotos demonstraram que a irrigação final com EDTA e SS foi suficiente para evitar qualquer efeito residual nesse grupo.

Após o PQM todos os grupos experimentais conseguiram deixar o canal livre de microrganismos, inclusive o controle negativo (NAT), que conseguiu uma diminuição significativa da carga microbiana. O que está de acordo com os resultados de Berber et al.⁴⁵ (2006), onde independentemente da substância auxiliar utilizada durante o PQM, sempre será possível diminuir significativamente a carga bacteriana após PQM, sempre que seja utilizada uma quantidade importante do irrigante, porém o que nem sempre será possível é evitar a recontaminação do canal pelos microrganismos capazes de colonizar os túbulos dentinários, perpetuando assim a lesão.

O prazo de 7 dias que a medicação intracanal permaneceu no canal radicular permitiu, se fosse o caso, que os microrganismos que ficaram nos túbulos dentinários voltassem a colonizar o canal (Oliveira et al.⁵³ 2007). Os resultados obtidos neste estudo confirmam o descrito por Love⁷⁸ (2001), células de *E. faecalis* conseguem infectar túbulos dentinários e manter-se viáveis neles na presença de nutrientes. Os resultados obtidos no grupo NAT após os 7 dias com MIC concordam com Dametto et al.⁴⁶ (2005); *E. faecalis* viável nos túbulos dentinários foi capaz de recontaminar o canal radicular, inclusive apresentando uma carga microbiana maior à inicial. Mesmo efeito foi observado para *S. aureus* e *C. albicans*.

Após os 7 dias com MIC, foram coletadas UFC do canal dos espécimes que receberam CHX como MIC, resultado que discorda com os obtidos por Gomes et al.⁷⁹ (2003), onde a CHX mostrou-se eficaz como MIC evitando a recontaminação do canal até por 14 dias. Os resultados mostraram que apenas os espécimes que receberam CHX+UG e UG como MIC puderam manter o canal livre de UFC de *E. faecalis*, o microrganismo mais resistente à terapia endodôntica. Assim a UG se apresentou superior à CHX como MIC. Já para *S. aureus* e *C. albicans*, todos os grupos experimentais conseguiram manter o canal livre dos microrganismos.

De acordo com os resultados obtidos e as limitações do presente estudo, sugerem-se futuras pesquisas que visem avaliar a capacidade de remoção de *smear layer* pela UG, estudos *in vivo* que incluam a UG no protocolo da terapia endodôntica, assim como avaliar possíveis interações da UG com outras substâncias auxiliares ao tratamento endodôntico.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

1. A unha de gato apresenta capacidade de inibição do crescimento microbiano sobre *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*;
2. A unha de gato foi eficaz no preparo químico-mecânico, desinfetando os canais contaminados com *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*;
3. A unha de gato conseguiu manter os canais livres de unidades formadoras de colônias de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*;
4. A associação experimental clorexidina+unha de gato, mostrou sinergismo na sua atividade antimicrobiana quando utilizada como substância auxiliar ao preparo químico-mecânico e como medicação intracanal.

REFERÊNCIAS

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965 Sep;20(3):340-9.
2. Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am.* 1974 Apr;18(2):269 –96.
3. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997 Sep;30(5):297-306.
4. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998 Jan;31(1):1-7.
5. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res.* 1981 Aug;89(4):321-8.
6. 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 Oct;1(5):170-5.
7. Peters OA. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. *J Endod.* 2004 Aug;30(8):559-67.
8. Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J.* 1996 Mar;29(2):69-75.
9. Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J.* 2006 Nov;39(11):878-85.

10. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1983 Mar;55(3):307-12.
11. Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol.* 1990 Aug;6(4):142-9.
12. Peters LB, Wesselink PR. Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. *Int Endod J.* 2002 Aug;35(8):660-7.
13. Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res.* 1987 Aug;66(8):1375-9.
14. Gomes BP, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de 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 Oct;102(4):544-50.
15. Jeanson MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod.* 1994 Jun;20(6):276-8.
16. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod.* 1997 Apr;23(4):229-31.
17. Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. *J Endod.* 2002 Feb;28(2):68-71.
18. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J.* 2009 Apr;42(4):288-302.
19. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium

- hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Jan;97(1):79-84.
20. Wang CS, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. *J Endod.* 2007 Nov;33(11):1283-9.
 21. Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod.* 1995 Oct;21(10):513-5.
 22. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Aníbal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J.* 2002 Sep;35(9):735-9.
 23. Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *J Endod.* 2000 Jun;26(6):315-7.
 24. Rosenthal S, Spångberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Oct;98(4):488-92.
 25. Basrani BR, Manek S, Sodhi RNS, Fillery E, Manzur A. Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate. *J Endod.* 2007 Aug;33(8):966–9.
 26. Murray PE, Farber RM, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. Evaluation of *Morinda citrifolia* as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2008 Jan;34(1):66-70.
 27. Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E, Vaisberg AJ, Hammond GB. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry.* 2005 Jan;66(1):5-29.
 28. Obregón-Vilches, L.E. Uña de gato - Género *Uncaria* estudios botánicos, químicos y farmacológicos de *Uncaria tomentosa*, *Uncaria guianensis*. Instituto de fitoterapia americano, Lima, Peru; 1996.

29. Santa Maria A, Lopez A, Diaz MM, Albán J, Galán de Mera A, Vicente Orellana JA, Pozuelo JM. Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by bioassays in vitro. *J Ethnopharmacol.* 1997 Aug;57(3):183-7.
30. Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr.* 1966 Dec 20;74(5):Suppl:1-380.
31. Sundqvist G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. *Dissertation.* Umea, Sweden, University of Sweden, 1976.
32. Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res.* 1981 Dec;89(6):475-84.
33. Miller W D. The microorganisms of the human. 1st ed. Philadelphia, PA,USA: SS White Dental Mfg.Co. 1894.
34. Lin LM, Di Fiore PM, Lin J, Rosenberg PA. Histological study of periradicular tissue responses to uninfected and infected devitalized pulps in dogs. *J Endod.* 2006 Jan;32(1):34-8.
35. Nair PN, Sjögren U, Figdor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999 May;87(5):617-27.
36. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994 Oct;78(4):522-30.
37. Chávez De Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J.* 2003 Jul;36(7):500-8.
38. Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod.* 1989 Jan;15(1):13-9.

39. 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 Jan;85(1):86-93.
40. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod.* 2000 Oct;26(10):593-5.
41. 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 Sep;34(6):429-34.
42. Adib V, Spratt D, Ng YL, Gulabivala K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J.* 2004 Aug;37(8):542-51.
43. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Jan;97(1):85-94.
44. Spangberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1973 Dec;36(6):856-71.
45. Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J.* 2006 Jan;39(1):10-7.
46. Dametto FR, Ferraz CC, de Almeida Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de 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 Jun;99(6):768-72.

47. Zerella JA, Fouad AF, Spångberg LS. Effectiveness of a calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate mixture as disinfectant during retreatment of failed endodontic cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Dec;100(6):756-61.
48. Ercan E, Dalli M, Dülgergil 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 Aug;102(2):e27-31.
49. Valdrighi L, Biral RR, Pupo J, Souza-Filho FJ. Técnicas de instrumentação que incluem instrumentos rotatórios no preparo biomecânico dos canais radiculares. In: *Endodontia: Tratamento de canais radiculares*, 3rd edn. São Paulo, Brazil: Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda 1998: 419-28.
50. Tanomaru Filho M, Yamashita JC, Leonardo MR, Silva LA, Tanomaru JM, Ito IY. vivo microbiological evaluation of the effect of biomechanical preparation of root canals using different irrigating solutions. *J Appl Oral Sci.* 2006 Apr;14(2):105-10.
51. Ballal V, Kundabala M, Acharya S, Ballal M. Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. *Aust Dent J.* 2007 Jun;52(2):118-21.
52. 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 Apr;18(4):294-8.
53. Oliveira DP, Barbizam JV, Trope M, Teixeira FB. In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 May;103(5):702-6.
54. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Paiva SS, Guimarães-Pinto T, Magalhães KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical

- periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Jul;104(1):122-30.
55. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2007 Dec;22(6):411-8.
 56. Manzur A, González AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod.* 2007 Feb;33(2):114-8.
 57. Little JW. Complementary and alternative medicine: impact on dentistry. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Aug;98(2):137-45.
 58. Silva FB, Almeida JM, Sousa SM. Natural medicaments in endodontics -- a comparative study of the anti-inflammatory action. *Braz Oral Res.* 2004 Apr-Jun;18(2):174-9.
 59. Gentil M, Pereira JV, Sousa YT, Pietro R, Neto MD, Vansan LP, de Castro França S. In vitro evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressings. *Phytother Res.* 2006 Mar;20(3):184-6.
 60. Ferreira FB, Torres SA, Rosa OP, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC, Gomes BP. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Nov;104(5):709-16.
 61. Rezende GP, Costa LR, Pimenta FC, Baroni DA. In vitro antimicrobial activity of endodontic pastes with propolis extracts and calcium hydroxide: a preliminary study. *Braz Dent J.* 2008 Apr;19(4):301-5.
 62. Keplinger K, Laus G, Wurm M, Dierich MP, Teppner HU *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.--ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *J Ethnopharmacol.* 1999 Jan;64(1):23-34.

63. Aquino R, De Feo V, De Simone F, Pizza C, Cirino G. Plant metabolites. New compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. *J Nat Prod*. 1991 Mar-Apr;54(2):453-9.
64. Wurm M, Kacani L, Laus G, Keplinger K, Dierich MP. Pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce human endothelial cells to release a lymphocyte-proliferation-regulating factor *Planta Med*. 1998 Dec;64(8):701-4.
65. Aguilar JL, Rojas P, Marcelo A, Plaza A, Bauer R, Reininger E, Klaas CA, Merfort I. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *J Ethnopharmacol*. 2002 Jul;81(2):271-6.
66. Mur E, Hartig F, Eibl G, Schirmer M. Randomized double blind trial of an extract from the pentacyclic alkaloid-chemotype of *uncaria tomentosa* for the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2002 Apr;29(4):678-81.
67. Halkes SBA. Safety issues in phytotherapy. In: Ernst E, editor. *Herbal medicine: a concise overview for professionals*. Oxford: Butterworth & Heinemann; 2000. p. 82-100.
68. Silva DH, Alvarado DR, Hidalgo HJ, Cerrutti ST, Garcia RJ, Dávila MW *et al*. *Monografia de Uncaria tomentosa (Willd.) DC*. Iquitos, Peru: Instituto Peruano de Seguridad Social/Instituto de Medicina Tradicional; 1998.
69. Ccahuana-Vasquez RA, Santos SS, Koga-Ito CY, Jorge AO. Antimicrobial activity of *Uncaria tomentosa* against oral human pathogens. *Braz Oral Res*. 2007 Jan-Mar;21(1):46-50.
70. Sheng Y, Li L, Holmgren K, Pero RWDNA repair enhancement of aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* in a human volunteer study. *Phytomedicine*. 2001 Jul;8(4):275-82.
71. Reis SR, Valente LM, Sampaio AL, Siani AC, Gandini M, Azeredo EL, D'Avila LA, Mazzei JL, Henriques MG, Kubelka CF. Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. *Int Immunopharmacol*. 2008 Mar;8(3):468-76

72. Perez F, Rochd T, Lodter JP, Calas P, Michel G. In vitro study of the penetration of three bacterial strains into root dentine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993 Jul;76(1):97-103.
73. 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 Jul;27(7):452-5.
74. Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, Souza-Filho FJ. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent.* 2009 Jan;37(1):76-81.
75. Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Apr;19(2):71-6.
76. Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, Van Wilkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2001 Feb;27(2):76-81.
77. Cheung GS, Stock CJ. In vitro cleaning ability of root canal irrigants with and without endosonics. *Int Endod J.* 1993 Nov;26(6):334-43.
78. Love RM. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001 Jul;34(5):399-405.
79. 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 Sep;36(9):604-9.

ANEXOS

A: Aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética em
Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa

B: Aprovação da emenda no protocolo de pesquisa 14195/08 pelo Comitê de Ética
em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa



PARECER Nº 61/2008
Protocolo: 14195/08

Em reunião ordinária, realizada dia 11 de dezembro de 2008, a Comissão de Ética em Pesquisa, APROVOU o protocolo de pesquisa intitulado "A *Uncaria tomentosa* como medicação intracanal na desinfecção de dentina radicular contaminada por *Enterococcus faecalis*." de responsabilidade da pesquisadora Elizabete Brasil dos Santos.

Ponta Grossa, 11 de dezembro de 2008.

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

Profª. MSc. Marlene Harger Zimmermann
Coordenadora



PARECER Nº 81/2009
Protocolo: 14195/08

Em reunião ordinária realizada dia 26 de Novembro de 2009, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** a Emenda referida ao protocolo de pesquisa intitulado "**A uncária tomentosa como medicação intracanal na desinfecção de dentina radicular contaminada por Enterococcus faecalis**" de responsabilidade da pesquisadora Elizabete Brasil dos Santos.

Ponta Grossa, 30 de Novembro de 2009.

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


Prof. Dr. Ulisses Coelho
Coordenador