CLÁUDIA DE MOURA CARREIRA

**Avaliação *in vitro* do controle microbiano e da neutralização de endotoxinas
presentes em canais radiculares por nanopartículas de prata**

São Paulo
2009

CLÁUDIA DE MOURA CARREIRA

***Avaliação *in vitro* do controle microbiano e da neutralização de endotoxinas
presentes em canais radiculares por nanopartículas de prata***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título
de Doutor em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Bombana

São Paulo
2009

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Carreira, Cláudia de Moura

Avaliação *in vitro* do controle microbiano e da neutralização de endotoxinas presentes em canais radiculares por nanopartículas de prata / Cláudia de Moura Carreira; orientador Antônio Carlos Bombana. -- São Paulo, 2009.

119p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Endodontia) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Canal radicular – Controle microbiano – Neutralização de endotoxinas
2. Medicação endodôntica intracanal 3. Irrigantes do canal radicular 4. Nanopartículas de prata

CDD 617.6342
BLACK D242

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carreira CM. Avaliação *in vitro* do controle microbiano e da neutralização de endotoxinas presentes nos canais radiculares por nanopartículas de prata. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: ____/____/2010

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha Família, maior bem que Deus me deu.

Aos meus pais *Maria Irene* e *Carlos Alberto* por todo amor a mim dedicado, pelos ensinamentos religiosos e de ética que resultaram no meu caráter, por todos os esforços que vocês fizeram para que eu pudesse completar mais um sonho. Obrigada por poder contar sempre com o apoio de vocês.

À minha irmã *Carla* que com sua sensibilidade e carinho sempre esteve atenta aos meus problemas, e com sua alegria e amor sempre animou o meu espírito. Obrigada por ter dado dois grandes presentes à nossa família: a *Laura* e a *Fernanda*.

À minha irmã *Camila* pelo companheirismo e pelos sábios aconselhamentos. Mana, obrigada pelo exemplo de perseverança, superação e sabedoria!

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

À querida *Prof^a. Maria Suely Lamarão*, que orientou meus primeiros passos na área acadêmica e despertou meu prazer pela endodontia. Obrigada por não ter me deixado desistir e ter me incentivado a cursar o Doutorado.

Ao meu orientador *Prof Antonio Carlos Bombana* que me recebeu tão carinhosamente, sonhou comigo e me incentivou em todas as fases deste trabalho. Obrigada por ter-me dedicado seu tempo e por ter um brilho especial no olhar durante a elaboração desse trabalho. O senhor pode não imaginar o quanto suas palavras me passavam energia para prosseguir.

Ao *Prof Antônio Olavo Cardoso Jorge*, pela confiança e por me permitir ter livre acesso ao seu laboratório. Sua colaboração foi indispensável e decisiva para concretização desse projeto. Agradeço por me permitir usufruir de seu conhecimento, sua amizade e de seu exemplo de profissionalismo. Obrigada por estar sempre disponível e pela oportunidade de dividir junto ao senhor e seus orientados um ambiente de pesquisa. Meus sinceros agradecimentos.

Ao amigo *Prof. José Luiz Lage-Marques*, que me acolheu nessa Universidade e se tornou mais que um professor, um grande amigo a quem tenho grande admiração. Sua presença e competência, sempre contribuíram muito para o meu crescimento profissional. Obrigada por ter acreditado em mim, desde o início, e ter me ajudado em todos os momentos que precisei.

A Profª *Luciane Dias de Oliveira*, pela disposição em me ensinar e paciência em me fazer entender o universo das endotoxinas. Obrigada pela atenção e amizade.

A Profª *Patrícia Helena Pereira Ferrari*, pela amizade, estímulo e exemplo de dedicação à pesquisa científica, particularmente pelo entusiasmo da realização desse trabalho. Obrigada pela alegria e amor com que você trabalha e nos incentiva.

Aos professores desse curso de pós-graduação, por todo conhecimento adquirido na sala de aula e nos corredores. Meu muito obrigada por ter tido essa oportunidade. Sinto-me honrada.

Aos colegas da pós-graduação, pela amizade, apoio e agradável convívio

Aos amigos conquistados nesses anos na FOU SP, *Marina Beloti, Emanuela Franco, Ângela Araki, Eliana Souza, Crystiane Basílio, Cacio Moura, Leonardo Golçalves e Karla Baumotte*, que me proporcionaram momentos agradáveis e muito me apoiaram.

À amiga *Crístiane Pereira*, por estar sempre presente e ter executado esse trabalho junto comigo. Obrigada por ter me dado mais que uma “mãozinha”, agradeço também o ombro amigo e por ter me acolhido na sua família.

Às alunas da pós graduação da UNESP de biopatologia bucal, *Anna Carolina, Ana Karina, Vanessa e Polyana* pela amizade construída e por toda ajuda que me prestaram no laboratório.

Às alunas de pós-graduação da UNESP de endodontia, *Alessandra, Lílían, Flávia e Adriána*, que sempre estiveram dispostas no esclarecimento de minhas dúvidas a respeito do teste de endotoxina

Às grandes amigas de força *Sílvia, Raffaella, Ilene, Cíbele e Camílas* que me apoiaram e me proporcionaram momentos de muito prazer e alegria.

À secretária do departamento de Dentística e Endodontia *Ana María*, que sempre me informou das obrigações do curso, entrega de relatório e demais procedimentos burocráticos.

À bibliotecária *Glauci* que com toda atenção, paciência e carinho corrigiu esse trabalho. Parabéns pelo seu profissionalismo e entusiasmo com que você conduz seu trabalho.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada”.

“Não existe nenhum caminho lógico para a descoberta das leis do universo – o único caminho é o da intuição”.

Albert Einstein

RESUMO

Carreira CM. Avaliação *in vitro* do controle microbiano e da neutralização de endotoxinas presentes nos canais radiculares por nanopartículas de prata [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da solução de nanopartículas de prata, utilizada como irrigante e medicação intracanal, em controlar os microrganismos e neutralizar endotoxinas no canal radicular. Para isso, foram utilizadas 48 raízes de dentes humanos padronizadas em 16 mm e com diâmetro apical correspondente a uma lima tipo Kerr nº. 30. Os canais foram contaminados por 28 dias com *E. coli* e por 21 dias com *E. faecalis* e *C. albicans*. Os espécimes foram divididos em quatro grupos (n=12), de acordo com a substância utilizada (solução irrigadora e medicação intracanal): G1) solução salina e solução salina (grupo controle); G2) hipoclorito de sódio 1% associado ao creme Endo-PTC e hidróxido de cálcio - protocolo tradicional da FOUSP; G3) solução de nanopartículas de prata 50 ppm e hidróxido de cálcio associado à solução de nanopartículas de prata; e G4) solução de nanopartículas de prata 50 ppm e solução de nanopartículas de prata 50 ppm. Foram realizadas cinco coletas do conteúdo do canal radicular para avaliar a atividade antimicrobiana: coleta de confirmação, imediatamente após a instrumentação (1ª. coleta) e outra após sete dias (2ª. coleta); imediatamente após a remoção da medicação (3ª. coleta) e outra após sete dias (4ª. coleta). A neutralização da endotoxina foi avaliada apenas nas quatro últimas coletas. Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística (Kruskal-Wallis e Dunn). Todas as soluções irrigadoras promoveram redução significativa dos microrganismos após a instrumentação (1ª. coleta) ($p < 0,05$). Após 7 dias houve aumento do número de microrganismos em todos os grupos, voltando ao número inicial nos grupos instrumentados com solução salina e hipoclorito de sódio. Entretanto, apesar de ter ocorrido recolonização dos microrganismos no canal radicular dos espécimes instrumentados com solução de nanopartículas de prata, manteve-se redução estatisticamente significativamente do número de UFC/mL quando comparada à coleta de confirmação ($p < 0,05$), demonstrando efeito residual. A medicação de hidróxido de cálcio eliminou 100% dos microrganismos e manteve os resultados

após 7 dias (4^a. coleta) no grupo 2. No grupo quatro houve recolonização de *E. faecalis* e *C. albicans* após 7 dias de incubação. O hidróxido de cálcio foi a única substância avaliada que promoveu redução significativa ($p<0,05$) das endotoxinas. Assim, pôde-se concluir que o hipoclorito de sódio e a solução de NP-Ag reduziram significativamente a microbiota do canal, no entanto somente com a associação ao hidróxido de cálcio houve eliminação dos microrganismos em profundidade nos túbulos dentinários e redução das endotoxinas presentes no canal radicular.

Palavras-Chave: Endotoxinas. Soluções irrigantes. Nanopartícula de prata. Hipoclorito de sódio. Hidróxido de cálcio. Controle da infecção

ABSTRACT

Carreira CM. Effectiveness of silver nanoparticles on microorganisms and endotoxins in root canals. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial effect and endotoxin detoxified of solution of silver nanoparticles used as irrigating and dressing in root canals. Forty-eight single-root human teeth were used. All root canals sized 16 mm and were enlarged to a Kerr file number .30. Root canals were infected for 28 days with *E. coli* and for 21 days with *E. faecalis* and *C. albicans*. The specimens were divided into four groups (n=12), according to the substance used (irrigating solution and dressing): G1) saline and saline (control), G2) sodium hypochlorite 1% with Endo-PTC cream and calcium hydroxide; G3) solution of Ag-NP 50 ppm and calcium hydroxide with Ag-NP; and G4) solution of Ag-NP 50 ppm and solution of Ag-NP 50 ppm. Five samplings of root canal were accomplished to evaluate the antimicrobial activity: confirmation sample, immediately after instrumentation (1st. Sample), and other after 7 days (2 nd. Sample), immediately after dressing removed (3 rd. Sample) and other after 7 days (4 th. Sample). The endotoxina detoxified was evaluated only in the last four samples by Limulus assay. Results were analysed by Kruskal-Wallis and Dunn. All irrigation solutions caused significant reduction of microorganisms after instrumentation (1 st. Collection) ($p < 0.05$). After 7 days there was increase of the number of bacteria in all groups, returning to the initial number of microorganisms in the groups prepared with saline and sodium hypochlorite, however, the recolonization of microorganisms in root canals of groups of solution silver nanoparticles was smaller than the number of confirmation sample ($p < 0.05$), showing residual effect. The calcium hydroxide eliminated 100% of the microorganisms and the results remained after 7 days (4 th. Collection) for group 2. In group 4 there was recolonization of *E. faecalis* and *C. albicans* after 7 days. Calcium hydroxide was the only substance that measured a significant reduction of endotoxin ($p < 0.05$). Thus, we concluded that the sodium hypochlorite and the NP-Ag significantly reduced the microorganisms of the root canal, but it is necessary the combination of calcium hydroxide to eliminated all microorganisms into dentinal tubules and detoxified endotoxins in the root canal.

Keywords: Endotoxin. Irrigants solution. Silver nanoparticles. Sodium hypochlorite. Calcium hydroxide. Infection control

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	porcentagem
μA	microampere
μg	micrograma
μL	microlitro
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain and Heart Infusion (Infusão de cérebro e coração)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
Ca(OH)_2	Hidróxido de cálcio
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA	ácido etilenodiamino-tetra-acético
ELISA	ensaio imunoabsorvente ligado à enzima
EU	Unidade de Endotoxina
h	hora
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
K	lima tipo Kerr
KGy	KiloGray (unidade de medida Kilojoule/Kilograma)
LAL	lisado de amebócitos de Limulus
LPS	Lipopolissacarídeo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
NaOCl	hipoclorito de sódio
NP-Ag	nanopartículas de prata
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
P.A.	pró-análise
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PQC	Preparo Químico Cirúrgico

ppm	partes por milhão
QCL	Teste cinético Quantitativo Cromogênico Lisado
R.P.M.	rotações por minuto
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFC	Unidade Formadora de Colônia
μ	micrometro (unidade de medida equivalente a 10^{-6} m)
nm	nanômetro (equivalente a 10^{-9} m)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 NANOPARTÍCULAS DE PRATA	21
2.1.1 Nanopartículas de prata como antimicrobiano	24
2.2 PREPARO QUÍMICO CIRÚRGICO E MEDICAÇÃO INTRACANAL	30
2.3 MICRORGANISMOS DAS PATOLOGIAS PULPARES E PERIAPICAIS	38
2.4 ENDOTOXINAS	47
2.4.1 Neutralização de endotoxinas	48
3 PROPOSIÇÃO	54
4 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 PREPARO DA SOLUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA	57
4.2 SELEÇÃO E PREPARO DOS ESPÉCIMES	57
4.3 CONTAMINAÇÃO DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES	59
4.4 PREPARO QUÍMICO CIRÚRGICO E MEDICAÇÃO INTRACANAL	60
4.5 COLETAS DO CONTEÚDO DO CANAL RADICULAR	63
4.6 VERIFICAÇÃO DA NEUTRALIZAÇÃO DE ENDOTOXINAS NO CANAL RADICULAR	64
5 RESULTADOS	67
5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	68
5.1 QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS	76
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	97
APÊNDICES	110
ANEXOS	117

1 INTRODUÇÃO

Denomina-se nanopartícula a uma porção de material constituída por apenas alguns átomos e que caracterizam propriedades diferentes do mesmo material quando em molécula muito maiores.

Em função disso, novos modelos de biomateriais estão surgindo com a incorporação de nanopartículas em suas matrizes. Essa tecnologia permitiu o desenvolvimento de produtos com propriedades terapêuticas e melhor tolerância tecidual. Dentre as nanopartículas com atividade antimicrobiana, a de prata é, provavelmente, a mais utilizada e efetiva.

As nanopartículas de prata (NP-Ag) começaram a ser obtidas nas últimas décadas do século 20 a partir do desenvolvimento de uma nova ciência, a nanociência. A nanociência ou nanotecnologia balizou o início de um novo ciclo da capacidade humana em tentar desvendar o desconhecido. Representa a possibilidade de entender os materiais em escala nanométrica, que variam de 0,1 a 100 nanômetros (nm), ou seja, desde dimensões diminutas, em nível de microdimensões atômicas, até aproximadamente o comprimento de onda de luz visível, condição dimensional em que os materiais apresentam novas propriedades e comportamento diverso daquele que geralmente apresentam quando em escala macroscópica.

Os estudos e pesquisas em nanotecnologia até agora se encontram em fase inicial, pois muito ainda carece de compreensão acerca do comportamento dos materiais em nanoescala. Atualmente, apenas dispositivos e estruturas simples podem ser criados de maneira controlada e reprodutiva. Esse avanço foi mais significativo a partir da década de 1980 com a criação de ferramentas novas, anteriormente não disponíveis, que proporcionaram aos pesquisadores os *olhos* e *dedos* necessários para medir e manipular estruturas nanométricas, como por exemplo, as microscopias de força atômica, que mostra detalhes topográficos em superfícies; e, de tunelamento, que permite movimentar átomos e observar densidade eletrônica, além de vários modos diferentes de obtenção de imagens (Fishbine, 2002).

Os avanços em nanotecnologia levaram ao desenvolvimento de um novo campo de pesquisa, a nanomedicina, que visa estudar a aplicação de nanomateriais para diagnóstico e terapia de algumas condições patológicas. Essas partículas

apresentam um vasto potencial de uso na Biologia e na Medicina — carreadores de genes e fármacos (*drug delivery*); filtros bacterianos; diagnóstico molecular e no tratamento do câncer e infecções mas, pouco se sabe sobre sua ação nos sistemas biológicos *in vivo*.

Soluções de NP-Ag já são reconhecidas como um anti-séptico eficaz e seguro cientificamente recomendado para várias aplicações, inclusive em diversos setores da área médica, caracterizando ademais, facilidade de obtenção e baixo custo de produção.

Particularmente quanto ao uso das NP-Ag, já se encontram disponíveis no mercado materiais com essas nanopartículas incorporadas em suas matrizes, como cateteres vasculares e urinários (Silver; Phung; Silver, 2006), máscaras cirúrgicas (Li et al., 2006), gases, sistemas de purificação de água, ataduras para queimaduras, dentre outros. Sistemas de purificação de água, como Aquapure[®], Kinetico[®] e QSI-Nano[®], são comercializados com filtros nos quais estão agregadas NP-Ag e mais de 100 produtos de consumo contendo NP-Ag já foram catalogados (Maynard, 2007), destacando-se os relacionados à conservação de alimentos (Chen; Schluesener, 2008; Maynard, 2007).

Pouco se tem investido em engenharia de nanopartículas no meio odontológico. Íons de prata foram incorporados em resinas compostas (Yoshida; Tanagawa; Atsuta, 1999; Yoshida et al., 1999; Herreira et al., 2001). Essas resinas contendo partículas de prata em sua massa preveniram o acúmulo de biofilme dentário na superfície dos materiais restauradores dada a liberação gradual e constante de íons prata tendo sido também demonstrado por Yoshida, Tanagawa e Atsuta (1999) ação antimicrobiana sobre *Streptococcus* spp.

Ahn et al. (2009) sugeriram a incorporação de nanopartículas de prata e nanofilamentos de sílica em um sistema adesivo para fixação de *brackets* ortodônticos. Esse modelo resultou no aprimoramento de propriedades físicas, como diminuição da rugosidade e aumento na adesão do adesivo; e, propriedades antimicrobianas com a diminuição da adesão de microrganismos cariogênicos na superfície do sistema adesivo. Os autores sugeriram que essa formulação contribuiu para a prevenção da desmineralização do esmalte ao redor dos *brackets* sem afetar suas propriedades físicas.

Frente a excelente propriedade antimicrobiana e relativa baixa toxicidade compete o desenvolvimento de estudos mais aprofundados em relação às soluções

contendo NP-Ag a fim de tornar viável a possibilidade de sua utilização como alternativa no controle da infecção endodôntica, já que a principal etiologia das alterações pulpares e periapicais é de origem microbiana (Kakehashi; Stanley; Fitzgerald, 1965). Para mais, é necessário ter em conta que uma pequena parcela dos tratamentos não responde satisfatoriamente aos procedimentos químico cirúrgicos habitualmente empregados nos tratamentos endodônticos, situações essas que demandam modificações no protocolo terapêutico abrindo espaço para uso de diferentes de substâncias químicas ou diversidade na medicação intracanal.

O insucesso pode estar relacionado a uma variedade de fatores. Dentre eles destacam-se a presença de microrganismos resistentes aos agentes químicos ou medicamentosos e a presença de endotoxinas remanescentes ao preparo químico cirúrgico. O biofilme também desempenha importante papel no desenvolvimento e manutenção de alterações ósseas periapicais, devido a produção da matriz extracelular, cujo papel é o de atuar como uma barreira física contra os agentes antimicrobianos.

Barthel et al. (1997), Tanomaru et al. (2003) e Estrela et al. (2007), destacaram que mesmo após criterioso preparo do canal remanesce quantidade significativa de lipopolissacarídeos (LPS), elemento tóxico oriundo da parede celular de bactérias Gram-negativas. Isso ocorre porque o microrganismo, ao sofrer lise, libera resíduos de sua estrutura que, apesar de não causarem lesões celulares ou teciduais diretamente, permanecem ativando células do sistema imunológico do hospedeiro. O LPS estimula a liberação de citocinas pelos macrófagos, assim como do fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (IL) 1, 6 e 8, que são importantes para iniciar e perpetuar a resposta inflamatória, ao tempo em que estimula a reabsorção óssea periapical (Safavi; Nichols, 1993; Barthel et al., 1997). As endotoxinas também contribuem para a liberação de substâncias vasoativas neurotransmissoras nas terminações nervosas da região periapical, conduzindo à ocorrência de dor (Seltzer; Farber, 1994).

Dessa forma, o objetivo da terapia endodôntica deve ser baseado não apenas na eliminação de microrganismos e substratos presentes no sistema de canais radiculares, como também, deve dedicar-se à neutralização das endotoxinas remanescentes (Silva et al., 2002; Zehnder, 2006; Oliveira et al., 2007b).

Os atuais protocolos de tratamento endodôntico sugerem o uso de substâncias químicas diversas como agentes coadjuvantes do preparo químico cirúrgico e gama

variada de produtos para medicação intracanal. Dentre as substâncias preconizadas como irrigantes, entre outras, constam soluções de hipoclorito de sódio, soluções de EDTA, composições cremosas contendo peróxidos, apresentações à base de clorexidina, entre outras, desempenhando todas, umas mais e outras menos, atividade antimicrobiana. Entretanto, nenhuma delas demonstraram capacidade em neutralizar endotoxinas remanescentes à fase de desinfecção do sistema de canais radiculares. O hidróxido de cálcio tem sido amplamente utilizado como medicação intracanal devido suas propriedades antimicrobianas (Lage-Marques; Antoniazzi, 2002; Leonardo, 2005), capacidade de induzir mineralização (Lopes; Siqueira, 1999; Leonardo, 2005), e, principalmente por neutralizar endotoxinas (Safavi; Nichols, 1993; 1994; Silva et al., 2002; Tanomaru et al., 2003; Leonardo et al., 2004; Oliveira et al., 2005).

Todos esses agentes químicos utilizados em Endodontia apresentam indicações precisas, vantagens e desvantagens, sendo que até o momento, não se dispõe de um agente que agregue todas as características necessárias para promover o controle da infecção e a neutralização de endotoxinas. Assim, torna-se importante avaliar outros agentes desinfetantes, como soluções de NP-Ag, pelo seu conhecido poder antibacteriano, facilidade de obtenção, baixo custo (Lok et al., 2007; Lee et al., 2007; Zhang et al., 2008), além de ser reconhecido como um anti-séptico eficaz e seguro cientificamente recomendado para várias aplicações, inclusive em diversos setores da área médica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A prata é conhecida pela comunidade médica por sua eficácia antimicrobiana desde o início do século 18. Sais de prata, principalmente o nitrato de prata, já eram usados nesse período para o tratamento de úlceras (Klasen, 2000). A atividade antimicrobiana da prata foi reconhecida pelo meio acadêmico no século 19, no entanto, somente na década de 20 seu uso foi aprovado pela US Food and Drug Administration (FDA).

Com a descoberta e desenvolvimento dos antibióticos a partir de 1940 esses medicamentos passaram a ser preferidos a prata, por serem menos tóxicos e considerados mais seguros. Com a crescente resistência dos microrganismos aos antibióticos (Gemmell et al., 2006) ocorreu o retorno da utilização da prata como anti-séptico e na década de 60, para o tratamento de queimados, em uma solução de 0,5% de AgNO_3 . (Prince; Wood, 1966). Na década de 1970, a substância também foi recomendada para o tratamento de queimados pelo Dr. Carl Moyer, catedrático do Departamento de Cirurgia da Universidade de Washington. Desde então, a prata é consagrada no mundo inteiro como anti-séptico eficaz e seguro para queimaduras.

Mais recentemente, no início do século 20, a prata retornou a ser usada sob um novo e mais interessante formato nanoparticulado. Soluções de prata desenvolvidas sob a luz da nanotecnologia possuem partículas de porte extremamente reduzido (partículas minúsculas variando de 0,01 a 0,001 micrômetro de diâmetro), que, caracterizam uma maior superfície de contato, ampliando as já conhecidas ações antibacterianas da prata.

Acredita-se que essas minipartículas interajam com elementos da membrana celular das bactérias, causando danos estruturais, forçando a dissipação de prótons, e finalmente a morte celular (Sondi; Salopek-Sondi, 2004; Lok et al., 2006). Também tem sido proposto que íons (Ag^+) de prata liberados de nanopartículas de prata (NP-Ag) podem difundir-se no fósforo das moléculas do DNA, resultando na inativação da sua replicação, ou pode reagir com proteínas contendo enxofre, induzindo a inibição das funções enzimáticas (Gupta; Maynes; Silver, 1998; Matsumura et al.,

2003). Por meio do estudo realizado com espectroscopia por fluorescência (proteínas expressas verde fluorescentes) e técnicas microscópicas Gogoi et al. (2006) verificaram que as NP-Ag promovem perfurações na superfície da parede celular bacteriana e que, apesar de se ligarem ao DNA bacteriano, não apresentam efeito direto na causa da morte celular.

Partículas de prata em dimensões maiores (micrométricas) causam a obstrução das membranas celulares, promovendo um envenenamento por prata, conhecido por Argiria. Isto não acontece com o uso de partículas de prata em dimensões nanométricas. Essas partículas são tão finamente dispersas e estão em baixas concentrações que podem circular pelas membranas celulares sem ocasionar danos aos organismos superiores, e visto que a concentração efetiva para a atuação contra microrganismos é de 0,1µg/L e a concentração tóxica para os seres humanos é de 10 mg/L (Oliveira, 2006).

As nanopartículas de prata podem ser sintetizadas a partir de corrente elétrica ou por redutores químicos. O tipo de fabricação não interfere na eficácia antimicrobiana, no entanto, o tamanho da partícula de prata e a sua dispersão na solução interferem no seu desempenho. Quanto menor a partícula, maior será sua ação antimicrobiana. Estabilizantes são acrescentados no processo de produção para prevenir a agregação das NP-Ag.

A forma mais comum de produzir NP-Ag é a partir de redutores químicos. Muitos tipos de polímeros estão sendo pesquisados para estabilizar a solução, prevenindo assim, a agregação dessas partículas. Por exemplo, Sondi e Salopek-Sondi (2004) usaram o ácido ascórbico como agente redutor e o Daxad 19 (um surfactante de polynapthalene sulfonate) para e estabilizar a solução. Esse método permitiu obter nanopartículas de 12 nm de diâmetro e com alto poder antimicrobiano.

A contínua busca por uma partícula mais eficiente tem impulsionado a pesquisa de redutores menos tóxicos e com um processo de produção mais simplificado. Assim, Panácek et al. (2006) sugeriram o uso de solução de amônia com maltose, lactose, glucose e galactose. Dentre os redutores avaliados, a solução de amônia com maltose gerou a solução com as menores partículas, com 25 nm de diâmetro, e essas se apresentaram bem dispersas.

O desenvolvimento da engenharia química foi tanto, que atualmente podemos encontrar NP-Ag de 1.0 a 7.1 nm. O polímero responsável por essa

produção foi o “hyperbranched”, que também demonstrou ser um ótimo estabilizante (Zang et al., 2008).

No que tange essa nova área do conhecimento, verifica-se que a ciência e inovações tecnológicas caminham juntas e que fortes laços de reciprocidade refletem-se no crescimento da produção acadêmica e em novas utilizações práticas. Assim, novos modelos de biomateriais estão surgindo com a incorporação de nanopartículas em suas matrizes.

Na área da saúde, destaca-se o uso rotineiro de NP-Ag em curativos de feridas e os cateteres vaculares e urinários (Silver; Phung; Silver, 2006). Outros dispositivos encontram-se em desenvolvimento, como as máscaras cirúrgicas (Li et al., 2006), gazes (Lee et al., 2007), sistemas de purificação de água, ataduras para queimaduras, dentre outros.

Pouco se tem investido em engenharia de nanopartículas no meio odontológico. Íons de prata estão sendo usados para confeccionar resinas compostas (Yoshida; Tanagawa; Atsuta, 1999; Yoshida et al., 1999; Herreira et al., 2001). Ahn et al. (2009), sugeriram a incorporação de nanopartículas de prata e nanofilamentos de sílica no sistema adesivo para a fixação dos *brackets* ortodônticos. Este modelo resultou no aprimoramento de suas propriedades físicas e antimicrobianas. Os autores sugerem que essa formulação contribua para a prevenção da desmineralização do esmalte ao redor dos brackets sem afetar nas suas propriedades físicas.

Mais recentemente, na área da endodontia, incorporou-se nanopartículas de prata no cimento obturador Kerr Pulp Canal SealerTM com o intuito de prevenir a recontaminação do canal radicular após obturação. Os resultados obtidos apresentaram efetividade antimicrobiana sobre a cepa avaliada, inclusive foi possível verificar perda da integridade da membrana celular das células bacterianas em contato com a superfície do cimento (Kreth et al., 2008).

Apesar da eficácia e rapidez na ação antimicrobiana, tem-se encontrado bactérias resistentes a nanopartículas de prata. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas resistentes a prata já foram identificadas. Acredita-se que o mecanismo responsável por essa resistência seja a transmissão de plasmídios e tranponson (Russell; Hugo, 1994). Entretanto, nota-se que a ocorrência dessa resistência é incomum frente ao vasto uso da prata no tratamento de queimados e feridas e o uso contínuo de cateteres revestidos por prata (Chopra, 2007).

2.1.1 Nanopartículas de prata como antimicrobiano

Íons de prata gerados a partir de baixa corrente elétrica foram capazes de eliminar 100% dos microrganismos obtidos a partir de uma amostra de dentina cariada (Thibodeau; Handelman; Marquis, 1978). Diversas variáveis foram avaliadas na produção da prata quanto ao seu potencial antimicrobiano. Diferentes valores de corrente elétrica (0, 5, 10, 20 e 40 μA) foram emitidas sobre um fio de prata em distintos tempos experimentais (5, 10 e 30 min), que por fim produziram diferentes concentrações (5, 10, 15 e 20 ppm). Dentre essas combinações, foi constatado que a corrente de 5 μA , na concentração de 20 ppm, durante o contato de 30 min com os microrganismos resultou em eliminação de 100% das cepas. Determinou-se que o maior tempo de contato da Ag com o microrganismo determina maior efetividade antimicrobiana. Os autores ainda testaram a influência dos constituintes do meio de cultura sobre a atividade antimicrobiana da Ag e determinaram que os componentes do meio diminuem a efetividade da Ag sobre os microrganismos.

Spratt et al. (2001) avaliaram a solução de nanopartículas de prata na concentração de 5 ppm como irrigante do canal radicular, juntamente com os demais irrigantes comumente utilizados na prática clínica. Ao comparar seu efeito com a clorexidina, o hipoclorito de sódio e o iodopovidona, os autores demonstraram que as nanopartículas de prata foram bem inferior, igualando-se ao grupo controle e o hipoclorito de sódio foi a solução mais eficiente.

Nanopartículas produzidas a partir da redução do nitrato de prata com ácido ascórbico na presença de Daxad 19 (*the sodium salt of a high molecular-weight naphthalene sulfonate formaldehyde condensate*) foram produzidas por Sondi e Salopek-Sondi (2004) e a atividade antimicrobiana da substância foi testada sobre *E. coli*. A atividade antimicrobiana da prata foi testada por meio de diluição em ágar e em caldo (Luria-Bertani). Essas partículas mostraram-se efetivas contra *E. coli*. Além disso, a estrutura da bactéria foi avaliada em microscópio eletrônico de varredura e de transmissão. As imagens mostraram formação de “pits” na membrana das bactérias nos locais que entraram em contato com as nanopartículas e aumento da permeabilidade. Também se verificou que apesar de algumas partículas ficarem aglomeradas na parede das células, a maioria se encontrava no interior da célula. Os autores ressaltaram as qualidades deste produto sugerindo que devem ser

utilizados nos materiais com propriedades antibacterianas, principalmente por apresentarem fácil produção e baixo-custo.

Pela primeira vez, foi confeccionado e avaliado por Furno et al. (2004), um polímero com nanopartículas de prata imersos em toda sua estrutura, não somente impregnado na sua superfície. Os resultados da avaliação antimicrobiana demonstraram que o polímero impediu a adesão de *Staphylococcus epidermidis* na primeira hora, e que mesmo após esse período ainda permaneceu a ação sobre a cepa. Resultados satisfatórios também foram obtidos ao avaliar a zona inibição do crescimento do microrganismo. Os autores encontraram valores inferiores de inibição da cepa nos discos que foram lavados em solução salina antes dos testes e, relacionaram esse resultado a quantidade de prata liberada pelo polímero, quando imerso em água destilada (de 70 a 90 ppm).

Panácek et al. (2006) analisaram diferentes redutores de nitrato de prata (maltose, lactose, glucose e galactose), a influência da concentração da amônia e do pH da reação para produzir as nanopartículas de prata. Os autores demonstraram que a maltose, em altas concentrações de amônia e em pH de 11,5 produziu as menores partículas, resultando no melhor desempenho antimicrobiano, tanto em cepas Gram-positivas quanto Gram-negativas, inclusive sobre cepas resistentes a vancomicina e penicilina.

Com o intuito de aplicar o efeito antimicrobiano da nova tecnologia de nanopartículas em biomateriais, Li et al. (2006) impregnaram externamente máscaras cirúrgicas com nanopartículas derivadas de nitrato de prata e dióxido de titânio, objetivando diminuir o risco de possíveis infecções cruzadas. Os autores testaram a ação antimicrobiana de: (1) soluções de nanopartículas contendo uma combinação de nitrato de prata e dióxido de titânio, e (2) máscaras cirúrgicas cobertas com estas nanopartículas. A concentração inibitória mínima (CIM) de nanopartículas sobre *E. coli* e *S. aureus* foi de 1/128 e 1/512, respectivamente. No teste com as máscaras, círculos de 38 mm de diâmetro foram imersos em tubos contendo suspensão de *E. coli* e *S. aureus* e permaneceram incubados por 48h a 37°C. Os resultados demonstraram que após este período, houve redução de 100% das cepas quando as amostras estavam tratadas com a prata e, no grupo sem o tratamento houve aumento de 25% e 50% de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. No mesmo estudo, 20 voluntários de cada grupo utilizaram essas máscaras por um

período de 1 hora e 15 min/ dia e ao final, nenhuma irritação cutânea foi observada na face dos indivíduos.

Estudos prévios demonstraram que a prata é altamente sensível ao oxigênio. Ao entrar em contato com esse gás formam-se partículas oxidadas, que são facilmente carregadas (Ag^+). Neste contexto, Lok et al. (2007) compararam a efetividade antimicrobiana das nanopartículas de prata (9.2 ± 2.8 nm) oxidadas com as nanopartículas de prata reduzidas. Os autores demonstraram que o crescimento de *E. coli* não foi afetado pela presença de nanopartículas de prata reduzidas. No entanto, grande decréscimo de UFC foi observado quando o microrganismo foi tratado com a prata oxidada.

Dois redutores de AgNO_3 , borohydride e citrate, foram utilizados para produzirem nanopartículas de prata. Essas substâncias geraram nanopartículas com 9.2 e 64 nm de diâmetro, respectivamente. Quando avaliado a ação antimicrobiana sobre *E. coli*, constatou-se que as partículas menores apresentam atividade superior quando comparado às partículas maiores (Lok et al., 2007).

Ainda no mesmo estudo Lok et al. (2007) avaliaram a interferência da agregação das nanopartículas na atividade antimicrobiana. Com a finalidade de prevenir a agregação das NP-Ag, os autores acrescentaram à solução uma pequena concentração (15 μM) de albumina de soro bovino e, obtiveram melhor ação sobre o microrganismo testado.

Diferentes concentrações de NP-Ag foram testadas por Yoon et al. (2007), sobre *E. coli* e *B. atropheaus* (antigo *B. subtilis*). A prata utilizada apresentava o tamanho de 40 nm e foi analisada nas concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. *E. coli* e *B. atropheaus* foram completamente inibidos na concentração acima de 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$. *E. coli* foi mais resistente que *B. atropheaus*, e os autores sugeriram que este fato está relacionado com a estrutura da membrana dos Gram-negativos, pois promovem uma barreira contra nanopartículas.

Lee et al. (2007) desenvolveram uma forma prática de recobrir tecidos de algodão com nanopartículas de prata. Para isso utilizaram como substrato o nitrato de prata e butylamine. Perceberam que o substrato utilizado em baixas concentrações produzia nanopartículas menores, melhorando o efeito antimicrobiano. Sua eficácia antimicrobiana foi testada sobre a inibição do crescimento de *S. aureus* e *E. coli* em placas com ágar Luria-Bertari. Nenhuma colônia cresceu nas proximidades dos tecidos recobertos com prata. A avaliação

quantitativa demonstrou que entre 50 a 70 mg de prata eliminou completamente *S. aureus* e para a cepa de *E. coli*, resistente a ampicilina, foi necessário uma concentração de prata acima de 70 mg. Como esse tecido, recoberto com prata, é indicado pela capacidade terapêutica. Também foi testada a irritação promovida em lesões na pele de ratos de acordo com *Korean Functional Cosmetics Codex*. Nenhum eritema ou edema foi observado nas áreas testadas e assim, os autores concluíram que esses tecidos podem ser usados sem causar irritação na área de contato.

Chopra (2007) questionou o uso clínico rotineiro de nanopartículas de prata para o tratamento de feridas, já que há tanta divergência dos valores da CIM relatados na literatura. O autor constata que mesmo os trabalhos que seguiram os parâmetros estabelecidos pela *National Commitee for Clinical Laboratory Standads* (NCCLS) e pelo Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobianos (EUCAST) demonstram resultados diferentes. Para o autor, os casos de resistência, publicados desde 1975, que foram menos de 20, estão relacionados com o uso da Ag em baixas concentrações. Assim, justificam-se as altas dosagens utilizadas por alguns clínicos (70-100 ppm).

Uma nova forma de produzir nanopartículas de prata foi sugerida por Thomas et al. (2007). As partículas foram inseridas em hidrogéis sem utilizar, na fabricação, substâncias tóxicas. Desta forma, sua aplicação no campo médico não causaria prejuízo para o paciente. Esta nova fórmula foi testada sobre *E. coli* para investigar a propriedade antimicrobiana. Os autores verificaram que a efetividade antimicrobiana depende da concentração de Ag e a concentração de íons Ag^+ . O experimento demonstrou que o tamanho da partícula influencia na atividade antimicrobiana. As partículas nos géis com tamanho de 100 μm mostraram maior capacidade de inibir o crescimento de *E coli* (maior que 75% quando comparada ao grupo controle) que as partículas de 200 μm (redução de 50%). Partículas menores são capazes de interagir melhor com a parede das bactérias e agir sobre um número maior de microrganismos.

Hidrogéis utilizados em adesivos terapêuticos (“pads” - curativos) foram desenvolvidos contendo nanopartículas de prata e foram avaliados quanto à liberação de prata e a atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-negativas (*E. coli*) e Gram-positivas (*S. aureus*). As nanopartículas foram geradas com diâmetro de 10-11 nm e demonstraram inibir o crescimento dos microrganismos avaliados.

Assim, os autores confirmaram o potencial antimicrobiano e sugeriram a possibilidade de estudos para aplicação clínica desses adesivos (Rattanuengsrikul; Pimpha; Supaphol, 2009).

Sabe-se que uma das formas de produção de NP-Ag é por meio da redução do nitrato de prata. Assim, Zhang et al. (2008) demonstraram eficácia antimicrobiana com o redutor *hyperbranched poly (amidoamine)* com grupos terminais de dimethylamine. Além disso, relacionaram a taxa de molaridade da solução com o tamanho final da partícula de prata e concluíram que menores partículas de prata promovem contato mais profundo com a membrana da bactéria, assim aumentando sua eficácia antimicrobiana.

Choi et al. (2008) avaliaram a efetividade antimicrobiana de diferentes formas de nanopartículas de prata (NP-Ag, Ag^+ , AgCl), na concentração de 1 mg/L, sobre *E. coli*. Foi demonstrado que a taxa de inibição do crescimento de *E. coli* foi de $55 \pm 8\%$, 100% e $66 \pm 6\%$, respectivamente para NP-Ag, Ag^+ , AgCl. Ao avaliar o dano da membrana celular causado pela prata por meio do sistema *LIVE/DEAD BacLight* e a interação que ocorre entre o microrganismo e a prata por microscopia de transmissão, os autores constataram que as partículas de prata entram no interior da célula bacteriana, por promoverem apenas um aumento em sua permeabilidade, mas sem causar seu rompimento. Assim, a atividade antimicrobiana está relacionada com as reações que ocorrem com os componentes internos da célula. Os autores relacionaram esse efeito ao tamanho da partícula testada ($14 \pm 6\text{nm}$), pois teria capacidade de permear pela membrana.

Tendo em vista a dificuldade técnica de se obter polímeros com nanopartículas de prata na sua composição Kong e Jang (2006) propuseram um novo modelo, sendo esse mais prático e tendo a prata incorporada em toda a estrutura do polímero, não apenas na sua superfície.

Em 2008, foi publicado pelos mesmos autores (Kong; Jang) os resultados da ação antimicrobiana dessas novas fibras de *poly (methyl methacrylate)* sobre *S. aureus* e *E. coli*. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelos testes *Kinetics* antibacteriano e o teste modificado de Kirby-Bauer, assim como foi determinado a CIM. No teste *Kinetics* a mesma quantidade da solução de Ag (7 nm) liberada do polímero (13,31 ppm) e da suspensão microbiana permaneceram em contato por diferentes tempos. Quanto maior o tempo de contato, maior foi a efetividade antimicrobiana. No tempo de 3 min observou-se 100% de inibição de *E. coli*. A CIM

foi verificada a partir de diluição da prata em caldo Luria-Bertani. Constatou-se que a CIM para *E. coli* e *S. aureus* foi de 770 ng/mL e que a bactéria Gram-positiva foi mais sensível, fato esse, atribuído à composição de sua membrana. Enquanto o teste modificado de Kirby-Bauer foi feito com o polímero no estado sólido e avaliado a zona de inibição do crescimento bacteriano em placas com ágar LB. A maior zona de inibição foi demonstrada pelo polímero (45 mm) em comparação com o sulfato de Ag (16 mm).

Kong e Jang (2008) verificaram alteração na cor, de amarelo para marrom, da solução salina que continha imersa uma fibra de polímero com prata. Essa alteração está relacionada com a contínua liberação de nanopartículas de prata para a salina.

Ahn et al. (2009), sugeriram a incorporação de nanopartículas de prata e nanofilamentos de sílica no sistema adesivo para a fixação dos *brackets* ortodônticos. Este modelo resultou no aprimoramento de suas propriedades físicas, como diminuição da rugosidade e melhora na adesão e, antimicrobianas com a diminuição da adesão de microrganismos cariogênicos na superfície do sistema adesivo. Os autores sugerem que essa formulação contribua para a prevenção da desmineralização do esmalte ao redor dos brackets sem afetar nas suas propriedades físicas.

Mais recentemente, na área da endodontia, incorporou-se nanopartículas de prata no cimento obturador Kerr Pulp Canal SealerTM com o intuito de prevenir a recontaminação do canal radicular após obturação. Corpos de prova de cimento Kerr com e sem nanopartículas de prata foram testados *in vitro* em diferentes condições experimentais sobre culturas *S. mutans*. Os resultados obtidos apresentaram efetividade antimicrobiana sobre a cepa avaliada, inclusive foi possível verificar perda da integridade da membrana celular das células bacterianas em contato com a superfície do cimento (Kreth et al., 2008).

A solução de NP-Ag na concentração de 47 ppm foi avaliada quanto sua capacidade de descontaminação de limas endodônticas, em diferentes tempos experimentais. Limas endodônticas contaminadas por 24 h em caldo BHI contendo 100 µL de suspensões de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (10^6 células/ mL) foram imersas em solução de NP-Ag e permaneceram em contato com a substância avaliada por 5, 10, 15 e 30 min. Suspensão de *Bacillus atrophaeus*, na forma esporulada, foi adicionada diretamente na solução de nanopartículas de prata e,

permaneceu em contato com a prata nos mesmos tempos experimentais. Meios seletivos para cada microrganismo avaliado foram utilizados para a obtenção do número de UFC/mL. A solução de nanopartículas de prata promoveu redução de 70,5% de UFC/mL da forma esporulada de *B. atrophaeus* com diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle com os demais tempos experimentais. As nanopartículas de prata promoveram redução entre 77 a 99% sobre as demais bactérias e eliminação de 100% das leveduras. Os autores concluíram que a solução de NP-Ag é eficiente na descontaminação de instrumentos, e sua eficácia está diretamente relacionada com o tempo de contato da substância com o objeto contaminado (Carreira et al., 2009).

A mesma solução foi avaliada sobre biofilme de 48 h de *C. albicans* e *E. faecalis*. A solução permaneceu em contato com o biofilme por um período de 5 min. Os autores observaram que esse período não foi suficiente para produzir uma redução estatisticamente significativa comparada ao grupo controle (Toledo et al., 2009).

2.2 PREPARO QUÍMICO CIRÚRGICO E MEDICAÇÃO INTRACANAL

Os primeiros relatos do uso de hipoclorito de sódio como substância anti-séptica surgiram na 1ª Guerra Mundial, com o inglês Henry Dakin, que propôs a utilização na concentração de 0,5%, para a limpeza de feridas cirúrgicas. A substância foi desenvolvida a partir de uma solução de hipoclorito de cálcio com 65% de cloro ativo.

No campo da odontologia, em 1936, Walker citou pela primeira vez o uso de soda clorada como auxiliar na limpeza do canal radicular. Relata que a indicação para esse uso fora sugerida pelo desconhecido Dr. Blass, da Universidade de Nova York.

A partir desse momento, inúmeras substâncias foram estudadas com o intuito de complementar a fase do preparo do canal radicular. Sem dúvida, o hipoclorito de sódio é a substância mais pesquisada e mais amplamente utilizada na clínica endodôntica.

Paiva e Antoniazi (1973; 1988) desenvolveram o creme de Endo-PTC para ser utilizado como uma substância auxiliar do preparo químico cirúrgico juntamente com o hipoclorito de sódio 0,5%. Sua composição consiste em um creme com peróxido de uréia (elevado potencial de liberação de oxigênio – ação antimicrobiana), Tween 80 (detergente molecular) e Carbowax (veículo). A associação potencializa a ação antimicrobiana, facilita a lubrificação durante a instrumentação, além de aumentar a permeabilidade, permitindo a desinfecção em profundidade.

A tolerância tecidual da associação do creme Endo-PTC e hipoclorito de sódio 0,5% foi testada por Bombana et al. (1974) na conjuntiva do olho de coelho, seguida de posterior irrigação com Tergentol®-Furacin®. Os autores observaram reação inflamatória discreta que praticamente desapareceu em 24h.

Neste contexto, Wey Filho et al. (1975), estudaram o efeito antimicrobiano de algumas substâncias químicas auxiliares do preparo químico mecânico do canal, utilizadas na desinfecção de canais radiculares em função de sua velocidade de ação. Selecionaram 30 dentes unirradiculares recém-extraídos com polpa mortificada e teste bacteriológico positivo, onde o terço apical era seccionado em três fragmentos, sendo dois destinados aos testes com as substâncias e um ao teste bacteriológico. Os ápices foram incluídos em cinco substâncias diferentes, aí permanecendo, 15 min e 30 min. Em seguida, os dentes foram colocados em meio de cultura e verificando a leitura dos mesmos em intervalos de 24, 48 e 72h. Segundo os resultados, a capacidade antimicrobiana de alguns fármacos foi modificada, devido seu tempo de permanência com os fragmentos de dentes contaminados. Verificaram que o Endo-PTC neutralizado com o hipoclorito de sódio mostrou-se efetivo na totalidade dos casos para os dois tempos experimentais.

Gavini, Aun e Akisue em 1996 verificaram a influência da camada residual de magma no selamento apical de dentes obturados com cones de guta-percha e cimento de N-Rickert. Para tal experimento, os autores utilizaram 64 dentes humanos unirradiculares cujas coroas foram seccionadas, e permaneceram em solução de timol a 1%. Foi realizado o esvaziamento do canal, e após terem concluído o PQC com creme de Endo-PTC neutralizado com hipoclorito de sódio a 1%, os dentes foram divididos em 2 grupos, de acordo com a irrigação final: 2 mL da associação tergentol/furacin; 10mL de EDTA a 17% e, em seguida 10 mL de hipoclorito de sódio a 1%. Dois dentes de cada grupo foram examinados por

microscopia eletrônica de varredura a fim de verificar a presença ou não de magma dentinário, os demais dentes foram obturados com cones de guta-percha e cimento de N-Rickert. A seguir, foram impermeabilizados com resina epóxica e corados com azul-de-metileno a 1% durante 72 horas, sendo então, lavados em água corrente, seccionados longitudinalmente e analisados em microscopia óptica, concluindo que o magma interfere na percolação apical, aumentando o nível de infiltração do corante.

Pesce, Medeiros e Bombana, em 1997, demonstraram melhora da permeabilidade dentinária da associação do creme de Endo-PTC com o hipoclorito de sódio 0,5%. Esses resultados também foram confirmados por Robazza et al. (1987) e Souza, Amorim e Lage-Marques (2005). Os autores destacaram que o aumento da permeabilidade facilitaria a difusão da fase de medicação intracanal.

Carreira, Ferreira e Lage-Marques (2004) avaliaram a permeabilidade dentinária radicular de diferentes substâncias químicas utilizadas durante o preparo químico cirúrgico, por meio da infiltração de corante. Foram selecionados vinte dentes humanos e unirradiculares, divididos em 4 grupos, de acordo com a substância utilizada: G1: clorexidina gel 2% associada a água destilada; G2: clorexidina gel 2% associada a água destilada e irrigação final com EDTA-T 17%; G3: Endo-PTC gel associado ao hipoclorito de sódio 0,5% e EDTA-T 17% e; G4: Endo-PTC creme associado ao hipoclorito de sódio 0,5% e EDTA-T 17%. Os resultados mostraram que maior média (%) de infiltração foi para o G4 (38,53), seguida do G2 (31,95), G3 (30,45), e G1 (20,18). Foi possível concluir que o hipoclorito de sódio 0,5% associado ao Endo-PTC creme e EDTA-T permitiu a maior infiltração de corante.

Pécora, Sousa-Neto e Estrela (1999) reportaram que o hipoclorito de sódio exibe tanto elevada ação antimicrobiana, quanto capacidade de dissolução tecidual, devido ocorrer um balanço dinâmico na composição, como mostrado na reação:

Além disso, os mesmos autores verificaram que ocorre a reação de saponificação entre o hipoclorito de sódio e os tecidos orgânicos, da seguinte forma:

Pode ser observado na reação que o hipoclorito de sódio age como um solvente orgânico degradando ácidos graxos, transformando-os em sabões e glicerol (álcool), que reduz a tensão superficial da solução remanescente.

Diversos são os trabalhos que avaliam a ação antimicrobiana da solução de hipoclorito de sódio, variando suas concentrações, pH e temperatura.

Devido a complexidade do sistema de canais radiculares com presença de tecidos orgânicos em áreas não acessadas pelos instrumentos, em 1979, Thé avaliou a ação do hipoclorito de sódio quanto sua capacidade de dissolução tecidual, variando sua concentração e o volume da substância. Padronizou o pH em 12 para todas as concentrações. No período de 30 min, o hipoclorito de sódio 1% foi capaz de dissolver 40% do tecido, na concentração de 2%, 80% do tecido foi dissolvido e na concentração de 3%, todo o tecido foi dissolvido. Foi verificado que o efeito do hipoclorito de sódio a 2% ou 3% não depende apenas da concentração, como também do volume da solução.

De fato, Pelczar, Reid e Chan (1980) mencionaram a influência da matéria orgânica, temperatura, armazenagem e outros fatores importantes na dissociação do ácido hipocloroso nas soluções de hipoclorito de sódio. Reforçaram, entretanto, ser o pH o fator de maior importância sobre o comportamento das ações das soluções de hipoclorito de sódio.

Avaliar o efeito antimicrobiano aumentando a temperatura da solução de hipoclorito de sódio a 2,6% foi o objetivo de Cunningham e Joseph (1980). A solução foi testada em temperatura ambiente, 22°C e, em temperatura corpórea, 37°C. Após 48h de contato da solução com os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* e esporos do *Bacillus subtilis*, pode-se observar que o aumento da temperatura de 22°C para 37°C. reduziu pela metade o tempo para eliminar os microrganismos. Cada espécie

necessitou de um período de tempo diferente em contato com a solução para ser eliminada.

Uma extensa revisão de literatura sobre hipoclorito de sódio foi redigida por Mentz em 1982. O autor desvreveu que o hipoclorito de sódio é a solução de escolha para o tratamento endodôntico por apresentar ação antimicrobiana sobre bactérias, bacteriófagos, esporos, vírus e leveduras. Além disso, relatou que o aumento da temperatura, da concentração e o maior tempo de contato com o microrganismo promovem maior efeito antimicrobiano. Enquanto que o aumento do pH promove uma diminuição do efeito antimicrobiano da solução de hipoclorito de sódio, a diminuição do pH promove um aumento da capacidade de dissolução tecidual. Mesmo sabendo que nenhuma substância é inócua aos tecidos periapicais, e que até hoje não há um irrigante capaz de combinar o máximo da ação antimicrobiana com a mínima toxicidade, Mentz mostrou divergência de opiniões na literatura, no entanto, indicou o uso de soluções até a concentração de 5%.

Baseado nas variações de concentrações, Pesce, Medeiros e Haddad, em 1995, propuseram verificar o pós-operatório dos pacientes que tiveram o esvaziamento de seus canais radiculares realizado com o hipoclorito de sódio, nas concentrações de 1; 1,5; 2; 2,5 e 3%. Observaram não haver diferença estatística de sintomatologia no pós-operatório quando do emprego dessas concentrações.

Siqueira (2000) estudou a estabilidade química da solução de hipoclorito de sódio 0,5% em função das variáveis pH, temperatura e tempo. O autor salientou que variações nesses valores podem causar alterações e que o fator pH influenciou mais na estabilidade do cloro que a temperatura.

Siqueira et al. (2000) realizaram um estudo *in vitro* com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (1%, 2,5% e 5,25%) durante a instrumentação e irrigação de canais radiculares previamente contaminados com *E. faecalis*. Foram realizadas coletas antes e após a instrumentação. Os resultados mostraram que todas as soluções testadas reduziram significativamente o número de bactérias (99,9% em número absoluto), entretanto, não houve diferença estatística significativa entre as concentrações testadas. O estudo mostrou que, apesar de não haver diferença significativa na efetividade do hipoclorito de sódio nas diversas concentrações, a eficácia das soluções mais fracas diminui rapidamente. Entretanto, se o volume utilizado e o número de trocas forem aumentados, pode-se conseguir a efetividade antimicrobiana desejada, compensando assim, a baixa concentração da

solução. Os autores sugeriram que o uso da solução de hipoclorito de sódio em altas concentrações é questionável, pois a mesma efetividade pode ser alcançada através da irrigação copiosa com múltiplas trocas do hipoclorito de menor concentração.

Sassone et al. (2003) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio (1 e 5%) e da clorexidina (0,12; 0,5 e 1%) sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* após contato direto nos tempos de 5 min, 15 min e 30 min (repetido 10 vezes). Os resultados mostraram que a clorexidina 0,12% não eliminou *E. faecalis* em nenhum tempo experimental, e que as demais substâncias foram efetivas.

Estrela et al. (2003) compararam o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio 2% com clorexidina 2% por meio do método de difusão em Agar e pelo contato direto sobre diferentes microrganismos (*S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *C. albicans*). O melhor resultado da ação pelo contato direto foi promovida pelo hipoclorito enquanto a clorexidina demonstrou-se mais efetiva no método de difusão em ágar.

Vivacqua-Gomes et al. (2005) contaminaram por 60 dias pré-molares humanos com *E. faecalis* e, ao final, aplicaram os seguintes protocolos endodônticos: G1- preparo com clorexidina e obturação imediata; G2: preparo com clorexidina e medicação de hidróxido de cálcio por 14 dias e obturação; G3: preparo com clorexidina e obturação após 7 dias; G4: preparo com soro fisiológico e obturação após 7 dias; e G5: preparo com soro fisiológico e obturação imediata, sem cimento obturador. A seguir os dentes foram incubados por 60 dias a 37°C quando foram coletadas raspas de dentina da porção localizada entre o terço médio e apical (5mm do ápice). *E. faecalis* sobreviveu em 20% do grupo 1, 25% no grupo 2, 40% no grupo 3, 60% no grupo 4 e 100% no grupo 5. Os autores concluíram que *E. faecalis* não foi eliminado em sessão única, nem em múltiplas sessões, quando utilizada a clorexidina como irrigante do canal radicular.

No intuito de controlar a infecção endodôntica resistente, Carreira et al. (2007) avaliaram *in vitro* a efetividade do hidróxido de cálcio PA e do CFC (ciprofloxacina, flagyl® e hidróxido de cálcio), como medicação intracanal, sobre *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Foram utilizadas 18 raízes de dentes humanos unirradiculares e os canais radiculares foram contaminados *E. faecalis* e *C. albicans* por 24 dias. Após coleta de confirmação microbiana, foi realizada

instrumentação do canal radicular (até lima K50) com hipoclorito de sódio 1%. De acordo com a medicação intracanal (mantida por 14 dias), os dentes foram divididos em dois grupos (n = 9): G1: hidróxido de cálcio com soro fisiológico; G2: CFC com soro fisiológico. Foram realizadas coletas após o preparo químico cirúrgico e imediatamente após a remoção da medicação. Na coleta de confirmação, verificou-se contaminação microbiana em todos os espécimes, com valores médios de aproximadamente 31×10^3 unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de *C. albicans* e 1450×10^3 ufc/mL de *E. faecalis*. Após instrumentação, houve redução de 89,5% dos microrganismos testados. Um espécime demonstrou crescimento de 40 ufc/mL de *C. albicans* e outro de 20 ufc/mL de *E. faecalis*. Concluiu-se que o preparo químico cirúrgico reduziu os microrganismos do canal radicular e que o hidróxido de cálcio e o CFC são importantes coadjuvantes na total eliminação de *C. albicans* e *E. faecalis*.

Em 2007a Oliveira et al. compararam a efetividade antimicrobiana de diferentes soluções irrigadoras (Clorexidina gel 2%; hipoclorito de sódio 1,5 e 5,25%) em 80 pré molares humanos preparados e inoculados com *E. faecalis* por 7 dias. Foram realizadas 3 coletas do conteúdo do canal: antes da instrumentação, imediatamente após a instrumentação e após 7 dias. O hipoclorito de sódio 1,5% foi efetivo na coleta imediatamente após a instrumentação, embora ter ocorrido aumento da quantidade de UFC após 7 dias, não havendo diferença estatisticamente com o grupo controle. O gel de clorexidina 2% e o hipoclorito 5,25% reduziram a quantidade de UFC imediatamente após a instrumentação e após 7 dias.

Siqueira et al. (2007) realizaram estudo *in vivo* em dentes com necrose pulpar e periodontite apical. As amostras foram coletadas do canal, incubadas em ananerobiose e identificadas por método de PCR, através do gene 16S rRNA. Verificaram que, utilizando um protocolo de instrumentação com hipoclorito de sódio 2,5% e medicação intracanal com hidróxido de cálcio por 7 dias, houve ausência de bactérias cultiváveis em 5 dos 11 canais radiculares, após a instrumentação e 9 dos 11 canais radiculares, após a remoção da medicação intracanal.

Sakamoto et al. (2007) avaliaram por meio de culturas independentes e identificação do método de PRC (16S rRNA) a microbiota presente nos canais com periodontite apical antes e após o preparo químico cirúrgico com hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio como medicação intracanal. Os resultados mostraram que

instrumentação e instrumentação/ medicação promoveram redução significativa (99,67% e 99,85%, respectivamente) no número de bactérias quando comparado com a coleta antes do tratamento, no entanto não houve diferença entre os resultados entre as coletas após a instrumentação e após a medicação intracanal. Os autores ressaltaram que apesar da falta de diferença estatística houve uma redução de 56% do número de microrganismos coletados após a aplicação da medicação intracanal e ressaltam a importância desta etapa na prática clínica.

Câmara et al. (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,5%; 1% e 2,5%) na instrumentação de canais radiculares infectados com *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, e *S. aureus* (37°C por 48h). Os resultados mostraram que o hipoclorito de sódio foi eficaz sobre *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, e *S. aureus*, em todas as concentrações avaliadas.

Deste forma, fica claro que a solução de hipoclorito de sódio é consagrada mundialmente como substância irrigante. Sua aceitação está relacionada com suas excelentes propriedades: capacidade de dissolver tecidos orgânicos, ser antimicrobiana, possuir pH alcalino, promover o clareamento, ser desodorizante e ter baixa tensão superficial (Byström; Sundqvist, 1983; 1985; Byström; Claesson; Sundqvist; 1985; Lage-Marques; Antoniazzi, 2002; Leonardo 2005; Tanomaru et al., 2005).

Sabe-se que a fase de preparo do canal é capaz de inviabilizar a maior parte dos microrganismos presentes no sistema de canais radiculares, no entanto, a fase de medicação intracanal seria coadjuvante para o melhor controle da infecção.

O hidróxido de cálcio tem sido amplamente utilizado, como medicação intracanal, devido suas propriedades antimicrobianas (Lage-Marques; Antoniazzi, 2002, Leonardo 2005), capacidade de induzir mineração (Lopes; Siqueira, 1999; Leonardo 2005), e, principalmente por neutralizar endotoxinas (Safavi; Nichols 1993; 1994; Silva et al., 2002; Tanomaru et al., 2003; Leonardo et al., 2004; Oliveira et al., 2005).

Devido o hipoclorito de sódio e o hidróxido de cálcio serem substâncias mundialmente utilizadas na prática clínica e fazerem parte do protocolo desta escola (Técnica Endodôntica FOU SP), as mesmas foram selecionadas como o protocolo tradicional a fim de comparar seus resultados aos do grupo que empregou a substância experimental (solução de nanopartículas de prata).

2.3 MICRORGANISMOS DAS PATOLOGIAS PULPARES E PERIAPICAIS

Em Endodontia, conhecer a microbiota que habita o sistema de canais radiculares é um assunto de interesse de muitos pesquisadores e clínicos, pois está diretamente relacionado com o planejamento terapêutico. Um grande desenvolvimento técnico e científico foi responsável pelo conhecimento das espécies de microrganismos, a interação entre eles e sua relação com as distintas patologias pulpares e periapicais.

Os primeiros relatos sobre a microbiota endodôntica datam 1894, com a publicação do estudo de Miller na revista *Dental Cosmos*. Mesmo empregando uma metodologia rudimentar o autor confirmou sua hipótese de que existe um grupo específico de bactérias associado à determinada patologia.

Setenta anos mais tarde, Shovelton (1964) avaliou a ocorrência e distribuição das bactérias no sistema de canais radiculares, em diferentes condições clínicas de polpa morta. Nos casos agudos, os microrganismos predominavam principalmente na luz do canal e na pré-dentina. Entretanto, uma maior penetração dos microrganismos foi observada nos casos mais crônicos.

A partir da metade da década de 70, quando foram desenvolvidas técnicas de cultura em anaerobiose, alterou-se o conceito da microbiota endodôntica. Até aquele momento, acreditava-se na predominância de anaeróbios facultativos e aeróbios. Foram, no entanto, os estudos de Sundqvist¹ (1976 apud Ferrari, 2004), que constataram ser os anaeróbios estritos a maioria dos microrganismos encontrados no canal radicular, representando um marco na literatura endodôntica.

O tipo de microbiota sediada no sistema de canais radiculares está relacionado com a tensão de oxigênio e a presença ou ausência de nutrientes essenciais (Sundqvist, 1994). Além desses fatores, Oliveira, Cravalho e Jorge (2007) citam a interferência das interações microbianas e o pH do ambiente que determinam o desenvolvimento de grupos específicos de microrganismos. Assim, durante a evolução da infecção ocorre uma série de interações, que modificam o tipo de microrganismos que ali residirá.

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

Fabricius et al., em 1982, exemplificam a interferência da interação microbiana, pois ao induzir lesões com suspensões microbianas puras ou mistas (várias espécies bacterianas) verificou que alguns microrganismos somente se demonstraram patogênicos quando associados. Cumpre, no entanto, salientar que *Enterococcus*, sobreviveram como cultura pura em todos os casos.

A infecção endodôntica primária geralmente inicia com bactérias facultativas, sendo que normalmente, após sete dias, 50% da microbiota é composta por anaeróbios Gram-positivos e Gram-negativos. Após aproximadamente três meses, esta proporção atinge 85% e após seis meses, os anaeróbios estritos constituem mais de 90% da microbiota do canal radicular (Lopes; Siqueira, 1999, Oliveira; Carvalho; Jorge, 2007). Os gêneros predominantes nessa fase são: *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Tannerella*, *Treponema*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces* e *Eubacterium* (Siqueira et al., 2002; Gomes et al., 2004; Gomes et al., 2006; Jacinto et al., 2006; Oliveira; Carvalho; Jorge., 2007). As infecções primárias são geralmente polimicrobianas com predomínio de bactérias anaeróbias (Gomes et al., 2004; Zehnder, 2006), particularmente as Gram-negativas (Mattison et al., 1987; Seltzer; Farber, 1994; Leonardo et al., 2004; Leonardo 2005).

A prevalência de *Actinomyces*, *Streptococcus* e *Enterococcus faecalis* em infecções primárias, foi verificada por Siqueira et al. (2002), por meio do método da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Foram avaliadas amostras de 53 dentes unirradiculares com rarefação óssea periapical, associada. A hibridização do DNA-DNA permitiu detectar *Streptococcus*, em 22,6% dos casos, *Actinomyces* spp. em 9,4% e *Enterococcus faecalis* em 7,5% dos casos.

O desenvolvimento do método molecular, particularmente a identificação dos microrganismos do canal radicular por PCR (Reação em Cadeia Polimerase) tem sido uma ferramenta importante, principalmente nos casos em que os agentes etiológicos são de difícil isolamento e cultivo. O uso dessa ferramenta da Biologia Molecular tem possibilitado a identificação mais precisa e ampliada das principais espécies infectantes do sistema de canais radiculares. Assim, esse método permitiu isolar *E. faecalis* nas infecções primárias, que até então, só haviam sido identificadas nas infecções secundárias (Siqueira et al., 2002). Outra vantagem da utilização desse método é seu emprego na detecção de vírus e seu papel na periodontite e nas lesões periapicais sintomáticas (Slots; Kamma; Sugar, 2003; Sabeti; Slots, 2004; Santangelo et al., 2004).

Nos casos de insucessos pós-terapia endodôntica ou quando há contaminação do canal radicular posteriormente ao tratamento executado, está-se diante de uma infecção secundária, a periodontite apical secundária. Este quadro só será considerado persistente, caso o tratamento tenha sido bem executado e ainda persista a inflamação periapical (Ferrari; Cai; Bombana, 2007).

Na maioria dos casos de periodontite apical secundária os microrganismos penetram no sistema de canais via microinfiltração coronária, alojam-se nos espaços vazios (istmos, canais secundários ou falhas do material de obturação) e ali encontram ambiente e substrato para se multiplicarem e desenvolveram um processo inflamatório (Siqueira; Rôças 1994; Chávez de Paz; Molander; Dahlén, 2004; Nair 2006).

Devido estar diante de um ecossistema diferenciado do dente sem intervenção, na periodontite apical secundária também se encontra uma microbiota particular, diferindo o número e tipo de microrganismos. Na maioria dos trabalhos que utilizaram cultura microbiológica na identificação dos microrganismos, foram encontrados o isolamento e uma ou duas espécies (Siren et al., 1997; Sundqvist et al., 1998; Molander et al., 1998). No entanto, quando a ferramenta molecular foi utilizada esse número aumentou para 4 (em média), sempre com predomínio de Gram-positivos (Siqueira; Rôças, 2004).

Nos casos de infecções secundárias e/ou persistentes há prevalência de anaeróbios facultativos e aeróbios, pertencentes aos gêneros *Enterococcus*, *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Candida*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* (Waltimo et al., 1997; Sundqvist et al., 1998; Peciulienė et al., 2000), sendo as espécies *E. faecalis* e *C. albicans* predominantes (Oliveira; Carvalho; Jorge, 2007).

Na maioria das vezes, os microrganismos anaeróbios facultativos são mais resistentes aos procedimentos endodônticos que os anaeróbios estritos. Os microrganismos anaeróbios facultativos podem permanecer em uma fase latente, com uma baixa taxa metabólica, por um longo período de tempo. Entretanto, as mudanças ambientais, como a infiltração coronária, podem levar a ativação destes microrganismos e conseqüente proliferação dos mesmos (Molander et al., 1998).

Em 1997, Siren et al. estudaram a relação entre os procedimentos clínicos e a ocorrência de bactérias facultativas entéricas na infecção do canal radicular. A amostra foi coletada por diferentes clínicos e enviada para análise, no Laboratório de

Microbiologia Oral de Helsenki. A espécie *Enterococcus faecalis* foi o microrganismo entérico predominante, sendo que em 33% dos casos se apresentou como monoinfecção. Dentre os microrganismos não entéricos, foram isolados *Streptococcus* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* e *P. nigrescens*. Os autores encontraram relação entre a presença de enterobactérias e o número elevado de consultas, bem como em dentes com inadequado selamento coronário.

A determinação da correlação de um grupo particular de bactérias com os sinais e sintomas endodônticos foi demonstrado por Gomes, Lilley e Drucker, em 1996. Utilizaram amostras de 30 pacientes submetidos ao tratamento endodôntico convencional. As culturas foram examinadas e os microrganismos isolados e identificados separadamente. Das 57 espécies identificadas, 60% eram anaeróbias estritas (mais comuns: *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia*) e 23% estreptococos, a maioria pertencente ao grupo milleri. As bactérias mais freqüentemente isoladas, nos casos de dor espontânea, foram *Prevotella* e *Peptostreptococcus* spp. Os casos com presença de exsudato estavam, especialmente, associados com *Peptostreptococcus* spp. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram constatadas nas amostras de dentes com sensibilidade a percussão, tendo sido *Eubacterium lentum* isolado em quatro casos de fístula. Os autores concluíram que a microbiota endodôntica é mista, com predomínio de anaeróbios estritos, havendo, de acordo com o parecer dos mesmos, uma significativa associação entre dor e presença de *Peptostreptococcus* spp. e *Prevotella*.

Tronstad, Barnett e Cervone, em 1990 observaram o ápice radicular dos dentes com lesões refratárias, indicados para cirurgia parendodôntica. Os ápices foram seccionados e observados em Microscopia Eletrônica de Varredura. Nove dos dez espécimes apresentaram a superfície do cimento próxima ao forame, repleta de irregularidades, com uma variedade de microrganismos agrupados em colônias e imersos em material extracelular. Apesar da dificuldade da identificação dos microrganismos, verificaram predomínio de cocos e bacilos. Este estudo confirma a hipótese da infecção extra radicular.

Após estudo de 967 amostras de dentes com lesão periapical, resistente à terapia convencional, Waltimo et al., 1997 determinaram a presença de fungos em 7% das amostras (48 cepas diferentes), isolados em cultura pura (13%) ou

associados a outras bactérias (87%). Excetuando-se um dos fungos isolados, todos os demais pertenciam ao gênero *Candida*, sendo *C. albicans* o mais comum (80%).

Em 1998, Molander et al., investigaram a microbiota dos canais radiculares tratados endodonticamente, de 100 dentes com periodontite apical crônica. As amostras foram coletadas logo após a remoção do material obturador, nas proximidades do ápice radicular (0,5 -1 mm), sob condições assépticas. Em 68 dentes houve crescimento de culturas microbianas. Na maioria dos casos (85%), uma ou duas cepas foram isoladas e o *Enterococcus* spp. foi o microrganismo mais freqüentemente isolado (32 dentes). Em menor proporção, isolaram-se os seguintes gêneros: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Escherichia* e *Staphylococcus*. Observou-se predomínio dos anaeróbios facultativos sobre os aeróbios obrigatórios, nos dentes com periodontite apical crônica.

Peciulienė et al. (2000) avaliaram a ocorrência de *Enterococcus faecalis* em dentes indicados para retratamento. Sob condições assépticas, duas amostras foram coletadas de cada dente; a primeira, após a desobstrução do canal, quando se obteve acesso a região apical; e, a segunda, ao final do preparo químico cirúrgico. Um total de 20 culturas foi isolado dos 25 dentes analisados. *E. faecalis* foi isolado em 14 casos na primeira coleta, sendo 5, destes, em cultura pura e 9 associados a outros microrganismos. Esta cepa foi considerada a responsável pela maior proporção da microbiota dos casos de periodontite apical crônica. Na segunda coleta, apenas 7 culturas foram isoladas, sendo *E. faecalis* identificados em 5 culturas. Os resultados demonstraram importante relação entre a presença de *E. faecalis* e dentes tratados previamente, apresentando deficiente preenchimento do material obturador.

A composição da microbiota de dentes portadores de insucesso endodôntico foi identificada por Hancock et al., em 2001. Cinqüenta e quatro retratamentos foram realizados e as amostras coletadas através de limas H e pontas de cone de papel absorventes. Microrganismos foram isolados em 33 casos, sendo identificadas 57 espécies. Na maioria dos casos (28) foi identificada uma ou duas espécies, sendo *E. faecalis* isolado em 10 casos (30,3%). *Candida albicans* foi identificada apenas em 1 caso, como monoinfecção. Observaram predomínio de anaeróbios Gram-positivos, nas amostras obtidas antes do preparo químico cirúrgico. Mesmo após o preparo, *E. faecalis* foi isolado em 9 casos (32%), que juntamente com *Actinomyces* e *Streptococcus* foram os microrganismos mais freqüentes.

Leonardo et al. (2002) relacionaram a presença do biofilme dentário apical aos diferentes estados de saúde periapical, através de estudo em Microscopia Eletrônica de Varredura, além de verificarem a morfologia da microbiota presente. Os dentes extraídos com polpa viva (5) e polpa morta sem alteração óssea periapical (8) não apresentaram biofilme radicular, nem áreas de reabsorções no ápice radicular. No entanto, os dentes com polpa morta e alteração óssea periapical (8), apresentaram pequenas áreas de reabsorção, com presença de microrganismos isolados ou em associações e formação de biofilme apical. Foram observadas as formas cocos, bacilos e filamentosos.

Chávez de Paz et al. (2003) identificaram microrganismos resistentes aos procedimentos clínicos endodônticos, em 200 dentes sob tratamento endodôntico, e evidência de rarefação óssea periapical. As amostras foram coletadas após o acesso, ao final do preparo químico cirúrgico e uso de medicação intracanal. Apesar da execução do preparo e medicação intracanal, anaeróbios facultativos Gram-positivos ainda puderam ser isolados, na maioria daqueles canais radiculares, enquanto anaeróbios Gram-negativos foram detectados em menos de 20% dos casos estudados. *Lactobacillus* spp.; *Streptococcus* não mutans e *Enterococcus* spp. foram as espécies mais prevalentes. Os autores concluíram que os anaeróbios Gram-negativos foram mais sensíveis à terapia endodôntica, quando comparados aos Gram-positivos. Apontaram fatores tais como estrutura da parede celular, secreção de produtos metabólicos e resistência medicamentosa como causas da alta prevalência.

Em 2003, Pinheiro et al., avaliaram a microbiota de 60 canais submetidos à terapia endodôntica e com lesão periapical, após 2 anos de tratamento. Os dentes foram desobturados sob ambiente asséptico e o material, depois de colhido, identificado. Crescimento de microrganismos foi identificado em 51 canais, dentre estes, 83,3% eram Gram-positivos e 57,4% anaeróbios facultativos. A espécie *E. faecalis* foi isolada em aproximadamente 53% dos canais com cultura positiva e predominou como única espécie, na infecção. Entretanto, os anaeróbios obrigatórios foram freqüentemente isolados em infecções polimicrobianas e com sintomatologia. Os autores constataram que nos casos de insucesso há predomínio de Gram-positivos e anaeróbios facultativos, sendo *E. faecalis* a espécie mais freqüente.

A microbiota dos dentes com infecção primária e secundária foi investigada por Gomes et al. (2004). As 64 amostras foram coletadas sob um rígido protocolo de

antisepsia e desinfecção. Depois de cultivados em ambiente de anaerobiose, os microrganismos foram identificados. Foram isoladas 56 espécies diferentes, com predomínio de anaeróbios ou microanaerófilos na infecção primária (70%) e facultativos e Gram-positivos (75%) na infecção secundária. Os gêneros mais freqüentemente isolados na infecção secundária foram *Peptostreptococcus* (58,3%), *Streptococcus* (53,3%), *Fusobacterium* (33,3%), *Enterococcus* (13,3%), *Staphylococcus* (13,3%), dentre outros. Os autores identificaram importante relação de *E. faecalis*, *Streptococcus* spp., *P. micros* e *F. necrophorum*, em dentes previamente tratados ($p < 0,05$), além de observarem alteração da microbiota nos casos de retratamento.

Siqueira e Sen (2004) explicaram a habilidade dos fungos em infectar dentina radicular, devido sua adaptação a uma variedade de condições ambientais, adesão a diferentes superfícies, produção de enzimas hidrolíticas, transição morfológica e formação de biofilme. Relataram, ainda, que o gênero mais freqüente foi *Candida*, destacando-se a espécie *C. albicans*, encontrada em infecções primárias e refratárias, sobretudo devido ao fato de as cepas serem resistentes ao hidróxido de cálcio, medicação comumente utilizada na terapêutica endodôntica. No entanto, o hidróxido de cálcio, associado a outros fármacos (paramonoclorofenol ou clorexidina), constituiu-se eficiente agente antimicrobiano, para estas situações.

O principal habitat de *E. faecalis* e *E. faecium* é, como o próprio nome sugere, o trato gastrointestinal, sendo que *E. faecalis* é mais prevalente em humanos e *E. faecium* mais prevalente em porcos e aves. Além disso, Aas et al. (2005) determinaram, por método de culturas independentes, que esses microrganismos não fazem parte da microbiota tipicamente comensal da cavidade oral.

A Reação de Polimerase em Cadeia foi utilizada por Rôças et al. (2004), na Coréia do Sul, para identificar 9 patógenos, freqüentemente associados às lesões periapicais, resistentes à terapia endodôntica. Após a remoção do material obturador do canal radicular, a amostra foi coletada e processada com *primers* específicos para a identificação de *Actinomyces radicidentis*, *C. albicans*, *D. pneumosintes*, *E. faecalis*, *Peptostreptococcus micros*, *P. propionicus*, *P. alactolyticus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius* e *Tannarella forsythensis*. A espécie mais prevalente, detectada em 64% dos casos, foi o *E. faecalis*, seguido do *Streptococcus* spp., identificado em 21% e *T. forsythensis*, em 14% dos casos. Nenhuma levedura foi, no entanto, isolada.

Foschi et al. (2005) pesquisaram pelo método de PCR a presença das seguintes bactérias nas infecções endodônicas: *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tanarella forsythensis* e *Treponema denticola*. *E. faecalis* e *T. denticola* foram as mais prevalentes, identificadas em 15/62 amostras (24%). *E. faecalis* foi identificado em 60% dos dentes com periodontite apical e em 72% dos dentes com infecções secundárias, demonstrando relação estatisticamente significativa com essas duas patologias,

Da mesma forma, Gomes et al. (2008) investigaram a presença de nove espécies bacterianas em canais radiculares obturados e que apresentavam lesões periapicais por PCR. De acordo com os resultados, *E. faecalis* foi a espécie mais prevalente, detectada em 77,8%, seguido por *Peptostreptococcus micros*, detectada em 51,1%. *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* foram detectados em 35,6%, 22,2%, 11,1% e 11,1% das amostras, respectivamente. Espécies menos freqüentes também puderam ser identificadas como *F. alocis* em 26,7%, *T. denticola* em 24,4% e *T. forsythia* em 4,4% das amostras. Os autores concluíram que *E. faecalis* foi a espécie mais freqüente nos casos de insucesso, além de observarem relação sinérgica entre algumas espécies.

Tendo em vista que aproximadamente 50% dos microrganismos encontrados na infecção endodôntica não serem cultivados Sakamoto et al. (2007) avaliaram por meio de culturas independentes e identificação do método de PRC (16S rRNA) a microbiota presente nos canais com periodontite apical antes e após o preparo químico cirúrgico com hipoclorito de sódio e medicação intracanal. Quarenta e três táxons distintos de bactérias foram identificados, dos quais 24 (56%) foram filotipos não cultivados. Após a instrumentação, dezenove destes 43 foram identificados como estreptococos, sendo o grupo de microrganismo mais prevalente. Os resultados mostram que a cultura de métodos independentes fornece uma visão detalhada sobre os efeitos dos protocolos de desinfecção intracanal, ajudando a definir as estratégias mais eficazes para lidar com as bactérias endodônticas.

Sakamoto et al. (2008) identificaram a diversidade de bactérias envolvidas com as falhas do tratamento endodôntico por abordagens de culturas independentes usando análise dos clones dos genes 16S RNAr. Bactérias foram identificadas em todos os casos, confirmando a etiologia infecciosa da doença pós-obturação. Setenta e quatro táxons de bactérias pertencentes a seis filos foram encontrados em nove casos investigados. Destes, 55% foram identificados como filotipos não

cultivados. Vinte e cinco novos filotipos foram identificados. A maioria dos dentes abrigou um consórcio misto, com uma média de 10 táxons por caso. Apenas 11 táxons foram encontrados em mais de um caso, revelando uma grande variabilidade inter individual na composição da microbiota. Os resultados atuais revelaram patógenos ainda não cultivados, como também a presença de *E. faecalis* compondo a microbiota mista nas infecções secundárias do canal radicular.

Blome et al. (2008) quantificaram e identificaram os microrganismos presentes nas amostras de 40 canais radiculares com periodontite apical crônica, tanto em infecções primárias (n=20) como em casos de insucesso endodôntico (n=20). Para isso, utilizaram o método molecular da PCR. Os resultados mostraram que a infecção primária apresentou quantidade de UFC significativamente maior quando comparada com a infecção secundária e que houve maior redução de UFC após o preparo químico cirúrgico nos casos de infecção primária (99,9%) que na infecção secundária (97,3%). O uso do hidróxido de cálcio como medicação intracanal não aumentou a redução dos microrganismos do canal radicular. *P. micros* e *P. endodontalis* foram as espécies mais prevalentes tanto na infecção primária quanto secundária. *E. faecalis* foi detectado em 15% das amostras da infecção primárias (3/20 amostras) e 10% da infecção secundária (2/20 amostras). As espécies identificadas na infecção secundárias foram altamente diversificadas das identificadas na infecção primária.

Zehnder e Guggenheim (2009) questionaram a origem de *E. faecalis* no sistema do canal radicular. A partir dos dados disponíveis na revisão de literatura concluíram que enterococos não são os primeiros invasores do sistema de canal radicular necrosado, por não fazerem parte da microbiota típica bucal, nem serem identificados em lesões cariosas. Mas, quando presentes na cavidade oral, essa espécie entra no canal em qualquer fase do tratamento de canal, durante ou após o tratamento, principalmente se houver um selamento coronal inadequado. Os autores determinaram que a fonte alimentar é, provavelmente a principal via de contaminação de *E. faecalis* na cavidade oral. Sugerem que mais estudos sejam realizados a fim de determinar os fatores de virulência que favorecem a ocorrência de enterococos em canais radiculares obturados, comparar clones de genes encontrados no canal radicular e seus homólogos em produtos alimentícios e seria interessante identificar os mecanismos prevenir a colonização de enterococos na cavidade oral.

2.4 ENDOTOXINA

As bactérias Gram-negativas possuem, estruturalmente, além da camada de peptidoglicano, outra camada mais periférica, denominada de membrana externa, localizada acima do peptidoglicano, que contém lipoproteínas e lipopolissacarídeos. Os lipopolissacarídeos (LPS), quando liberados da célula Gram-negativa, são conhecidos como endotoxinas, sendo que o Lipídio A é a principal porção da molécula responsável por seus efeitos tóxicos (Rietschel; Brade, 1992).

O primeiro estudo clínico que detectou e quantificou endotoxina nos dentes com comprometimento endodôntico foi realizado por Schein e Schilder, em 1975. Os autores desenvolveram a pesquisa baseados na hipótese de serem as bactérias Gram-negativas as principais responsáveis pelas doenças periapicais. O conteúdo do canal dos dentes que apresentavam polpa morta, rarefação óssea periapical e sintomatologia dolorosa apresentavam grande quantidade de endotoxina, diferindo significativamente dos dentes hígidos.

Com a finalidade de conhecer a distribuição das endotoxinas no sistema de canais infectados, Horiba et al. (1990) coletaram raspas de dentina em diferentes profundidades de dentes com comprometimento endodôntico (n=25), e as compararam com as raspas de dentes saudáveis. Os resultados demonstraram que a quantidade de endotoxinas é significativamente maior nos dentes com comprometimento endodôntico do que nos dentes saudáveis independente da profundidade analisada. Houve maior acúmulo de endotoxinas nas proximidades do canal radicular (até 300 µm de profundidade) do que nas áreas mais profundas (de 301 µm até 800 µm). Também verificaram que maior quantidade de endotoxinas estava presente nos dentes que apresentavam rarefação óssea periapical.

Horiba et al. (1991) relacionaram a presença de endotoxinas com as características clínicas de dor espontânea, dor à percussão, presença de exsudato e áreas de rarefação óssea periapical. Amostras de 30 dentes foram coletadas e analisadas pelo método do lisado de amebócitos de *Limulus*. Os resultados demonstraram que houve relação entre o maior número de endotoxinas nos dentes que apresentavam sintomatologia dolorosa, áreas de reabsorção óssea periapical e presença de exsudato. Esses achados sugerem que a gravidade das doenças

periapicais guarda relação com a quantidade de endotoxinas presentes no sistema de canais radiculares.

Além da grande quantidade de endotoxinas detectada na luz do canal radicular e na região periapical, o LPS também apresenta capacidade de difusão através da dentina humana. Nissan et al. (1995) criaram cavidades na superfície oclusal em molares inferiores a fim de produzir uma camada de dentina de 0,5 mm entre a parede oclusal da cavidade e a câmara pulpar. A câmara pulpar foi preenchida com endotoxina e a cada 30 min durante 5 horas foi coletada uma amostra da superfície oposta, assim como ao final de 24 horas. A análise foi feita pelo teste lisado de amebócitos de *Limulus*. Os resultados mostraram serem as endotoxinas capazes de se difundirem através de 0,5 mm de dentina, em direção apical, num período que variou de 15 min a 4 h e 30 min.

Foi demonstrado que as endotoxinas bacterianas desempenham papel importante em processos de inflamação e reabsorção óssea (Wesselink; Thoden Van Veltz; Makkes, 1978; Dahlén; Magnusson; Moller, 1981; Dwyer; Torabinejad, 1981; Raisz et al., 1981; Pitts; Williams; Morton, 1982; Hosoya; Matsushima, 1997; Jiang et al., 2002).

Murray e Sauders (2000) sugeriram que a bacteremia ou a associação de endotoxinas bacterianas, subsequente à terapia endodôntica, podem causar complicações sistêmicas.

Jacinto et al. (2005) quantificaram a concentração de endotoxinas e a relacionaram com a presença de sinais e sintomas. A taxa de endotoxina variou entre 23900 a 221000 EU/mL, sendo que a média nos casos sintomáticos foi de 208880 EU/mL, enquanto nos assintomáticos foi de 151450 EU/mL. Os autores concluíram que a endotoxina está presente em altas concentrações nos canais infectados e que há relação positiva entre a presença de altas concentrações de endotoxinas com a presença dos sinais e sintomas avaliados.

2.4.1 Neutralização de endotoxinas

Atualmente, o objetivo do tratamento endodôntico de dentes com polpa morta associados às lesões periapicais não consiste na simples eliminação das bactérias,

mas também na inativação das endotoxinas, especialmente a inativação do lipídio A que é a porção mais agressiva da endotoxina (Silva et al., 2004).

De acordo com Dwyer e Torabinejad (1981) substâncias altamente alcalinas, como o hidróxido de sódio – NaOH – inativa o LPS. Entretanto, essas substâncias são agressivas aos tecidos periapicais.

Buttler e Crawford (1982) avaliaram o efeito do hipoclorito de sódio em neutralizar as endotoxinas de *E. coli* e *Salmonella typhosa* nas concentrações de 0,58%, 2,7% e 5,2%. Foi realizado primeiramente um estudo *in vitro* no qual a solução de hipoclorito (1 ml) foi mantida em contato com a endotoxina (1 ml) por 1h. A quantificação da endotoxina foi mensurada pelo teste lisado do amebócito de *Limulus*. As três concentrações foram igualmente capazes de neutralizar as endotoxinas. Posteriormente, as endotoxinas tratadas com as soluções de hipoclorito foram injetadas no dorso de ratos, a fim de confirmar sua neutralização, avaliando as regiões após 24 e 48h da aplicação. As alterações produzidas pela endotoxina pura injetada foi semelhante àquelas produzidas pelas soluções tratadas com o hipoclorito de sódio a 0,58% e a 2,7%. Os resultados na concentração de 5,2% foram inconclusivos.

Conhecidos alguns dos efeitos das endotoxinas sobre os tecidos periapicais, alguns autores despertaram para o estudo da atuação do hidróxido de cálcio sobre as endotoxinas. Safavi e Nichols, em 1993, foram os primeiros a relatarem a capacidade do hidróxido de cálcio em neutralizar a porção lipídica do LPS bacteriano, demonstrando que quantidades elevadas de ácidos graxos eram liberadas em amostras de LPS tratadas com hidróxido de cálcio. Segundo os autores a porção lipídica do LPS foi hidrolisada pelo hidróxido de cálcio, resultando em ácidos graxos livres. Os resultados sugeriram que a degradação do LPS mediada pelo hidróxido de cálcio pode apresentar importância nos efeitos benéficos obtidos com o uso desse produto em Endodontia.

Os mesmos autores, no ano seguinte (Safavi; Nichols, 1994), obtiveram a inativação do LPS pelo hidróxido de cálcio, por meio dos valores mensurados pela produção de prostaglandina E₂ por monócitos humanos.

Em 1999, Haight-Ponce, Endo e Horiuchi verificaram a ação do hipoclorito de sódio a 10% e do peróxido de hidrogênio a 3% sobre as endotoxinas de *Escherichia coli*. A interação entre as substâncias foi avaliada no período de 1, 10 e 30 minutos, por meio do teste de lisado de amebócitos de *Limulus*. A quantidade de endotoxina

inativada pelo hipoclorito de sódio foi significativamente maior do que pelo peróxido de hidrogênio. O hipoclorito foi capaz de neutralizar a toxina no período de 1, 10 e 30 minutos. A concentração foi escolhida aleatoriamente, já que trabalhos mostram que a 5,25%, não há efeito sobre as endotoxinas e por ser 10% comumente utilizado pelos endodontistas japoneses.

Buck, et al. (2001) avaliaram o efeito de substâncias irrigadoras e do hidróxido de cálcio sobre as endotoxinas. Uma solução aquosa de endotoxina foi misturada por 30 min com as seguintes soluções irrigadoras: hipoclorito de sódio 2,6%, clorexidina 0,12%, EDTA 15% e suspensão aquosa de hidróxido de cálcio 24,6mg/ml, água apirogênica e etanol 95%. Associações dessas substâncias também foram testadas, todas analisadas pela liberação de ácidos graxos livres. Os resultados mostraram a inativação de até 27,5% de LPS, em um período de incubação do hidróxido de cálcio de cinco dias e quando associado o hipoclorito de sódio com clorexidina e etanol.

Em 2002, Silva, et al. aplicaram em dentes de cães uma suspensão de endotoxina associada ou não ao hidróxido de cálcio, após a pulpectomia e preparo químico cirúrgico do canal radicular. O outro grupo de dentes (n=10) tiveram seus canais radiculares expostos à cavidade bucal por 5 dias e em seguida foram selados até completar os 30 dias. O grupo que recebeu LPS e o grupo que permaneceu em contato com a cavidade oral apresentaram presença de infiltrado inflamatório severo, ligamento periodontal espessado e com áreas ativas de reabsorção óssea e do cimento apical. Nos dentes em que foram aplicadas as suspensões de endotoxina associada ao hidróxido de cálcio apresentaram tecidos periapicais com inflamação branda e sem sinal de reabsorção óssea ou cementária. Os autores sugerem que o uso de hidróxido de cálcio como medicação intracanal deve interferir na ação da endotoxina para que essa não induza a formação de áreas de reabsorção.

Tanomaru, et al. em 2003, realizou um estudo *in vivo*, no qual os canais radiculares de dentes de cães foram preenchidos com LPS bacteriano e, a seguir submetidos ao preparo químico cirúrgico com as seguintes substâncias: solução de hipoclorito de sódio a 1%, 2,5% e 5%; clorexidina a 2% e solução fisiológica. Foi acrescentado outro grupo, no qual o preparo químico cirúrgico foi realizado com solução salina e, em seguida foi medicado com hidróxido de cálcio (Callen). Após 60 dias do tratamento, foi feita a análise histopatológica da região apical e periapical.

Das soluções testadas, somente a solução concentrada de hipoclorito de sódio a 5%, foi a que ofereceu os melhores resultados, inativando parcialmente as endotoxinas. O grupo que foi medicado demonstrou a melhor reparação, menor infiltrado inflamatório e sem reabsorção de cimento ou óssea. Os autores concluíram que o preparo químico cirúrgico não foi capaz de inativar o LPS, no entanto o hidróxido de cálcio demonstrou inativar os efeitos promovidos pela endotoxina.

O LPS estimula a formação de osteoclastos e o hidróxido de cálcio inibe significativamente a sua estimulação. Segundo Jiang, et al. (2003), esse pode ser um dos mecanismos pelo qual a utilização do produto entre consultas cria um ambiente favorável para a reparação periapical.

Silva, et al. (2004) contaminaram dentes de cães com LPS após a pulpectomia. Esses dentes permaneceram selados por 10 dias, quando foram preparados química e mecanicamente com soluções de hipoclorito de sódio a 1%, 2,5% e 5%, além de clorexidina a 2%. Os dentes foram selados novamente por 60 dias. A avaliação histopatológica evidenciou que após 60 dias no grupo controle (não recebeu nenhum tratamento) houve alterações severas na região periapical, incluindo a reabsorção óssea e de cimento. O infiltrado inflamatório da região periapical foi estatisticamente menos intenso, nos grupos irrigados com solução de hipoclorito de sódio a 5,25% e com a clorexidina a 2%. No entanto os autores concluíram que nenhum dos agentes irrigantes utilizados foi efetivo na neutralização das endotoxinas na região periapical.

Devido o preparo do canal não ser suficiente para neutralizar os efeitos da endotoxina, Oliveira et al., em 2005, sugeriram o uso da polimixina B, hidróxido de cálcio e da neomicina associada a polimixina B e hidrocortisona, como medicação intracanal. Endotoxinas de *E. coli* foram inoculadas nos canais radiculares e as medicações foram aplicadas por um período de 7 dias. Quando o hidróxido de cálcio foi utilizado como medicação intracanal não houve endotoxina suficiente para reagir com o lisado, sendo essa medicação considerada eficaz. A polimixina B também foi eficaz na neutralização das endotoxinas, alterando as propriedades do LPS em produzir anticorpos.

No ano de 2007b, Oliveira et al. avaliaram a ação dos irrigantes em neutralizar endotoxinas no interior dos canais radiculares. Durante o preparo do canal foram testadas as seguintes soluções: hipoclorito de sódio 2,5% e 5,25%,

clorexidina 2%, hidróxido de cálcio 0,14%, polimixina B e soro fisiológico (grupo controle). O efeito da inativação do LPS foi avaliado imediatamente e após 7 dias do preparo, pelos testes cromogênico do lisado de amebócios de *Limulus* e pela produção de anticorpos em Linfócitos B. O hidróxido de cálcio e polimixina B neutralizaram as endotoxinas do canal radicular e alteraram a capacidade do LPS em estimular a produção de anticorpos pelos linfócitos B. O hipoclorito de sódio e a clorexidina não inativaram as endotoxinas.

Um estudo *in vivo* foi realizado por Vianna et al. (2007) para avaliar a capacidade da instrumentação com clorexidina gel 2% e de diferentes medicações (CHX, Ca(OH)_2 e CHX+Ca(OH)_2) por 7 dias, de neutralizar endotoxinas e de reduzir a microbiota presente nos canais radiculares com periodontite apical. Inicialmente foi detectada a concentração variando entre 62,9 a 214,56 EU/mL para endotoxinas e entre $4 \cdot 10^5$ a $2,6 \cdot 10^6$ para UFC/mL. Após a instrumentação houve redução de 44,4% de endotoxinas e 99,96% de UFC, apesar de 8 amostras (33,3%) terem apresentado culturas positivas. Após os 7 dias de medicação intracanal houve apenas redução de 1,4% de endotoxinas, quando comparado com os resultados da coleta após a instrumentação. Os autores puderam concluir que valores elevados de endotoxinas foram encontrados mesmo após a aplicação da medicação intracanal.

Cardoso et al. (2008) avaliaram a capacidade antimicrobiana da água ozonizada sobre *C. albicans* e *E. faecalis*, além da capacidade de neutralização de endotoxinas de *E. coli*. Para isso foram utilizadas raízes de dentes humanos, onde foram inoculados os microrganismos e a endotoxina. Foram coletadas amostras do canal radicular após a contaminação, imediatamente após a instrumentação e após 7 dias. A água ozonizada reduziu significativamente o número de *C. albicans* e *E. faecalis* imediatamente após a instrumentação, no entanto houve aumento do número após 7 dias e nenhum efeito sobre endotoxina foi observado.

A neutralização de endotoxinas por meio da instrumentação com hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina gel 2% foi avaliada *in vivo*, em estudo realizado por Gomes et al. (2009), em dentes com periodontite apical. Todas as amostras coletadas inicialmente demonstraram altos valores de endotoxina. Após a instrumentação houve redução significativa no grupo instrumentado com hipoclorito de sódio ($p < 0.05$). No entanto, os autores concluem que nenhum irrigante avaliado

foi efetivo na neutralização de endotoxinas do canal radicular com periodontite apical.

Deste modo, nota-se que nenhum dos irrigantes comumente utilizados (hipoclorito de sódio e clorexidina) é eficaz em neutralizar endotoxinas durante a terapia endodôntica. No entanto, o curativo de demora hidróxido de cálcio mostra-se satisfatório para esta finalidade. Visto que as nanopartículas de prata apresentam seu mecanismo de ação diretamente relacionado com a membrana celular e apresenta-se eficaz sobre *E. coli*, um microrganismo Gram-negativo, especula-se a possibilidade de sucesso também na neutralização de endotoxinas.

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve por objetivo:

- a) Avaliar a ação antimicrobiana e a capacidade de neutralizar endotoxinas nos canais radiculares de uma solução de nanopartículas de prata sobre biofilme multiespécie (*C. albicans*, *E. coli* e *E. faecalis*), utilizada como agente irrigante, em comparação com o hipoclorito de sódio 1% associado ao creme de Endo-PTC;
- b) Avaliar a atividade antimicrobiana e de neutralização de endotoxinas das seguintes medicações intracanal: solução de nanopartículas de prata, pasta de hidróxido de cálcio manipulada com soro fisiológico e, pasta de hidróxido de cálcio manipulada com solução de nanopartículas de prata.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP/ SP) (processo no. 83/ 2009 – ANEXO A).

4.1 PREPARO DA SOLUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A solução teste foi preparada a partir de cargas elétricas (5 mA) emitidas em placas de prata imersas em água destilada. A solução de nanopartículas de prata foi produzida pela empresa Khemia (IPEN, SP, Brasil), na concentração de 50 partes por milhão (ppm) e sua concentração foi aferida pela diferença de potencial condutivo entre o veículo base e o produto final obtido pela eletrólise.

4.2 SELEÇÃO E PREPARO DOS ESPÉCIMES

Foram selecionadas para o estudo 48 raízes de dentes humanos, com canais retos e secção transversal circular, fornecidas pelo Banco de Dentes Humanos da FOUSP. Os indutos, cálculos e tecidos remanescentes foram removidos e os espécimes foram armazenados em solução fisiológica. Previamente a manipulação, os dentes foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min e permaneceram em solução fisiológica a fim de se manterem hidratadas, até o momento do uso.

As coroas foram seccionadas, padronizando o comprimento das raízes em 17 mm (Figura 4.1). Uma lima tipo K de fino calibre (nº. 10 ou 15), com cursor delimitando em 17 mm, foi introduzida no canal até que sua guia de penetração fosse visualizada no forame apical com auxílio de uma lupa (4x). Caso a ponta do instrumento não fosse visualizada, lixava-se a porção cervical a fim de padronizar o comprimento do conduto em 17 mm. O comprimento de trabalho foi estabelecido em 1 mm aquém do forame apical (16 mm).

O preparo químico cirúrgico inicial foi realizado com instrumentos rotatórios Gades-Glidden nºs 3 e 4 (Dentsply, Maillefer, Suíça) nos terços cervical e médio e, em seguida, foi realizada a instrumentação em toda a extensão do canal até a lima tipo Kerr nº 30 (Dentsply, Maillefer, Suíça), para padronizar o diâmetro dos canais radiculares dos espécimes. A cada substituição de instrumento, foi feita a manobra de irrigação-aspiração empregando 3 mL de hipoclorito de sódio a 1%. Após o preparo químico cirúrgico, os canais foram secos e irrigados com 10 mL de EDTA-T 17%, por aproximadamente 3 min. Com o intuito de eliminar os resíduos das soluções empregadas os canais radiculares foram irrigados com 10 mL de solução salina fisiológica.

Os ápices dos dentes foram preparados com ácido fosfórico 37% a fim de serem selados com resina fotopolimerizável (Z100, 3M, Sumaré, SP, Brasil) e as superfícies externas das raízes foram impermeabilizada com camada de adesivo epóxi ARALDITE (Bascola, São Paulo, SP, Brasil), exceto na região cervical da raiz (Oliveira et al., 2007b) (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Raiz após a remoção da coroa e ajuste do comprimento de trabalho (A), sendo preparada com ácido fosfórico (B) para posterior selamento apical com resina composta (C) e impermeabilização externa da raiz com adesivo epóxi

Os espécimes foram incluídos aleatoriamente em placas de cultura de células de 24 poços (Costar, New York, EUA), fixados com resina acrílica quimicamente ativada até a altura aproximada de 5 mm. Cada placa recebeu 12 raízes (nos poços

mais externos), totalizando 4 placas (Figura 4.2). Em seguida, as placas foram tampadas, embaladas e enviadas a Empresa Brasileira de Radiação (EMBRARAD, Cotia – São Paulo, Brasil) para serem esterilizadas por irradiação Gama com Cobalto⁶⁰ (20 KGy por 6 horas), assim como todo material clínico e laboratorial utilizado na manipulação dos espécimes (pinça, seringa, ponteiras, limas, gaze, algodão, tubo eppendorf, tubo Falcon). Essa conduta foi realizada a fim de neutralizar endotoxinas pré-existentes (Csako, et al. 1983).

4.3 CONTAMINAÇÃO DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES

Todo procedimento de contaminação intracanal dos espécimes foi realizado no interior do fluxo laminar. A suspensão microbiana foi preparada a partir de culturas de 24 h em ágar de infusão de cérebro e coração (BHI; Difco, Detroit, USA) para *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans*. Após incubação, colônias dos microrganismos foram suspensas em solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,9%), e ajustada em espectrofotômetro (B 582, Micronal, São Paulo, Brasil), até obtenção de suspensão padronizada contendo 10^6 células/mL (Figura 4.3). Os parâmetros de densidade óptica e comprimento de onda utilizados foram, respectivamente: 0,324 e 590 nm para *E. coli*, 0,298 e 760 nm para *E. faecalis* e 0,284 e 530 nm para *C. albicans*.

Os canais radiculares foram preenchidos, com auxílio de micropipeta automática, com 10 µL de suspensão de *Escherichia coli* (ATCC 25922) na concentração de 10^6 cel/mL, seguida da adição de 10 µL de caldo de cultura (BHI). Decorridos sete dias, foi acrescentado nos canais 5 µL de suspensão de *Candida albicans* (ATCC 18804), 5 µL *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) (aproximadamente 10^6 cel/mL) e mais 10 µL de caldo BHI. O selamento cervical foi realizado com uma bolinha de algodão esterilizada embebida em caldo BHI e as placas foram incubadas em estufa de a $37\pm1^\circ\text{C}$, sob umidade relativa, por mais 21 dias, totalizando 28 dias de contaminação. Durante esse período foi acrescentado 20 µL de caldo de cultura (BHI) no interior do canal 3 vezes por semana, em dias intercalados (Molina, 2008).

Após os 28 dias foi realizada a coleta de confirmação do conteúdo do canal (acorde descrita no item 4.5) a fim de confirmar a contaminação pelos três microrganismos.

Figura 4.2 – Demonstração da distribuição dos espécimes fixados na placa de cultura de células

Figura 4.3 – Cultura de 24 h de *C. albicans* e padronização da suspensão por espectrofotômetro

4.4 PREPARO QUÍMICO CIRÚRGICO E MEDICAÇÃO INTRACANAL

Após o período da contaminação, os espécimes foram divididos em 4 grupos, de acordo com a substância irrigadora e medicação intracanal empregadas, conforme quadro 4.1.

Quadro 4.1 – Distribuição dos grupos de acordo com a substância irrigadora e medicação intracanal empregadas

GRUPOS	AGENTE IRRIGANTE	MEDICAÇÃO INTRACANAL
Controle G1 (n=12)	Sol. fisiológica apirogênica	Sol. fisiológica apirogênica
G2 (n=12)	Hipoclorito de sódio 1% + Endo-PTC	Hidróxido de cálcio com sol. Fisiológica
G3 (n=12)	Sol. de nanopartículas de prata - 50ppm	Hidróxido de cálcio com sol. de nanopartículas de prata
G4 (n=12)	Sol. de nanopartículas de prata - 50ppm	Sol. de nanopartículas de prata - 50ppm

As raízes foram completamente preenchidas com a substância química auxiliar acorde cada grupo e os canais foram instrumentados até lima K 50 e escalonado até a lima K 80. A cada troca de instrumento, o canal radicular foi irrigado com 3 mL do agente irrigante com auxílio de seringas de 10 mL (Injex, Ourinhos, SP, Brasil) e a aspiração com intermediários de sugadores endodônticos acoplados à bomba à vácuo (Figura 4.4). Após conclusão do preparo químico cirúrgico todos os espécimes foram irrigados com 10 mL de EDTA-T 17% (Farmácia de manipulação Fórmula e Ação, SP, Brasil) por aproximadamente 3 min e, em seguida foram irrigados com 10 mL de solução fisiológica estéril e apirogênica. Após a instrumentação dos canais radiculares, foram realizadas duas coletas, uma imediatamente após o preparo (1ª coleta) e outra após sete dias (2ª coleta), quando foi inserida a medicação intracanal.

O curativo de demora foi inserido no canal com auxílio de micropipeta (30 µL) nos grupos que receberam solução fisiológica ou de nanopartículas de prata, ou com limas endodônticas, nos grupos que receberam uma pasta de hidróxido de cálcio P.A. (Farmácia de Manipulação Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil), na consistência de creme dental (Figura 4.5).

A pasta de hidróxido de cálcio foi manipulada com a seguinte proporção pó/líquido: 240mg de pó para 100µL de líquido.

Figura 4.4 – Instrumentação do espécime (A), seguida de irrigação e aspiração (B)

Figura 4.5 – Proporção do pó/ líquido de hidróxido de cálcio e solução salina (A) e o aspecto da pasta ao ser inserido no canal radicular (B)

Após o preenchimento dos canais radiculares com a medicação intracanal, estes permaneceram em estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por quatorze dias. Após esse período a medicação foi removida com irrigação de solução salina apirogênica (10 mL), quando foi feita outra coleta do conteúdo do canal (3ª coleta). Nos grupos que receberam a pasta de hidróxido de cálcio foram recaptulados os dois últimos instrumentos (Lima K 45 e 50).

Por fim, as placas foram mantidas em estufa a 37°C , sob umidade relativa durante 7 dias, sendo realizado após esse período a 4ª coleta, a fim de verificar o crescimento dos possíveis microrganismos remanescentes nas profundidades dos túbulos dentinários.

4.5 COLETAS DO CONTEÚDO DO CANAL RADICULAR

Foram realizadas 5 coletas do conteúdo do canal radicular durante o experimento: confirmação da contaminação; imediatamente após a instrumentação (1ª. coleta); após 7 dias da instrumentação (2ª. coleta); imediatamente após a remoção da medicação intracanal (3ª. coleta) e; após 7 dias do período de ação da medicação intracanal (4ª. coleta).

Para todas as coletas foram realizados testes microbiológicos e nas quatro últimas coletas foram realizados o teste quantitativo de endotoxinas dos canais radiculares.

Todas as coletadas foram realizadas da seguinte forma: o canal radicular foi preenchido com solução fisiológica apirogênica, a qual foi agitada com agulhas acopladas a seringas de 1 mL (Injex, Ourinhos-SP, Brasil) durante 1 min e, a seguir, foram coletados 100 µL do conteúdo de cada canal radicular com seringas de insulina (Figura 4.6). Este conteúdo foi transferido para tubo de polipropileno tipo Eppendorf, apirogênicos, contendo 900 µL de solução fisiológica apirogênica, obtendo diluição de 10^{-1} do conteúdo coletado do interior do canal radicular.

A partir desta suspensão inicial, foram preparadas diluições decimais e alíquotas de 100 µL foram semeadas em duplicata nas placas contendo ágar MacConkey (Himedia, Mumbai, India), ágar M Enterococcus (Difco, Detroit, USA) e ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) com cloranfenicol 0,01% (União Química, São Paulo, Brasil) para analisar o crescimento de *E.coli*, *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente.

A leitura dos resultados foi realizada após 48 horas de incubação das placas em estufa $37\pm1^{\circ}\text{C}$. A atividade antimicrobiana dos irrigantes e da medicação foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ mL).

Uma alíquota de 200 µL da diluição 10^{-3} ou 10^{-4} foi utilizada para quantificar as endotoxinas pelo teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL) (conforme descrito no item 4.6).

Entre a coleta imediata e após 7 dias os canais radiculares foram preenchidos com solução fisiológica apirogênica e selados com bolinha de algodão apirogênica. As placas contendo os espécimes foram fechadas, seladas com fita adesiva e mantidas em estufa a temperatura de $37\pm1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 100%.

Figura 4.6 – Coleta do conteúdo do canal por meio de seringas de insulina

4.6 VERIFICAÇÃO DA NEUTRALIZAÇÃO DE ENDOTOXINA NO CANAL RADICULAR

Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar, a qual foi primeiramente submetida à desinfecção com álcool 70% e limpeza com água apirogênica. Em seguida, a luz ultravioleta foi ligada e permaneceu atuando por 30 minutos e, posteriormente, a câmara foi forrada com duas camadas de gaze apirogênica.

Foi realizado o teste cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (análise quantitativa) para verificar a neutralização das endotoxinas do sistema de canais radiculares. Esse teste foi realizado em duplicata para as seguintes coletas do conteúdo do canal radicular: imediatamente após a instrumentação (1ª coleta) e após sete dias (2ª coleta); e, imediatamente após a medicação intracanal (3ª coleta) e após sete dias (4ª coleta).

Nos dias do teste, as amostras coletadas do canal radicular foram submetidas à análise quantitativa de LPS pelo método cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (cinético QCL – LAL, Cambrex Bio Science, MD, EUA). Inicialmente foram realizadas diluições da endotoxina padrão de *Escherichia coli* (*Escherichia coli* 055:B5 Endotoxin – Cambrex Bio Science, Walkersville, USA)

em diferentes concentrações que representam os padrões de comparação das amostras (curva-padrão). Para cada amostra, o teste foi realizado em duplicata.

Em uma placa apirogênica de 96 poços, foram adicionados 100 μ L de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas do canal radicular (100 μ L, em duplicata) e os controles positivos (Figura 4.7).

A placa foi incubada no leitor cinético QCL (Cambrex Bio Science, MD, EUA) a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 10 min, o qual estava acoplado a um microcomputador com software Wink QCL específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Após, foram adicionados em cada poço da placa 100 μ L do reagente cinético cromogênico do LAL (Cambrex) (Figura 4.8), com uma micropipeta de 8 canais e ponteiros apirogênicos. Após o início do ensaio cinético, o software da leitora de microplacas monitorou, de forma contínua durante todo o ensaio, a absorbância a 405 nm em cada poço da microplaca. O leitor determinou o tempo necessário para aumentar a absorbância de cada poço a 0,200 unidades de absorbância, que foi denominado tempo de reação. O software WinkQCL calculou uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Na sequência, o resultado (EU/mL) de cada amostra e os parâmetros da curva-padrão foram impressos no formato de relatório.

Os resultados de todos os espécimes foram ao teste de Lilliefors para avaliar a normalidade das amostras. Verificou-se que os dados mostraram-se não aderentes a curva de normalidade, e assim, foram submetidos à análise estatística pelo método não paramétrico de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5% ($p\leq 0,05$), e na presença de diferença estatística, a análise foi complementada pelo teste de Dunn.

Figura 4.7 – Reagentes do teste cinético cromogênico: A: Endotoxina padrão B: Lisado de Amebócito de *Limulus* (LAL); C: água apirrogênica; D: montagem na placa – adição de 100µL de água apirrogênica no primeiro poço (duplicata)

Figura 4.8 – Leitor cinético QCL (A) acoplado ao microcomputador (B). Porção do Leitor cinético onde é inserida a placa e o substrato cromogênico sendo adicionados nos poços com auxílio de micropipeta automática (C).

5 RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os valores obtidos na avaliação da efetividade da solução irrigadora e da medicação intracanal, foram expressos pelo número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) (Figura 5.1).

Figura 5.1 – Crescimento microbiano de *C. albicans* (A), *E. faecalis* (B) e *E. coli* (C) na coleta de confirmação do G1 (diluição 10^{-4})

Os valores médios de UFC/mL (Log10) obtidos de cada espécime dos grupos experimentais, após a coleta de confirmação e as 4 coletas seguintes estão demonstrados nos apêndices (Apêndice A a D), e representados graficamente nas figuras 5.2 a 5.5.

* **1ª. Coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª. Coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª. Coleta:** imediatamente após a MIC; **4ª. Coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

Figura 5.2 – Representação gráfica dos valores médios de UFC/mL (log 10) e desvio padrão de *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans* do Grupo 1 (solução salina) nas diferentes coletas*

Por meio do teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), para comparação de dados pareados de mesma unidade amostral, foi constatado que no grupo controle (solução salina), houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias (UFC/mL) da coleta de confirmação e a coleta, realizada imediatamente após a instrumentação (1ª. coleta), sendo que a média da coleta de confirmação da contaminação foi maior, demonstrando que o preparo químico cirúrgico reduziu significante o número de UFC/mL. Constatou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias da coleta após a instrumentação e da coleta realizada após o período de sete dias da instrumentação. Ocorreu aumento considerável do número de UFC/mL após incubação de sete dias posterior ao preparo químico cirúrgico, podendo-se observar que a redução imediata ao tratamento não se manteve após período de incubação. A diferença entre as médias obtidas na 2ª. coleta e 3ª. coleta não foi estatisticamente relevante ($p > 0,05$). A média de UFC/mL da 3ª. coleta, realizada após período de 14 dias de incubação com medicação intracanal (solução salina - controle), foi maior que a 2ª. coleta, assim como a média de UFC/mL de da 4ª. coleta foi maior que a média da 3ª. coleta, demonstrando que ocorreu recolonização dos microrganismos com o decorrer do tempo. Também se verificou que a partir da 2ª. coleta não houve diferença

estatisticamente com a coleta de confirmação, demonstrando que mesmo sem o acréscimo do caldo BHI, o canal fornece condições para o retorno do número de microrganismos inicial.

* **1ª. Coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª. Coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª. Coleta:** imediatamente após a MIC; **4ª. Coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

Figura 5.3 – Representação gráfica dos valores médios de UFC/mL (log 10) e desvio padrão de *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans* do Grupo 2 (hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio) nas diferentes coletas*

Entre as coletas do G2 dos espécimes que foram tratados segundo técnica FOUSP (hipoclorito de sódio 1% com creme Endo-PTC e hidróxido de cálcio), foi possível observar por meio do teste estatístico que as três cepas se comportaram com os mesmos graus de significância. Verificou-se diferença estatisticamente ($p < 0,00$) entre a coleta de confirmação e a coleta após instrumentação (1ª. coleta), demonstrando redução de 100% dos microrganismos coletados após o preparo químico cirúrgico realizado com a solução irrigadora de hipoclorito de sódio 1% e creme de Endo-PTC. Ao se analisar os dados da coleta realizada após 7 dias do preparo químico cirúrgico (2ª. coleta), observou-se que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a média da 1ª. (imediatamente após o preparo químico cirúrgico) e 2ª. coleta, uma vez que ocorreu a recolonização dos microrganismos no canal radicular. No entanto, a média da 2ª. coleta foi menor que a coleta de confirmação, sendo estatisticamente significantes entre si ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a 3ª. e 4ª. Coletas, onde foi possível observar que mesmo após remoção da medicação e incubação por 7 dias,

não houve aumento estatisticamente relevante do número de UFC/mL dos microrganismos avaliados, mantendo-se a eficácia alcançada no período de incubação com medicação intracanal.

* **1ª. Coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª. Coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª. Coleta:** imediatamente após a MIC; **4ª. Coleta:** após 7 dias da remoção da MIC

Figura 5.4 – Representação gráfica dos valores médios de UFC/mL (log 10) e desvio padrão de *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans* do Grupo 3 (solução de NP-Ag e solução de NP-Ag) nas diferentes coletas*

A análise estatística do grupo 3 demonstrou redução significativa entre a coleta de confirmação e a 1ª. coleta para todos os microrganismos avaliados ($p < 0,05$), sendo que houve eliminação de 100% de *E. coli* e *C. albicans*. *E. faecalis* se mostrou mais resistente. Foi possível observar que houve recolonização dos microrganismos *E. faecalis* e *C. albicans* após o período de incubação. Entretanto, a média da 2ª. coleta foi inferior estatisticamente quando comparada à coleta de confirmação, demonstrando efeito residual. Os resultados da 3ª. coleta revelaram aumento considerável dos três microrganismos avaliados, sendo que a média da 3ª. coleta foi maior e estatisticamente significativa ao compará-la com a 1ª. e 2ª. coletas ($p < 0,05$). Ao comparar as médias da 3ª. e 4ª. coletas observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa, o que demonstra que a solução de NP-Ag não apresentou efeito na profundidade dos túbulos dentinários.

* **1ª. Coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª. Coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª. Coleta:** imediatamente após a MIC; **4ª. Coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

Figura 5.5 – Representação gráfica dos valores médios de UFC/mL (log 10) e desvio padrão de *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans* do Grupo 4 (solução de NP-Ag e hidróxido de cálcio com solução de NP-Ag) nas diferentes coletas*

Por meio dos resultados obtidos no G4, nos quais os espécimes foram tratados com irrigação de solução de NP-Ag e medicados com pasta de hidróxido de cálcio manipulada com solução de NP-Ag, foi possível observar que a solução de NP-Ag promoveu redução estatisticamente significativa na 1ª. coleta quando comparada com os valores da coleta de confirmação ($p < 0,05$), nas três cepas avaliadas, sendo que *E. coli* e *C. albicans* foram totalmente eliminados. Na comparação da coleta realizada após 7 dias do preparo químico cirúrgico (2ª. coleta), observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre a média da 1ª. (imediatamente após o preparo químico cirúrgico) e 2ª. coleta, o que demonstra que a solução de NP-Ag apresentou alguma ação residual. Os resultados da 3ª. coleta demonstraram diferença estatisticamente significativa quando comparado com a 2ª. coleta, uma vez que a medicação eliminou 100% dos microrganismos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a 3ª. e 4ª. coletas, apesar de ter ocorrido o crescimento de *E. faecalis* e *C. albicans* após remoção da medicação e incubação por 7 dias da remoção da medicação intracanal.

Os valores médios de UFC/mL (log10) de *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans*, assim como o desvio-padrão e a formação de grupos homogêneos obtidos em cada

grupo da coleta de confirmação, 1^a. coleta, 2^a. coleta, 3^a. coleta e 4^a. coleta estão representados, respectivamente, nas tabelas 5.1 a 5.5.

Tabela 5.1 - Valores médios de UFC/ mL (Log10) de *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans* $\pm$ desvio padrão obtidos por cada grupo experimental* (n=12) na coleta de confirmação e formação de grupos homogêneos**

	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	GRUPOS HOMOGÊNEOS**
		<i>E. coli</i>	
G1	7,362	0,331	A
G2	7,324	0,586	A
G3	7,890	0,738	A
G4	7,675	0,221	A
		<i>E. faecalis</i>	
G1	7,788	0,317	A
G2	7,584	0,248	A
G3	7,388	0,288	A
G4	7,466	0,215	A
		<i>C. albicans</i>	
G1	6,410	0,526	A
G2	3,618	0,717	B
G3	2,799	0,674	B
G4	3,756	0,108	B

* **G1**: solução salina - controle; **G2**: hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio; **G3**: solução de NP-Ag e solução de NP-Ag; **G4**: solução de NP-Ag e hidróxido de cálcio com NP-Ag.

**letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

Tabela 5.2 - Valores médios de UFC/ mL (Log10) de *E. coli*, *E.faecalis* e *C. albicans* $\pm$ desvio padrão obtidos por cada grupo experimental* (n=12) na 1ª. coleta (imediatamente após o PQC) e formação de grupos homogêneos**

	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	GRUPOS HOMOGÊNEOS**
<i>E. coli</i>			
G1	4,683	0,867	A
G2	0,00	0,00	B
G3	0,00	0,00	B
G4	0,00	0,00	B
<i>E. faecalis</i>			
G1	4,980	0,465	A
G2	0,00	0,00	B
G3	2,419	1,883	C
G4	3,158	0,910	C
<i>C. albicans</i>			
G1	2,378	0,901	A
G2	0,00	0,00	B
G3	0,00	0,00	B
G4	0,598	0,793	B

* **G1**: solução salina - controle; **G2**: hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio; **G3**: solução de NP-Ag e solução de NP-Ag; **G4**: solução de NP-Ag e hidróxido de cálcio com NP-Ag.

**letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

Tabela 5.3 - Valores médios de UFC/ mL (Log10) de *E. coli*, *E.faecalis* e *C. albicans* $\pm$ desvio padrão obtidos por cada grupo experimental* (n=12) na 2ª. coleta (7 dias após o PQC) e formação de grupos homogêneos**

	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	GRUPOS HOMOGÊNEOS**
<i>E. coli</i>			
G1	6,763	0,407	A
G2	5,748	0,382	A
G3	4,219	1,946	B
G4	2,607	0,855	B
<i>E. faecalis</i>			
G1	6,384	0,357	A
G2	5,866	1,084	A
G3	4,946	2,249	B
G4	4,434	1,278	B
<i>C. albicans</i>			
G1	5,986	0,495	A
G2	5,613	0,00	A
G3	0,899	1,732	B
G4	1,350	0,478	B

* **G1**: solução salina - controle; **G2**: hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio; **G3**: solução de NP-Ag e solução de NP-Ag; **G4**: solução de NP-Ag e hidróxido de cálcio com NP-Ag.

**letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

Tabela 5.4 - Valores médios de UFC/ mL (Log10) de *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans* $\pm$ desvio padrão obtidos por cada grupo experimental* (n=12) na 3ª. coleta (imediatamente após a remoção da MIC) e formação de grupos homogêneos**

	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	GRUPOS HOMOGÊNEOS**
<i>E. coli</i>			
G1	6,619	0,699	A
G2	0,00	0,00	B
G3	6,277	2,839	A
G4	0,00	0,00	B
<i>E. faecalis</i>			
G1	5,775	0,532	A
G2	0,00	0,00	B
G3	5,920	2,696	A
G4	0,00	0,00	B
<i>C. albicans</i>			
G1	6,703	0,984	A
G2	0,00	0,00	B
G3	6,782	2,081	A
G4	0,00	0,00	B

* **G1**: solução salina - controle; **G2**: hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio; **G3**: solução de NP-Ag e solução de NP-Ag; **G4**: solução de NP-Ag e hidróxido de cálcio com NP-Ag.

**letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante

Tabela 5.5 - Valores médios de UFC/ mL (Log10) de *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans* $\pm$ desvio padrão obtidos por cada grupo experimental* (n=12) na 4ª. coleta (7 dias após a remoção da MIC) e formação de grupos homogêneos**

	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	GRUPOS HOMOGÊNEOS**
<i>E. coli</i>			
G1	6,519	0,699	A
G2	0,00	0,00	B
G3	6,854	0,592	A
G4	0,00	0,00	B
<i>E. faecalis</i>			
G1	5,929	0,532	A
G2	0,000	0,00	B
G3	6,703	1,454	A
G4	1,366	4,369	B
<i>C. albicans</i>			
G1	6,410	1,044	A
G2	0,00	0,00	B
G3	6,132	0,872	A
G4	2,054	2,037	B

* **G1**: solução salina - controle; **G2**: hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio; **G3**: solução de NP-Ag e solução de NP-Ag; **G4**: solução de NP-Ag e hidróxido de cálcio com NP-Ag.

**letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS

Os dados coletados referentes aos valores de endotoxinas foram expressos em unidades de endotoxinas por mililitro (EU/mL) e emitidos diretamente pelo programa de computador QCL. A figura 5.6 ilustra uma placa de 96 poços imediatamente após a leitura do teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL).

Figura 5.6 – Ilustração da placa de 96 poços, acoplada no leitor cinético QCL, imediatamente após a leitura do teste cinético cromogênico LAL

Os valores médios de endotoxinas de *E. coli* obtidos de cada espécime dos grupos experimentais, após o preparo químico cirúrgico e medicação intracanal estão demonstrados no apêndice (Apêndice E a H). As representações gráficas das médias obtidas em cada grupo estão disponíveis nas figuras 5.7 a 5.10.

* **1ª. Coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª. Coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª. Coleta:** imediatamente após a MIC; **4ª. Coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

Figura 5.7 – Representação gráfica dos valores médios de EU/mL (log 10) e desvio padrão de endotoxinas de *E. coli* obtidos no Grupo 1 (solução salina) nas diferentes coletas*

Por meio do teste estatístico de Kruskal-Wallis (5%), para comparação de dados pareados de mesma unidade amostral, foi constatado que no grupo controle dos espécimes instrumentados e medicados com solução salina não houve diferença estatisticamente significativa entre a coleta após a instrumentação (1ª. coleta) e após 7 dias de incubação (2ª. coleta), sendo o valor da média da 2ª. coleta maior que a 1ª. coleta, demonstrando que o tratamento da instrumentação não reduziu o número de EU/mL. No entanto, após 14 dias (3ª. coleta), correspondente ao período da medicação, houve aumento da média que foi diferente estatisticamente significativa ao comparar com a 2ª coleta ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias da quantidade de endotoxina obtida na 3ª. coleta e 4ª. coleta.

* **1ª. Coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª. Coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª. Coleta:** imediatamente após a MIC; **4ª. Coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

Figura 5.8 – Representação gráfica dos valores médios de EU/mL (log 10) e desvio padrão de endotoxinas de *E. coli* obtidos no Grupo 2 (hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio) nas diferentes coletas*

Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias obtidas na 1ª. e 2ª. coletas, sendo que a média da 2ª. coleta foi maior que a da 1ª. coleta. Esses resultados demonstraram que o hipoclorito de sódio não apresentou capacidade de neutralizar endotoxinas. No entanto, a média obtida na 3ª. coleta foi bem menor e diferente estatisticamente dos valores da média da 1ª. e 2ª. coletas, demonstrando que o hidróxido de cálcio foi efetivo em neutralizar endotoxinas, até mesmo após 7 dias de incubação, já que a média entre a 4ª e 3ª. coletas não apresentaram diferença estatística entre si.

* **1ª. Coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª. Coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª. Coleta:** imediatamente após a MIC; **4ª. Coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

Figura 5.9 – Representação gráfica dos valores médios de EU/mL (log 10) e desvio padrão de endotoxinas de *E. coli* obtidos no Grupo 3 (solução de NP-Ag e solução de NP-Ag) nas diferentes coletas*

Na comparação entre os valores da média encontrados no grupo instrumentado e medicado com solução de NP-Ag pode-se observar que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias da quantidade de endotoxina obtida na 1ª. coleta e 2ª. coleta, sendo que a média da 2ª. coleta foi maior que a 1ª. coleta, demonstrando que a instrumentação aumentou o número de EU/mL. Constatou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias da quantidade de endotoxina da 2ª. coleta e 3ª. coleta, sendo que a média da 2ª. coleta foi maior que a média da 3ª. coleta, demonstrando que após o período de medicação (3ª. coleta) houve diminuição considerável da quantidade de endotoxina, quando comparado com a 2ª. coleta, no entanto, sem diferença estatística ao compará-la a 1ª. coleta. A diferença entre as médias obtidas na 3ª. coleta e 4ª. coleta foi estatisticamente relevante ($p < 0,05$),

* **1ª. Coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª. Coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª. Coleta:** imediatamente após a MIC; **4ª. Coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

Figura 5.10 – Representação gráfica dos valores médios de EU/mL (log 10) e desvio padrão de endotoxinas de *E. coli* obtidos no Grupo 4 (solução de NP-Ag e hidróxido de cálcio com NP-Ag) nas diferentes coletas*

A análise estatística das médias obtidas no grupo instrumentado com solução de NP-Ag e medicado com pasta de hidróxido de cálcio manipulada com solução de NP-Ag demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias da quantidade de endotoxina obtida na 1ª. coleta e 2ª. coleta, sendo que a média da 2ª. coleta foi maior que a 1ª. coleta, demonstrando que o tratamento com instrumentação aumentou o número de EU/mL. Constatou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias da quantidade de endotoxina da 2ª. coleta e a 3ª. coleta, sendo que a média da 3ª. coleta, foi menor que a média da 2ª. coleta, o que denota redução considerável da quantidade de endotoxina após o período de medicação com hidróxido de cálcio. Na análise comparando-se a 3ª. coleta e 4ª. coleta foi possível observar diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), sendo que a média da quantidade de endotoxina na 4ª. coleta foi menor, demonstrando que a neutralização de endotoxina alcançada na 3ª. coleta se manteve após remoção da medicação intracanal e incubação de sete dias, além de ter alcançado uma diminuição tardia do número de endotoxinas nesse período.

Os valores médios de endotoxinas (EU/mL – log 10), desvios-padrão e formação de grupos homogêneos obtidos por cada grupo nas 4 coletas estão apresentados nas tabelas 5.6 a 5.9.

Tabela 5.6 - Valores médios obtidos da quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL - log 10), desvio padrão e formação de grupos homogêneos* obtidos na 1ª. coleta (imediatamente após o PQC) nos diferentes grupos**

Grupos	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	GRUPOS HOMOGÊNEOS**
G1	3,497	0,248	A
G2	4,008	0,404	AB
G3	4,690	0,598	B
G4	4,578	0,754	B

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante

** **G1**: solução salina - controle; **G2**: hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio; **G3**: solução de NP-Ag e solução de NP-Ag; **G4**: solução de NP-Ag e hidróxido de cálcio com NP-Ag.

Os dados foram analisados pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (5%). Na primeira coleta, realizada após a instrumentação observou-se homogeneidade entre os resultados das soluções irrigadoras com atividade antimicrobiana (G2, G3 e G4), e esses grupos demonstraram diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com a média obtida no grupo instrumentado com solução salina (G1).

Tabela 5.7 - Valores médios obtidos da quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL - log 10), desvio padrão e formação de grupos homogêneos* obtidos na 2ª. coleta (7 dias após o PQC) nos diferentes grupos**

Grupos	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	GRUPOS HOMOGÊNEOS**
G1	3,533	0,248	A
G2	5,402	0,292	B
G3	6,196	0,824	BC
G4	5,407	0,449	B

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante

** **G1**: solução salina - controle; **G2**: hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio; **G3**: solução de NP-Ag e solução de NP-Ag; **G4**: solução de NP-Ag e hidróxido de cálcio com NP-Ag.

Os resultados analisados estatisticamente da tabela 5.15 denotam que houve diferença significativa entre os grupos. A pasta de hidróxido de cálcio manipulada em solução salina apresentou a menor média dos valores de EU/mL, sendo

estatisticamente diferente dos demais grupos avaliados ($p < 0,05$). Entre as médias obtidas nos três grupos experimentais (G2, G3 e G4), não se constatou diferença estatisticamente significativa entre si.

Tabela 5.8 - Valores médios obtidos da quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL - log 10), desvio padrão e formação de grupos homogêneos* obtidos na 3ª. coleta (após remoção da MIC) nos diferentes grupos**

Grupos	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	GRUPOS HOMOGÊNEOS**
G1	4,954	0,181	AD
G2	2,308	0,367	B
G3	5,071	0,577	CD
G4	4,194	0,533	C

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

** **G1**: solução salina - controle; **G2**: hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio; **G3**: solução de NP-Ag e solução de NP-Ag; **G4**: solução de NP-Ag e hidróxido de cálcio com NP-Ag.

Aplicando-se a análise estatística na terceira coleta, pôde-se verificar que houve diferença significativa entre os grupos (tabela 5.16). O grupo G2 (medicado com hidróxido de cálcio manipulado em solução salina) apresentou a menor média, estatisticamente diferente dos demais grupos (G1, G3 e G4). O grupo G4 (hidróxido de cálcio manipulado com solução de NP-Ag) demonstrou média maior que G2, sendo diferentes estatisticamente entre si ($p < 0,05$) e média inferior ao G1, sendo também diferente estatisticamente ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre a média do G3 (medicado com solução de NP-Ag) e o G4 (hidróxido de cálcio manipulado com solução de NP-Ag).

Tabela 5.9 - Valores médios obtidos da quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL - log 10), desvio padrão e formação de grupos homogêneos* obtidos na 4ª. coleta (7 dias após remoção da MIC) nos diferentes grupos**

Grupos	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	GRUPOS HOMOGÊNEOS**
G1	4,852	0,286	A
G2	2,996	0,837	B
G3	5,238	0,876	A
G4	3,352	0,674	B

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

** **G1**: solução salina - controle; **G2**: hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio; **G3**: solução de NP-Ag e solução de NP-Ag; **G4**: solução de NP-Ag e hidróxido de cálcio com NP-Ag.

Na quarta coleta, observou-se que a média do G2 foi menor e diferente estatisticamente quando comparada a média do G1 ($p < 0,05$), demonstrando que o hidróxido de cálcio permaneceu efetivo após o período de incubação. Da mesma forma, o grupo G4 (hidróxido de cálcio manipulado com solução de NP-Ag), foi estatisticamente significativo ao compará-lo com o G1 ($p < 0,05$) e, sem diferença estatística ao compará-lo ao G2 (hidróxido de cálcio manipulado com solução salina). A solução de NP-Ag utilizada como medicação intracanal (G3) não apresentou diferença estatística com a média do grupo controle (G1), sendo diferente dos demais grupos (G2 e G4).

6 DISCUSSÃO

Esta pesquisa *in vitro* objetivou testar se a solução de nanopartículas de prata, utilizada como solução irrigante e medicação intracanal, seria capaz de promover o controle microbiano e a inativação das endotoxinas no interior do canal radicular. Assim, para a execução da parte experimental foram utilizadas raízes de dentes humanos para reproduzir o mais próximo possível as condições clínicas. Com relação a padronização das amostras, as coroas foram seccionadas de forma a se obter o comprimento de trabalho em 16 mm (Maekawa, 2007) e o canal radicular foi instrumentado inicialmente até o comprimento de trabalho com lima tipo Kerr nº. 30 para padronizar o tamanho do canal (Oliveira et al., 2007b). Também como forma de padronização dos espécimes, os ápices radiculares foram vedados e a superfície externa foi impermeabilizada a fim de impedir a saída dos microrganismos e endotoxinas, assim como dos agentes irrigantes e mediações intracanal (Oliveira et al., 2007b).

O modelo experimental dos dentes fixados em placa de células foi baseado no estudo de Oliveira et al. (2007b) e os dentes foram posicionados nos poços externos a fim de facilitar a instrumentação e prevenir a contaminação entre os espécimes.

Um ponto de relevância para a execução desse experimento diz respeito à preparação dos espécimes e do material a serem utilizados. Com o intuito de evitar qualquer interferência nas leituras de quantificação da endotoxina, todo material utilizado no experimento foi esterilizado com irradiação de Gama-Co⁶⁰ na dose de 20 kGy por 6h (protocolo da empresa EMBRARAD – Empresa Brasileira de Radiação). Segundo Csako et al. (1983) a irradiação é capaz de destruir a porção polissacarídica e alterar o Lipídio A, principal responsável pela toxicidade do LPS.

O protocolo de contaminação do canal radicular foi de 28 dias para que se formasse um biofilme em profundidade, situação frequentemente encontrada na clínica e de difícil eliminação pelos agentes antimicrobianos (Socransky; Haffajee, 2002; Estrela et al., 2009). Após diferentes tentativas de inoculação dos três microrganismos utilizados neste estudo, Molina (2008) relatou que se inoculasse primeiramente *E. coli* e após 7 dias adicionar-se-ia *E. faecalis* e *C. albicans*. O tempo de contaminação de 21 dias para as cepas *E. faecalis* e *C. albicans* foram suficiente

para penetrar profundamente nos túbulos dentinários (microscopia eletrônica de varredura) (Menezes et al., 2004).

O volume do agente irrigante utilizado a cada troca de lima foi baseado na recomendação de Leonardo (2005), que determinou a utilização de, no mínimo, 2,4 mL de solução irrigadora, após o uso de cada instrumento. Dessa forma, neste estudo, optou-se pela utilização de 3 mL de solução irrigadora (Oliveira et al., 2007b; Maekawa, 2007; Molina, 2008).

A utilização de solução salina apirogênica na irrigação final após a utilização dos agentes químicos (NP-Ag, hipoclorito de sódio, EDTA e Hidróxido de cálcio) foi devido a preocupação em se remover íons quelantes residuais que poderiam realizar ligações químicas com endotoxinas interferindo no teste cinético utilizado, além de eliminar resíduos químicos que pudessem interferir nas propriedades antimicrobianas (Archilla, 2007).

Nenhum agente inibidor da atividade antimicrobiana dos irrigantes químicos foi utilizado, pois não foi encontrado na literatura um redutor para ser utilizado nos grupos que receberam as nanopartículas de prata. Além disso, Maekawa (2007) verificou em estudo piloto, que a falta desse inibidor não alterou a reação do teste de lisado de amebócitos de *Limulus*.

E. faecalis é um microrganismo Gram-positivo, anaeróbio facultativo, que resiste a ambientes inóspitos. Sua maior prevalência nos humanos é no trato gastrointestinal. Apesar de não fazerem parte da microbiota tipicamente comensal da cavidade oral, *E. faecalis* pode ser identificado no canal radicular (Aas et al., 2005). Até pouco tempo, acreditava-se que esses microrganismos raramente se encontravam nas infecções primárias, no entanto, a identificação de microrganismos por meio do método molecular PCR, verificou que sua presença é freqüente, variando entre 7,5% (Siqueira et al., 2002), 15% (Blome et al., 2008) e 60% (Foschi et al. 2005). A maioria dos autores acredita que *E. faecalis* penetram no canal por meio de selamento coronário deficiente (Siqueira; Rôças, 2004; Chávez de Paz; Molander; Dahlén, 2004; Nair 2006), e relacionam a infiltração como principal causa da contaminação. Outros autores acreditam que a instrumentação do canal radicular promove destruição do equilíbrio do ecossistema existente, resultando em ambiente propício para o desenvolvimento dos microrganismos mais resistentes (Sundqvist et al., 1979; Sundqvist, 1992; Siqueira, 1997). No entanto, mais recentemente, Zehnder e Guggenheim (2009) questionaram a via de contaminação de *E. faecalis* no canal

radicular e sugeriu ser a alimentação a via mais provável de entrada desse microrganismo na cavidade oral e, posteriormente, no canal radicular.

Apesar do questionamento da via de contaminação de *E. faecalis* no canal radicular, é de consenso na literatura que são os microrganismos mais prevalentes nos casos de infecção secundária (Molander et al., 1998; Hancock et al., 2001; Chavez de Paz et al., 2003; Pinheiro et al., 2003; Rôças et al., 2004; Foschi et al., 2005; Gomes et al., 2008) e resistentes à terapia endodôntica (Siqueira, 1997; Ferrari; Cai; Bombana, 2005; Vivacqua-Gomes et al., 2005), motivo pelo qual esse microrganismo foi selecionado nesse trabalho.

Candida albicans foi selecionada para o estudo por ser a espécie de levedura mais comumente isolada em casos de necrose pulpar em infecção primária ou em casos de insucesso do tratamento (Waltimo et al., 1997; Siqueira; Sen, 2004; Rôças et al., 2004; Oliveira; Cardoso; Jorge, 2007). Ademais, estudos relatam sua resistência aos agentes rotineiramente utilizados como irrigantes e medicações intracanal (Rosa, 2008; Câmara et al., 2009) .

Neste experimento foram utilizadas cepas viáveis de *E. coli* para avaliar a neutralização de endotoxina, uma vez que endotoxinas são liberadas durante a replicação e morte da célula, e a quantidade de endotoxinas coletada do canal radicular ao final dos 28 dias de contaminação reflete a quantidade coletada em estudos *in vivo* (Jacinto et al., 2005). O microrganismo *E. coli* foi selecionado devido possuir uma endotoxina padrão, utilizada na maioria dos trabalhos científicos (Haight-Ponce; Endo; Horiuchi, 1999; Oliveira et al., 2005; Oliveira et al., 2007b; Archilla, 2007). Além disso, sabe-se que todas endotoxinas produzem os mesmos sinais e sintomas, independente da espécie do microrganismo, embora não na mesma intensidade (Madigan; Martinko; Parker, 2006).

A escolha do método cinético cromogênico de avaliação de neutralização de endotoxinas deveu-se a sua maior sensibilidade (0,005 EU/mL) e à capacidade de quantificação, diferindo do outro método disponível, o *gel clot* (0,03; 0,06; 0,125; 0,25 EU/mL), que possui baixa sensibilidade e apresenta apenas um resultado semiquantitativo por possuir valores predeterminados.

O *Limulus* é constituído por um lisado dos amebócitos circulantes de cavalos marinhos que, quando exposto a quantidades pequenas de endotoxinas, aumenta sua opacidade bem como sua viscosidade, tornando-se um gel duro (Levin; Bang, 1968). Esses autores demonstraram que a formação do coágulo era resultado de

uma reação enzimática entre a endotoxina e uma proteína coagulável na circulação do amebócito de *Limulus*. Assim, pelo método QCL cinético do LAL, a endotoxina da bactéria Gram-negativa catalisa a ativação de uma pré-enzima em enzima. A enzima ativada catalisa a clivagem do substrato sintético Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNa em peptídeo (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg) e p-nitroanilina (pNa), de coloração amarela. A pNa transformada durante a reação é medida fotometricamente a 405 nm continuamente durante o período de incubação (37°C). A concentração de endotoxina da amostra foi calculada a partir de seu tempo de reação por comparação ao tempo de reação das soluções-padrão contendo quantidades conhecidas de endotoxina.

Com o crescente uso das nanopartículas de prata e de seus produtos nas diversas áreas da indústria de materiais e nos diversos campos da medicina, tornou-se interessante avaliar sua eficácia como agente irrigante do canal radicular durante a terapia endodôntica, além de sua ação como medicação intracanal, sendo assim considerada a substância experimental desse trabalho.

Na literatura, não há um consenso dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) da solução de nanopartículas de prata. Chopra (2007) questionou essas divergências e constataram que mesmo os trabalhos que seguiram os parâmetros estabelecidos pela *National Commitee for Clinical Laboratory Standads* (NCCLS, Pennsylvania, USA) e pelo Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobianos (EUCAST) demonstraram resultados diferentes. Para o autor, a alta dosagem utilizada do produto (70-100 ppm) se justifica pelo receio de administrar subdoses e estimular o aparecimento de microrganismos resistentes.

Salmonella typhimurium e algumas enterobactérias já foram identificadas como resistentes às nanopartículas de prata (Russell; Hugo, 1994; Gupta et al., 1999; Silver; Phung; Silver, 2006). Acredita-se que o mecanismo responsável por essa resistência seja mediada por plasmídios e tranposons (Russell; Hugo, 1994). Entretanto, nota-se que o desenvolvimento dessa resistência é incomum frente ao amplo uso da prata no tratamento de queimados e feridas e o uso contínuo de cateteres revestidos por prata (Chopra, 2007).

Baseados no mesmo número inicial de microrganismos (aproximadamente 100 UFC) Ug et al. (2003), O'Neill e Chopra (2004) e Hamilton-Miller, et al. (1993), obtiveram valores de CIM entre 8 a 80 mg/L para *S. aureus*. Da mesma forma, porém com outro parâmetro de medida, Berger et al. (1976) e Thibodeau, Handelsman e Marquis (1978) obtiveram os valores entre 0,68 ppm e 20 ppm. Sondi

e Salopek-Sondi (2004) sugeriram que os diferentes resultados estão relacionados com as diferentes metodologias empregadas, já que os constituintes do meio de cultura podem influenciar nos efeitos dos íons de prata sobre os microrganismos.

A concentração avaliada no presente estudo foi de 50 ppm, sendo um valor intermediário entre as concentrações relatadas na literatura e com base em estudo piloto realizado previamente. A solução teste foi produzida a partir de uma corrente elétrica de 5 μ A, que demonstrou gerar nanopartículas de prata com maior capacidade antimicrobiana (Thibodeau; Handelman; Marquis, 1978).

Um fator de preocupação do uso da prata está relacionado com a possibilidade de causar Argiria (intoxicação pela prata). No entanto, se utilizado em concentração adequada, essa NP-Ag se mostra eficaz e sem risco de causar complicações em humanos (Oliveira, 2006). Outro fator questionado na área odontológica é a possibilidade de manchamento pela prata. Todavia, a prata produzida por nanotecnologia resulta em um líquido amarelo transparente. Nesse trabalho não se constatou nenhum escurecimento ou manchamento durante as etapas do preparo químico cirúrgico e da medicação intracanal.

Vários estudos demonstraram que as soluções irrigadoras mais utilizadas, como o hipoclorito de sódio e a clorexidina, em diversas concentrações não neutralizam LPS (Tanomaru et al., 2003; Oliveira et al., 2007b; Silva et al., 2002; Silva et al., 2004), entretanto o hidróxido de cálcio e o antibiótico polimixina B proporcionaram bons resultados (Safavi; Nichols, 1993; 1994; Oliveira et al., 2005; Oliveira et al., 2007b).

O hipoclorito de sódio 1% foi selecionado por ser a solução irrigadora de escolha da maioria dos clínicos, por apresentar excelentes efeitos antimicrobianos (Mentz, 1982; Siqueira et al., 2000; Sassone et al., 2003; Câmara et al., 2009), capacidade de dissolução tecidual (Thé, 1979; Pécora, Souza-Neto; Estrela, 1999, Siqueira, 2004), e saponificação de gorduras, propriedades que potencializam a limpeza nas paredes dos canais radiculares. Além disso, promovem aumento da permeabilidade do canal radicular (Paiva; Antoniazzi, 1988, Lage-Marques; Antoniazzi, 2002; Gavini; Aun; Akisue, 1996).

Sugere-se que concentrações mais elevadas do hipoclorito de sódio resultam em maior efetividade antimicrobiana (Oliveira et al., 2007a; 2007b), apesar de outros autores não demonstrarem diferença estatisticamente significativa (Siqueira et al., 2000; Sassone et al., 2003). Não se pode esquecer que o aumento da concentração

promove também um aumento do potencial tóxico da solução aos tecidos periapicais (Bombana et al., 1974). Assim, nesse estudo, a concentração de 1% foi selecionada por ser clinicamente efetiva e, por estar associada ao creme Endo-PTC que potencializa sua eficiência antimicrobiana (Wey Filho et al., 1975; Lage-Marques; Antoniazzi, 2002), protege o tecido periapical, por conter em sua composição o Carbowax, e lubrifica o canal, facilitando a instrumentação (Técnica Endodôntica FOUSS – Lage-Marques; Antoniazzi, 2002). Além disso, essa associação aumenta a permeabilidade dentinária (Robazza et al., 1987; Carreira; Ferreira; Lage-Marques, 2004; Ferreira; Carvalho; Lage-Marques, 2005; Souza; Amorim; Lage-Marques, 2005), resultando em maior penetração da medicação nos túbulos dentinários.

Os resultados desse trabalho demonstraram que a instrumentação realizada com a associação do hipoclorito de sódio e creme Endo-PTC promoveu redução de 100% dos três microrganismos avaliados ($p < 0,05$). Os mesmos resultados, com o uso de hipoclorito de sódio, podem ser verificados em diversos trabalhos (Siqueira et al., 2000; Estrela et al., 2003; Ferrari; Cai; Bombana, 2005). No entanto, na coleta seguinte, após o período de incubação de 7 dias, notou-se recolonização dos três microrganismos no canal radicular. Dessa forma, pode-se concluir que a associação hipoclorito de sódio 1% e creme Endo-PTC provavelmente não apresenta ação em profundidade nos túbulos dentinários. Resultado clínico semelhante, com recolonização de microrganismos em 100% dos dentes instrumentados com solução de hipoclorito de sódio 0,5% e creme Endo-PTC foram relatados por Ferreira, Cai e Bombana (2005). Vahadaty, Pitt Ford e Wilson (1993) demonstraram que o hipoclorito de sódio e a clorexidina são capazes de desinfetar a dentina apenas nos primeiros 100 μm , a contar da luz do canal radicular. Apesar da alta eficácia do hipoclorito de sódio, o mesmo não consegue eliminar por completo a contaminação intracanal, principalmente no interior dos túbulos dentinários (Buck et al., 2001; Siqueira et al., 2002; Nair et al., 2005). Assim, confirma-se a importância da fase de medicação intracanal nos dentes com polpa necrosada e com biofilme complexo formado em toda extensão dos túbulos dentinários.

A obtenção de cultura negativa não significa esterilidade e sim limitações do protocolo experimental, já que as amostras são obtidas a partir do canal principal. Assim, outras regiões do sistema de canais radiculares não são alcançadas durante o procedimento de amostragem. Além disso, podem existir microrganismos em níveis abaixo da sensibilidade do método de cultura. Por isso, se adicionou uma

coleta após a instrumentação e outra após a remoção da medicação, decorridos o período de 7 dias de incubação. Essa etapa permitiu a verificação da viabilidade dos microrganismos presentes no interior dos túbulos dentinários.

O hidróxido de cálcio manipulado com solução salina utilizado como medicação intracanal (grupo 2) resultou em eliminação total dos microrganismos que recolonizaram o canal e sua efetividade persistiu pelo período seguinte de incubação de 7 dias, demonstrando que a pasta de hidróxido de cálcio atua também nos microrganismos encontrados no interior dos túbulos dentinários.

Com relação ao efeito do hidróxido de cálcio sobre as endotoxinas, essa pasta resultou nos melhores resultados, sendo diferente estatisticamente das demais substâncias avaliadas e do grupo controle (solução salina). Esses resultados concordam com outros autores que utilizaram a mesma metodologia (Oliveira et al., 2005; Maekawa., 2007; Molina, 2008) ou metodologias diferentes (Safavi; Nichols, 1993; Safavi; Nichols, 1994).

Os resultados demonstraram que embora tenha ocorrido redução significativa de endotoxinas, nenhum espécime apresentou eliminação total do número endotoxinas, diferindo dos resultados de Maekawa (2007).

Os resultados obtidos nesse trabalho diferem do trabalho de Oliveira et al. (2007b), que demonstrou, por meio do teste de LAL, aumento de endotoxinas em todos espécimes após o período de incubação de 7 dias. Além disso, em teste complementar com linfócitos B, os autores relataram que a quantidade de endotoxina restante foi capaz de ativar linfócitos B.

O hidróxido de cálcio é o único medicamento intracanal, utilizado rotineiramente na clínica, com capacidade de inativar a endotoxina à distância, tanto nos estudos *in vitro* quanto *in vivo* (Safavi; Nichols, 1994; Barthel et al., 1997; Silva et al., 2002; Jiang et al., 2003; Tanomaru et al.; 2003; Oliveira et al., 2005; Oliveira et al., 2007b). Essa propriedade está relacionada com sua característica alcalina, que provoca hidrólise do lipídio A convertendo-o em ácidos graxos e açúcares atóxicos. Sabendo-se de sua eficácia, esta medicação foi selecionada neste estudo a fim de atuar como controle.

Outra propriedade de igual importância desempenhada pelo hidróxido de cálcio é sua capacidade de neutralizar os ácidos lipoteicoicos, maior fator de virulência das bactérias Gram-positivas, como *E. faecalis* (Baik et al., 2008). Essa inativação resulta na atenuação da resposta inflamatória para *E. faecalis*.

Apesar de alguns autores relatarem que o hidróxido de cálcio não aumenta a redução dos microrganismos após o preparo químico cirúrgico (Blome et al., 2008; Vianna et al., 2007; Sakamoto et al., 2007), sua utilização é fundamental para neutralizar o ácido lipoteicoico (Baik et al., 2008), e para neutralizar endotoxinas (Tanomaru et al., 2003; Oliveira et al., 2007b, Molina, 2008), principal fator de virulência das bactérias Gram-negativas.

Diversas são as associações de substâncias antimicrobianas com o hidróxido de cálcio, a fim de potencializar sua ação. A associação com hipoclorito de sódio ou clorexidina ampliaram sua efetividade antimicrobiana (Zehnder et al., 2003), assim como sua associação com a clorexidina aumentou sua eficiência em neutralizar endotoxinas (Oliveira et al., 2007b).

Diante desses resultados favoráveis, este trabalho teve por objetivo associar ao hidróxido de cálcio nanopartículas de prata, a fim de avaliar possível efeito sinérgico da associação. O resultado da associação do hidróxido de cálcio à solução de NP-Ag não foi tão eficaz quanto esperado, apesar de terem reduzido a quantidade de endotoxinas comparado ao grupo com solução salina ($p < 0,05$) e à coleta anterior realizada no mesmo grupo. Por outro lado, seus resultados demonstram que essa pasta não foi tão eficiente quanto à pasta de hidróxido de cálcio manipulada com solução salina ($p < 0,05$), demonstrando superioridade na pasta de hidróxido de cálcio manipulada com solução salina.

O motivo desse resultado talvez esteja relacionado com a possibilidade de ter ocorrido alguma reação química entre os componentes dessa mistura, já que ao final da manipulação, a pasta gerada apresentava coloração acinzentada, sendo que o hidróxido de cálcio P.A. é branco e a solução de NP-Ag é amarelo transparente.

Outro resultado desfavorável observado na associação do hidróxido de cálcio à solução de NP-Ag foi a coleta de *E. faecalis* e *C. albicans* nos canais de alguns espécimes na coleta final (após 7 dias da remoção da medicação intracanal), fato que não ocorreu com a pasta manipulada com solução salina. No entanto, existem diversos relatos na literatura referente à resistência desses microrganismos ao hidróxido de cálcio (El Karim; Kenndy; Hussey, 2007; Gomes et al., 2006; Waltimo et al., 1997).

A solução de NP-Ag, utilizada como agente irrigante conseguiu eliminar 100% de *E. coli* e *C. albicans* após o preparo químico cirúrgico nos dois grupos (G3 e G4), no entanto, *E. faecalis* demonstrou-se mais resistente a NP-Ag, apesar da solução

ter promovido redução estatisticamente significativa em comparação com o grupo controle (solução salina) ($p < 0,05$). Resultados similares quanto a efetividade sobre *E. coli* foram observados por outros autores (Sondi, Salopepk-Sondi, 2004, Li et al, 2006; Yoon et al., 2007), assim como sobre *C. albicans* (Carreira et al., 2009). No entanto, quando NP-Ag foram avaliadas sobre biofilme de *E. faecalis* e *C. albicans* pouco efeito antimicrobiano foi encontrado sobre ambos os microrganismos avaliados (Toledo et al., 2009).

Deve-se ressaltar uma propriedade interessante da solução de NP-Ag verificada nesse trabalho, a capacidade de efeito residual. Em todos os demais grupos, a recolonização do canal após o preparo químico cirúrgico resultou em números semelhantes ao encontrados na coleta de confirmação. Já nos grupos instrumentados com o auxílio de NP-Ag essa recolonização ocorreu, porém em proporção menor e diferente estatisticamente ($p < 0,05$) da coleta de confirmação.

Até o momento da conclusão desse trabalho, nenhum relato sobre o efeito da solução de NP-Ag sobre endotoxinas foi encontrado. Os resultados mostraram que em todas as situações avaliadas, se irrigante ou se medicação intracanal, a solução de NP-Ag não apresentou efeito sobre a redução de endotoxinas.

Da mesma forma, o hipoclorito de sódio associado ao creme Endo-PTC utilizado durante a instrumentação não conseguiram neutralizar endotoxinas. Estes resultados concordam com outros estudos que também verificaram que o preparo biomecânico com solução de hipoclorito de sódio não é suficiente para inativar endotoxina (Buttler; Crawford, 1982; Silva et al., 2004; Oliveira et al., 2007b), sendo necessária a complementação da ação com medicações intracanaís.

A solução de NP-Ag, utilizada como medicação intracanal não foi capaz de manter a diminuição dos microrganismos promovida pela instrumentação. Os resultados obtidos após sua remoção demonstraram valores de UFC/ mL similares aos encontrados na coleta de confirmação.

Os resultados demonstraram que a instrumentação realizada com agentes com propriedades antimicrobianas (hipoclorito de sódio e NP-Ag) foi responsável por uma eliminação de 100% e 80,1% dos microrganismos avaliados, respectivamente. No entanto, a instrumentação realizada com solução salina foi capaz de reduzir apenas 42,2%. Outros estudos demonstram que o emprego de substâncias químicas dotadas de atividade antimicrobiana, durante o preparo dos canais radiculares, exerce um efeito significativo na eliminação de bactérias (Ingle; Zeldow,

1958; Machtou 1980; Lopes; Siqueira, 1999). Assim, enquanto uma solução desprovida de ação antimicrobiana (solução salina) apenas ajuda na lubrificação do canal radicular, a solução que reconhecidamente possui atividade antimicrobiana resulta em efeito adicional, representado pela eliminação ou máxima redução de microrganismos não removidos mecanicamente.

Outro resultado interessante quanto ao efeito das soluções irrigadoras com propriedades antimicrobianas está relacionado com a quantidade de endotoxina liberada após o período de incubação da instrumentação. Verificou-se que na 2ª. coleta a quantidade de endotoxina aumentou significativamente para o grupo do hipoclorito de sódio 1% e para o grupo da NP-Ag. Isto comprova que o preparo biomecânico com hipoclorito de sódio ou NP-Ag elimina completamente *E. coli* dos canais radiculares e, conseqüentemente há um aumento das endotoxinas, que são liberadas com a morte da bactéria.

Apesar da limitação do método desse trabalho, pode-se entender que as culturas negativas obtidas ao final da instrumentação e medicação seriam suficientes para proporcionarem níveis compatíveis com a cura dos tecidos periapicais. Assim, a partir dos resultados obtidos nesse estudo, pode-se valorizar o uso de um agente irrigante que apresente propriedades antimicrobianas e de uma medicação que atue em profundidade, complementando a etapa do preparo químico cirúrgico. Desta forma, aumenta-se a chance de um melhor prognóstico do tratamento endodôntico. Portanto, é justo supor que o uso rotineiro de medicação intracanal como o hidróxido de cálcio aqui utilizado, pode ser necessário para obter uma alta incidência de culturas negativas e menores quantidades de endotoxina antes da obturação e melhorar o resultado do tratamento endodôntico.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- A solução de hipoclorito de sódio 1% associada ao Endo-PTC foi efetiva sobre *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans* imediatamente após a instrumentação. Após 7 dias, houve recolonização dos três microrganismos, em níveis semelhantes à coleta de confirmação;
- A solução de nanopartículas de prata promoveu redução total de *E. coli* e *E. faecalis* e foi efetiva sobre *C. albicans* na leitura imediatamente após o preparo químico cirúrgico. Após 7 dias houve recolonização, no entanto em níveis bem menores que na coleta de confirmação;
- Hipoclorito de sódio 1% e solução de nanopartículas de prata não promoveram neutralização significativa de endotoxinas durante a instrumentação dos canais radiculares;
- O hidróxido de cálcio, tanto manipulado com solução salina quanto com solução de nanopartículas de prata, promoveu eliminação total dos microrganismos avaliados, assim como diminuiu significativamente a quantidade de endotoxinas, comparado ao grupo controle;
- Dentre os protocolos avaliados notou-se que os melhores resultados foram obtidos quando o tratamento do canal radicular foi realizado com hipoclorito de sódio associado ao creme Endo-PTC e medicado com hidróxido de cálcio;
- Nenhum protocolo de tratamento avaliado neutralizou totalmente endotoxinas do canal radicular.

REFERÊNCIAS¹

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora in cavity oral. J Clin Microbiol. 2005;43:5721-32.
- Ahn S-J, Lee S-J, Kook J-K, Lim B-S. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. Dent Mater. 2009;25(2):206-13.
- Archilla JRF. Ação do laser de Nd:YAG intracanal sobre endotoxinas na dentina radicular. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2007.
- Baik JE, Kum K-Y, Yun C-H, Lee J-K, Lee K, Kim KK, Han SHH. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2008;34(11):1355-9.
- Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF- α realease in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. Int Endod J. 1997;30(3):155-9.
- Berger TJ, Spadaro AJ, Chapin SE, Becker RO. Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells. Antimicrob Agents Chemother. 1976;9:357-8.
- Blome B, Braum A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol. 2008;23:384-90.
- Bombana AC, Paiva JG, Alvares S, Antoniazzi JH. Reação inflamatória do olho de coelho que se segue à instalação de alguns fármacos de uso endodôntico. Rev Assoc Paul Cirurg Dent. 1974;28(4):216-23.
- Buck RA, Elcazer PD, Staat RH, Scheetz JP. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tublar depths in human dentin. J Endod. 2001;27:206-8.
- Buttler TK, Crawford JJ. The detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypochlorite on endotoxins. J Endod. 1982;8(2):59-66.
- Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorofenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. Endod Dent Traumatol. 1985;1(5):170-5.
- Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0,5% sodium hupochorite in endodontic therapy. Oral Surg Oral Med, Oral Pathol. 1983;55:307-12.
- Byström A, Sundqvist G. the antibacterial action of sodium hypoclorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. Int Endod J. 1985;18:35-40.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

- Câmara AC, Albuquerque MM, Aguiar CM, Correia ACRB. In vitro antimicrobial activity of 0,5%, 1%, and 2,5% sodium hypochlorite in root canals instrumented with the ProTaper Universal System. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108:55-61.
- Cardoso MG, Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105:e85-e91.
- Carreira CM, Ferreira MB, Lage-Marques JL. Ação das substâncias químicas do preparo do sistema endodôntico: análise da invasão terapêutica [resumo Pa72]. *Pesqui Odontol Bras.* 2004;18 Supl:119.
- Carreira CM, Oliveira LD, Koga-Ito C, Lage-Marques JL, Bombana AC, Jorge AOC. Avaliação da efetividade de diferentes medicações de uso intracanal sobre *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* [resumo Pc68]. *Pesqui Odontol Bras.* 2007;21 Supl:29.
- Carreira CM, Pereira CA, Oliveira LD, Bombana AC, Jorge AOC. Ação desinfetante das nanopartículas de prata sobre fungos, esporos e bactérias[resumo PNd056]. *Braz Oral Res.* 2009; 23Supl:257.
- Chávez de Paz LE, Dahlén G, Molander A, Moller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J.* 2003;36(7):500-8.
- Chávez de Paz LE, Molander A, Dahlén G. Gram-positive rods prevailing in teeth with periodontitis undergoing root canal treatment. *Int Endod J.* 2004;37:579-87.
- Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett.* 2008;176(1):1-2.
- Choi O, Deng K K, Kim N-J, Ross L Jr, Surampalli R Y, Hu Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res.* 2008; 42:3066-74.
- Chopra I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a case for concern? *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:587-90.
- Csako G, Elin RJ, Hochstein HD, Tsai CM. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infect Immunol.* 1983;41(1):190-6.
- Cunningham WT, Joseph SW. Effect of temperature on the bactericidal action of sodium hypochlorite endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1980;50(6):569-71.
- Dahlén G, Magnusson BC, Moller A. Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Fusobacterium nucleatum* on the

periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*. *Arch Oral Biol*. 1981;26(7):591-8.

Dwyer TG, Torabinejad M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. *J Endod*. 1981;7(1):31-5.

El-Karim I, Kenndy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103(4):560-9.

Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Hollanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J*. 2007;40:85-93.

Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pécora JD, Souza-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J*. 2003;14(1):58-62.

Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JAP, Estrela CRA. antibacterial efficacy of intracanal medicaments on bacterial biofilm: a critical review. *J Appl Oral Res*. 2009;17(1):1-7.

Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Moller AJ. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res*. 1982;90(3):200-6.

Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Int Endod J*. 2005;38:372-80.

Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC. Periodontite apical secundária. In: Mary Caroline Skelton Macedo e Raphael Baudacci Filho. *Book do 25o CIOSP - Procedimentos Odontológicos*. São Paulo: Ed Santos; 2007. p. 343-54.

Ferrari PHP. Detecção de microrganismos oportunistas em pacientes soropositivos para o HIV e portadores de infecção endodôntica primária. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2004.

Ferreira MB, Carvalho EMOF, Lage-Marques JL. Avaliação da limpeza dos canais radiculares utilizando creme e gel Endo PTC como substância química auxiliar. *RPG*. 2005; 12:32-7.

Fishbine G. *The investor's guide to nanotechnology & micromachines*. New York: John Wiley & Sons, Inc; 2002.

Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20:289-95.

Furno F, Morley KS, Wong B, Sharp BL, Arnold PL, Howdle SM, Baystrom R, Brown PD, Winship PD, Reid HJ. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? *J Antimicrobial Chemot*. 2004;54:1019-24.

- Gavini G, Aun CE, Akisue E. Influência da camada residual de magma no selamento apical de dentes obturados com cones de guta-percha e cimento N-Rickert. RPG. 1996;3(3):250-5.
- Gemmell CG, Edwards DI, Fraise AP et al. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. J Antimicrob Chemother. 2006;57:589-608.
- Gogoi SK, Gopinath P, Paul A, Ramesh A, Ghosh SS, Chattopadhyay A. Green Fluorescent Protein-Expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. Langmuir. 2006;22:9322-8.
- 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;37(1):76-81
- Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho JF. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. J Endod. 2008;34(5):537-40.
- Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Molecular analysis of *Fillifactor alocis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infection and failed endodontic treatment. J Endod. 2006;32(10):937-40.
- Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. Int Endod J. 1996;29(4):69-75.
- Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental in root canals. Oral Microbiol Immunol. 2004;19(2):71-6.
- Gupta A, Matsui K, Lok JF, Silver S. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. Nat Med. 1999;5(2):183-8.
- Gupta A, Maynes M, Silver S. Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 1998;64(12):5042-5.
- Haight-Ponce E, Endo H, Horiuchi H. Endotoxin activity measured by limulus assay. Endod Dent Traumatol. 1999;15(3):109-12.
- Hamilton-Miller JM, Shah S, Smith C. Silver Sulphadiazine: a comprehensive in vitro reassessment. Chemotherapy. 1993;39(6):405-9.
- Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 2001;91(5):579-86.
- Herreira M, Carrion P, Baca P, Liebana J, Castilho A. In vitro antibacterial activity of glass-ionomer cements. Microbios. 2001;104(409):141-8.

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991;71(4):492-5.

Horiba N, Maekawa Y, Matsumoto T, Nakamura H. A study of the distribution of Endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. *J Endod*. 1990;16(7):331-4.

Hosoya S, Matsushima K. Stimulation of interleukin-1 beta production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *J Endod* 1997;23(1):39-42.

Ingle JI, Zeldow BJ. An evaluation of mechanical instrumentation and the negative culture in endodontic therapy. *J Am Dent Assoc*. 1958;57:471-6.

Jacinto RC, Gomes BFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol*. 2005;54:777-83.

Jacinto RC, Gomes BFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *Int Endod J*. 2006;39(1):62-70.

Jiang J, Zuo J, Chen SH, Holliday LS. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95(3):348-54.

Jiang Y, Mehta CK, Hsu TY, Alsulaimani FF. Bacteria induce osteoclastogenesis via an osteoblast-independent pathway. *Infect Immun*. 2002;70(6):3143-8.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965;20:340-9.

Klasen HJ. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns*. 2000;26:117-30.

Kong H, Jang J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir*. 2008;24:2051-6.

Kong H, Jang J. One-step fabrication of silver nanoparticle embedded polymer nanofibers by radical-mediated dispersion polymerization. *Chem Commun*. 2006;28(28):3010-2.

Kreth J, Kim D, Nguyen M, Hsiao G, Mito R, Kang MK, Chugal N, Shi W. The antimicrobial effect of silver ion impregnation into endodontic sealer against *Streptococcus mutans*. *Open Dent J*. 2008;2:18-23.

Lage-Marques JL, Antoniazzi JH. Versão eletrônica da técnica endodôntica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. São Paulo: Ajna Interactive Ltda, 2002. CD-ROM.

Lee HY, Park HK, Lee YM, Kim K, Park SB. A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical applications. *Chem Commun.* 2007;28:2959-61.

Leonardo MR, Silva LAB, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci.* 2004;12(2):93-8.

Leonardo MR, Silveira FF, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Utrilla LS. Calcium hydroxide root canal dressing. Histopathological evaluation of periapical repair at different time periods. *Braz Dent J.* 2002;13(1):17-22.

Leonardo MR. Endodontia: tratamento dos canais radiculares: princípios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes Médicas; 2005.

Levin J, Bang FB. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh.* 1968;31(1):186-97.

Li Y, Leung P, Yao L, Song QW, Newton E. Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles. *J Hosp Infec.* 2006;62:58-63

Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Wu WY, Sun H, et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res.* 2006;5:916-24.

Lok C-N, Ho C-M, Chen R, He Q-Y, Yu W-Y, Sun H, Tam PK-H, Chiu J-F, Che C-M. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem* 2007;12: 527-34.

Lopes HP, Siqueira Jr JF. Endodontia: biologia e técnica. Rio de Janeiro: Medsi; 1999. 650p.

Machtou P. L'irrigation em endodontie. *Actual Odonto Stomatol.* 1980;34(131):387-94.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock biology of microorganisms. 11a ed. Upper Saddle River: Prentice Hall; 2006.

Maekawa LE. Avaliação *in vitro* da ação de substâncias químicas auxiliares e medicações intracanaís sobre *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares[dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2007.

Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki S, Tsuchido T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(7):4278-81.

Mattison GD, Haddix JE, Kehoe JC, Progulske-Fox A. The effect of *Eikenella corrodens* endotoxina on periapical bone. *J Endod.* 1987;13(12):559-65.

Maynard AD. Nanotechnology: the next big thing, or much ado about nothing? *Ann Occup Hyg.* 2007;51(1):1-12.

Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MNG. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J*. 2004;37(5):311-9.

Mentz TCF. The use of sodium hypochlorite as general endodontic medicament. *Int Endod J*. 1982;15(3):132-6.

Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1998;31(1):1-7.

Molina FP. Associação de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Escherichia coli* em canais radiculares e avaliação dos efeitos de extratos naturais sobre os microrganismos e endotoxinas [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2008.

Muray CA, Saunders WP. Root canal treatment and general health: a review of the literature. *Int Endod J*. 2000;33(1):1-18.

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

Nair PNR. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J*. 2006;39:249-81.

Nissan R, Segal H, Pasthley D, Stevens R, Trowbridge H. Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin. *J Endod* 1995;21(2):62-4.

O'Neill AJ, Chopra I. Preclinical evaluation of novel antibacterial agents by microbiological and molecular techniques. *Expert Opin Investig Drugs*. 2004;13(8):1045-63.

Oliveira DP, Barbizam JVB, Trope M, Teixeira FB. In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *E. faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007a;103(5):702-6.

Oliveira EMN. Trabalho de conclusão de curso. Departamento de química. UFSC. 2006

Oliveira LD, Carvalho CAT, Jorge AOC. Microrganismos causadores de infecções pulpares e periapicais. In: Jorge AOC Microbiologia bucal. 3 ed. São Paulo: Santos; 2007. Cap. 9, p.127-42.

Oliveira LD, Jorge AOC, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Valera MC. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007b;104:135-42.

Oliveira LD, Leão MVP, Carvalho CAT, Camargo CHR, Valera MC, Jorge AOC, Unterkircher CS. In vitro effects of hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. J Dent. 2005;33:107-14.

Paiva JG, Antoniazzi JH. Endodontia: bases para a prática clínica 2ª ed. São Paulo: Artes Médicas;1988.

Paiva JG, Antoniazzi JH. O uso de uma associação de peróxido de uréia e detergente (Tween 80) no preparo químico mecânico dos canais radiculares. Rev Assoc Paul Cirurg Dent. 1973;27(7):416-23.

Panáček A, Kvítek L, Pucek R, Kolár M, Vecerová R, Pizúrová N, Sharma V, Nevečná T, Zhoril R. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. J Phys Chem B. 2006;110(33):16248-56.

Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals. Endod J. 2000;26(10):593-5.

Pécora JD, Sousa-Neto MD, Estrela C. Soluções irrigadoras auxiliares do preparo do canal radicular. In: Endodontia – Princípios biológicos e mecânicos. Estrela C, Figueiredo JAP. Eds. São Paulo: Artes Médicas; 1999. p 552-69.

Pelczar M, Reid R, Chan ECS. Microbiologia. 2 ed. São Paulo: McGraw-Hill; 1980. p.439-516.

Pesce H, Medeiros JMF, Bombana AC. Influence of the use of endo PTC on the periapical seal of root canal. Braz Endod J. 1997;2(1):29-33.

Pesce HF, Medeiros JMF, Haddad JE. Influência, no pós-operatório, da concentração do hipoclorito de sódio utilizado quando do esvaziamento do canal radicular. Odontologia USF. 1995;13:7-14.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Souza-Filho FJL. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J. 2003;36(1):1-11.

Pitts DL, Williams BL, Morton TH JR. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. J Endod. 1982;8(1):10-8.

Prince WR, Wood M. Silver nitrate burn dressing. Treatment of seventy burned persons. Am J Surg. 1966;112:674-80.

Raisz LG, Nuki K, Alander CB, Craig RG. Interactions between bacterial endotoxin and other stimulations of bone resorption in organ culture. J Periodontal Res. 1981;16(1):1-7.

Rattanaengsriikul V, Pimpha N, Supaphol P. Development of gelatin hydrogel pads as antibacterial wound dressing. Macromol Biosci. 2009;9(10):1004-15.

Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. Scientific American. 1992;267:26-33.

- Robazza CRC, Costa WF, Pécora JD, Antoniazzi JH, Paiva JD. Avaliação da permeabilidade dentinária radicular apical segundo a quantidade de instrumentos empregados durante o preparo químico mecânico. *Rev Bras Odontol.* 1987;44(1):20-5.
- Rôças IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira Jr JF. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean Population. *J Endod* 2004;30(7):504-8.
- Rosa FCS. Eficácia da instrumentação associada á terapia fotodinâmica antimicrobiana e medicação intracanal na eliminação de biofilmes e na neutralização de endotoxinas em canais radiculares [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2008.
- Russell AD, Hugo WB. Antimicrobial activity and action of silver. *Prog Med Chem.* 1994;31:351-70.
- Sabeti M, Slots J. Herpesviral-bacterial coinfection in periapical patholosis. *J Endod.* 2004;30:69-72.
- Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod.* 1994;20(3):127-9.
- Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod.* 1993;19(2):76-8.
- Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Bacterial recuction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22:19-23.
- Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23:275-81.
- Santangelo R, D'ercole S, Graffro R et al. Bacterial and viral DNA in periodontal disease: a study using multiplex PCR. *New Microbiol.* 2004;27:133-7.
- Sassone LM, Fidel RA, Fidel SR, Dias M, Hirata RJ. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test. *Braz Dent J.* 2003;14(2):99-102.
- Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically invoved teeth. *J Endod.* 1975;1(1):19-21.
- Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;78(5):634-45.
- Shovelton DS. The presence and distribution of micro-organisms wiyhin non-vital teeth. *Br Dent J.* 1964;117(3):101-7.
- Silva LAB, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J.* 2004;15(2):109-114.

Silva LAB, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Sossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin "in vivo". J Endod. 2002;28(2):94-8.

Silver S, Phung LT, Silver G. Silver as biocides in burn and wound dressing and bacterial resistance to silver compounds. J Ind Microbiol Biotechnol. 2006;33:627-34.

Siqueira EL. Dissolução de tecido pulpar bovino por duas composições químicas utilizadas em Endodontia. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia; 2004.

Siqueira EL. Estabilidade química da solução de hipoclorito de sódio a 0,5% p/v Dissolução de tecido pulpar bovino por duas composições químicas utilizadas em Endodontia. [Dissertado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia; 2000.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2,5% and 5,25% sodium hypochlorite. J Endod. 2000;26(6):331-4.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Moraes SR, Santos KR. Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root infections. Int Endod J. 2002;35:345-51.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Paiva SS, Magalhães KM, Guimarães-Pinto T. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. Oral Microbiol Immunol. 2007;22(4):266-71.

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;97(1):85-94.

Siqueira JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;97(5):632-41.

Siqueira JF Jr. Tratamento das infecções endodônticas. Rio de Janeiro: MEDSI; 1997. Cap 3, p. 31-51.

Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological finding and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. Int Endod J. 1997;30(2):91-5.

Slots J, Kamma JJ, Sugar C. The herpesvirus-*Porphyromonas gingivalis*-periodontitis axis. J Periodontol Res. 2003;38(3):3118-23.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002; 28:12-55.

Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. J Colloid Interface Sci. 2004;275:177-82.

Souza EB, Amorim CVG, Lage-Marques JL. Avaliação de permeabilidade dentinária relacionada à dinâmica de substâncias químicas auxiliares do preparo dos canais radiculares. *RPG*. 2005;12(2):195-8.

Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An *in vitro* evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J*. 2001;34:300-7.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(1):86-93.

Sundqvist G. Ecology of root canal flora. *J Endod*. 1992;18(9):427-30.

Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994; 78(4):522-30.

Sundqvist GK, Eckerbom MI, Larsson AP, Sjogren UT. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect Immun*. 1979;25(2):685-93.

Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanimaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LAB. Effect of different irrigation solutions and calcium hidroxide on bacterial LPS. *Int Endod J*. 2003;36:733-9.

Tanomaru JMG, Rodrigues VMT, Tanomaru Filho M, Spolidorio DMP, Ito IY. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras empregadas em Endodontia. *Rev Paul Odontol*. 2005;27(1):38-40.

Thé SD. A solvent action of sodium hypochlorite on fixed and unfixed necrotic tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1979;47(6):558-61.

Thibodeau EA, Handelsman SL, Marquis RE. Inhibition and Killing of Oral Bacteria by Silver Ions Generated with Low Intensity Direct Current. *J Dent Res*. 1978;57(9-10): 922-6.

Thomas V, Yallapu M.M., Sreedhar B., Bajpai S.K. A versatile strategy to fabricate hydrogel-silver nanocomposites and investigation of their antimicrobial activity. *J Colloid Interface Sci*. 2007;315:389-95.

Toledo BC, Di Iorio FB, Pereira CA, Carreira CM, Junqueira JC, Machado AK, Jorge AOC. Avaliação de soluções desinfetantes sobre biofilmes formados *in vitro* por *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* [resumo Pa018] *Anais do IV CEAJO- Congresso de Ex-alunos e Jornada Odontológica*. 2009. p. 40.

Tronstat L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol*. 1990;6(2):73-7.

Ug A, Ceylan O. Occurrence of resistance to antibiotics, metals, and plasmids in clinical strains of *Staphylococcus* spp. *Arch Med Res*. 2003;34:130-6.

- Vahadaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endod Dent Traumatol*. 1993;9:243-8.
- Vianna ME, Horz H-P, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbial Immunol*. 2007;22:411-8.
- Vivacqua-Gomes N, Gurgel Filho ED, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth ex vivo. *Int Endod J*. 2005;38(10):697-704.
- Walker A. A definite and dependable therapy for pulpless teeth. *J Am Dent Assoc*. 1936;23(2):1418-25.
- Waltimo TMT, Siren EK, Torkko HL, Olsen I, Haapalaso MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997;30(2):96-101.
- Wesselink PR, Thoden Van Velzen SK, Makkes PC. Release of endotoxin in an experimental model simulating the dental root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1978;45(5):789-95.
- Wey Filho R, Aun CE, Paiva JG, Rezende E. Efeito antimicrobiano in vitro de algumas substâncias químicas auxiliares do preparo químico mecânico do canal, utilizadas na desinfecção de canais radiculares (Contribuição ao estudo). *Rev Ass Paul Cir Dent*. 1975;29:40-7.
- Yoon K-Y, Byeon JH, Park J-H, Hwang J. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Sci Total Environ*. 2007;373:572-5.
- Yoshida K, Tanagawa M, Atsuta M. Characterization and inhibitory effect of antibacterial dental resin composites incorporating silver-supported materials. *J Biomedical Mater Res*. 1999;15(47):516-22.
- Yoshida K, Tanagawa S, Matsumoto T, Yamada M, Atsuta M. Antibacterial activity of resin composites with silver-containing materials. *Eur J Oral Sci*. 1999; 107(4):290-6.
- Zehnder M, Grawehr M, Hasselgren G, Waltimo T. Tissue-dissolution capacity and dentin-disinfecting potential of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;96(5):608-13.
- Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod*. 2006;32(5):389-98.
- Zendher M, Guggenheim B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canal. *Inter Endod J*. 2009;42:277-87.
- Zhang Y, Peng H, Huang W, Zhou Y, Yan D. Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*. 2008;325:371-6.

APÊNDICE A - Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans* obtidos por cada espécime do Grupo 1 (controle, n=12) em todas as coletas*

	Confirmação	1ª. Coleta	2ª. Coleta	3ª. Coleta	4ª. Coleta
<i>Escherichia coli</i>					
1	7,176	6,648	6,418	7,013	7,455
2	7,845	5,496	6,638	6,520	5,290
3	7,000	4,925	6,327	6,820	6,784
4	7,881	4,631	6,309	6,991	5,782
5	7,782	3,544	6,595	7,067	6,653
6	7,574	5,337	6,807	6,312	7,193
7	7,204	4,246	6,260	6,097	6,141
8	7,290	3,942	7,008	6,332	6,312
9	7,161	5,041	7,154	6,322	5,591
10	7,114	4,278	6,939	6,649	6,724
11	7,389	3,792	7,456	6,615	7,224
12	6,929	4,320	7,301	6,699	7,076
<i>Enterococcus faecalis</i>					
1	7,312	5,765	6,348	5,633	5,613
2	7,929	5,678	6,145	5,928	6,246
3	7,591	4,707	6,499	6,144	6,175
4	8,079	4,743	6,180	5,533	5,041
5	8,002	4,412	6,315	6,093	5,462
6	8,371	5,541	6,471	6,107	6,846
7	7,580	5,091	5,712	5,544	6,252
8	7,782	4,534	7,121	6,135	6,301
9	7,760	4,865	6,305	5,079	5,146
10	7,362	4,508	6,112	5,862	5,993
11	8,092	4,784	6,676	5,772	5,785
12	7,602	5,138	6,724	5,473	6,286
<i>Candida albicans</i>					
1	6,225	3,301	4,906	5,695	6,175
2	5,911	2,653	5,576	6,544	6,055
3	4,845	1,699	5,664	6,695	5,810
4	5,217	2,176	5,894	7,115	5,525
5	6,207	2,398	6,271	6,782	6,102
6	6,236	3,407	6,455	7,464	7,643
7	5,484	2,602	5,965	6,755	6,519
8	5,431	3,061	5,966	7,723	7,438
9	5,686	0,000	6,168	5,418	4,544
10	4,845	2,544	5,730	6,640	6,459
11	6,303	2,000	6,783	6,773	6,473
12	5,756	2,699	6,452	6,836	8,183

* **1ª. Coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª. Coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª. Coleta:** imediatamente após a MIC; **4ª. Coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

APÊNCICE B - Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans* obtidos por cada espécime do Grupo 2 (hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio, n=12) em todas as coletas*

	Confirmação	1ª. Coleta	2ª. Coleta	3ª. Coleta	4ª. Coleta
<i>Escherichia coli</i>					
1	6,491	0,00	5,730	0,00	0,00
2	8,117	0,00	5,512	0,00	0,00
3	6,820	0,00	6,274	0,00	0,00
4	7,872	0,00	5,320	0,00	0,00
5	7,301	0,00	6,106	0,00	0,00
6	7,942	0,00	5,332	0,00	0,00
7	7,380	0,00	5,531	0,00	0,00
8	7,255	0,00	6,115	0,00	0,00
9	6,243	0,00	5,964	0,00	0,00
10	7,618	0,00	5,362	0,00	0,00
11	7,079	0,00	5,431	0,00	0,00
12	7,769	0,00	6,302	0,00	0,00
<i>Enterococcus faecalis</i>					
1	7,677	0,00	4,079	0,00	0,00
2	7,431	0,00	7,451	0,00	0,00
3	7,337	0,00	5,064	0,00	0,00
4	7,602	0,00	5,919	0,00	0,00
5	7,618	0,00	6,594	0,00	0,00
6	7,993	0,00	5,297	0,00	0,00
7	7,238	0,00	3,916	0,00	0,00
8	8,017	0,00	6,117	0,00	0,00
9	7,643	0,00	6,122	0,00	0,00
10	7,667	0,00	6,784	0,00	0,00
11	7,512	0,00	6,739	0,00	0,00
12	7,279	0,00	6,303	0,00	0,00
<i>Candida albicans</i>					
1	2,699	0,00	5,126	0,00	0,00
2	3,778	0,00	5,791	0,00	0,00
3	3,000	0,00	5,782	0,00	0,00
4	3,699	0,00	5,540	0,00	0,00
5	3,699	0,00	5,619	0,00	0,00
6	3,130	0,00	5,691	0,00	0,00
7	3,699	0,00	5,553	0,00	0,00
8	3,051	0,00	5,427	0,00	0,00
9	3,000	0,00	5,778	0,00	0,00
10	5,017	0,00	5,758	0,00	0,00
11	3,477	0,00	5,605	0,00	0,00
12	4,021	0,00	5,686	0,00	0,00

* **1ª. Coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª. Coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª. Coleta:** imediatamente após a MIC; **4ª. Coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

APÊNDICE C - Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans* obtidos por cada espécime do Grupo 3 (solução de NP-Ag e solução de NP-Ag, n=12) em todas as coletas*

	Confirmação	1ª. Coleta	2ª. Coleta	3ª. Coleta	4ª. Coleta
		<i>Escherichia coli</i>			
1	7,690	0,00	0,00	0,00	0,00
2	8,485	0,00	0,00	0,00	1,683
3	7,484	0,00	0,00	6,173	6,697
4	7,810	0,00	0,00	6,991	7,543
5	7,954	0,00	0,00	6,707	7,027
6	7,866	0,00	0,00	0,00	0,00
7	5,415	0,00	0,00	6,088	6,977
8	7,869	0,00	0,00	5,611	7,097
9	7,648	0,00	0,00	6,431	6,995
10	7,484	0,00	0,00	6,301	6,868
11	8,197	0,00	0,00	3,352	5,344
12	7,079	0,00	0,00	0,00	0,00
		<i>Enterococcus faecalis</i>			
1	7,407	2,176	5,089	0,00	1,366
2	7,255	0,00	0,00	0,00	0,00
3	7,243	0,00	0,00	0,00	0,00
4	7,371	0,00	0,00	0,00	0,885
5	6,243	0,00	0,00	0,00	5,734
6	7,176	0,00	0,00	4,301	7,467
7	7,491	2,477	5,875	6,816	6,881
8	7,690	0,00	0,00	5,255	6,188
9	7,512	3,243	5,182	5,813	6,198
10	7,041	1,699	4,525	5,455	7,039
11	7,332	1,699	1,699	6,310	6,025
12	7,672	2,929	2,699	5,423	3,405
		<i>Candida albicans</i>			
1	3,021	0,00	2,699	3,699	4,121
2	2,000	0,00	4,426	2,903	5,254
3	2,000	0,00	0,00	5,919	6,354
4	3,176	0,00	0,00	7,058	7,432
5	3,653	0,00	0,00	7,010	7,340
6	3,477	0,00	0,00	1,699	3,311
7	4,161	0,00	0,00	7,188	7,345
8	2,000	0,00	4,875	6,681	7,611
9	2,699	0,00	4,982	6,613	6,981
10	2,000	0,00	0,00	7,353	7,883
11	2,699	0,00	2,699	6,456	7,127
12	2,699	0,00	2,000	5,589	6,681

* **1ª. Coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª. Coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª. Coleta:** imediatamente após a MIC; **4ª. Coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

APÊNDICE D - Valores médios de UFC/mL (log 10) de *E. coli*, *E. faecalis* e *C. albicans* obtidos por cada espécime do Grupo 4 (solução de NP-Ag e hidróxido de cálcio com solução de NP-Ag, n=12) em todas as coletas*

	Confirmação	1ª. Coleta	2ª. Coleta	3ª. Coleta	4ª. Coleta
<i>Escherichia coli</i>					
1	5,477	0,00	2,455	0,00	0,00
2	7,851	0,00	1,916	0,00	0,00
3	7,736	0,00	1,743	0,00	0,00
4	7,602	0,00	1,260	0,00	0,00
5	8,045	0,00	2,164	0,00	0,00
6	8,060	0,00	0,00	0,00	0,00
7	8,122	0,00	2,176	0,00	0,00
8	8,194	0,00	1,584	0,00	0,00
9	7,674	0,00	0,00	0,00	0,00
10	7,525	0,00	1,812	0,00	0,00
11	7,968	0,00	2,176	0,00	0,00
12	7,838	0,00	4,066	0,00	0,00
<i>Enterococcus faecalis</i>					
1	4,845	2,397	4,093	0,00	3,361
2	7,703	3,332	4,061	0,00	0,00
3	7,816	3,176	5,973	0,00	2,301
4	7,638	3,748	5,114	0,00	0,00
5	7,585	2,845	4,196	0,00	0,00
6	7,732	4,799	6,250	0,00	4,332
7	7,568	3,371	3,462	0,00	3,041
8	7,651	2,903	3,934	0,00	0,00
9	7,465	3,158	4,434	0,00	3,358
10	7,816	2,000	3,708	0,00	0,00
11	7,848	2,812	3,914	0,00	0,00
12	7,919	3,352	4,068	0,00	0,00
<i>Candida albicans</i>					
1	3,699	0,00	0,00	0,00	2,954
2	5,176	0,00	0,00	0,00	0,00
3	3,000	2,398	2,879	0,00	0,00
4	2,699	0,00	0,00	0,00	4,556
5	3,699	2,477	3,153	0,00	0,00
6	4,415	0,00	0,00	0,00	4,119
7	3,699	1,699	2,367	0,00	3,230
8	3,176	0,00	0,00	0,00	0,00
9	3,753	0,598	2,000	0,00	4,008
10	3,000	0,00	0,00	0,00	0,00
11	5,180	0,00	0,00	0,00	0,00
12	3,544	0,00	0,00	0,00	5,780

* **1ª. Coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª. Coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª. Coleta:** imediatamente após a MIC; **4ª. Coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

APÊNDICE E - Valores médios obtidos da quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL) obtidos em cada espécime do grupo G1*(controle, n=12) nas 4 coletas

	1ª. Coleta	2ª. Coleta	3ª. Coleta	4ª. Coleta
1	5000	5000	119000	44000
2	2920	2810	106000	61200
3	6100	2080	66800	53800
4	1550	2080	77300	41700
5	1880	5000	79800	60000
6	5000	5000	54800	114000
7	2380	9480	79300	100000
8	1440	1460	213000	99700
9	5000	1660	141000	15600
10	3120	2890	45300	132000
11	7390	5000	93600	129000
12	1840	5000	99500	156000

* **1ª. Coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª. Coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª. Coleta:** imediatamente após a MIC; **4ª. Coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

APÊNDICE F - Valores médios obtidos da quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL) obtidos em cada coleta do grupo G2*(hipoclorito de sódio e hidróxido de cálcio, n=12)

	1ª. Coleta	2ª. Coleta	3ª. Coleta	4ª. Coleta
1	9420	55400	78,8	5050
2	11700	231000	168	282
3	18600	458000	1190	519
4	11100	330000	106	1810
5	11700	342000	147	182
6	22300	458000	734	25800
7	16700	140000	118	950
8	847	230000	150	71,6
9	5050	401000	88,2	596
10	16100	140000	347	3120
11	6130	629000	158	76,5
12	29400	195000	324	14800

* **1ª. Coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª. Coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª. Coleta:** imediatamente após a MIC; **4ª. Coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

APÊNDICE G - Valores médios obtidos da quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL) obtidos em cada espécime do grupo G3*(nanopartículas de prata e nanopartículas de prata, n=12) nas 4 coletas

	1ª. Coleta	2ª. Coleta	3ª. Coleta	4ª. Coleta
1	32100	98100	22700	24700
2	500000	1290000	49300	51300
3	109000	1640000	14000	16000
4	276000	1040000	31900	33100
5	78800	1569170	803000	981000
6	50000	10200	6700	6700
7	212000	73400	20700	29300
8	2340	5000000	50100	532000
9	116355	1390000	81400	92300
10	7260	1569170	186000	194000
11	8500	5000000	111000	133000
12	3910	150000	37500	42550

* **1ª. Coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª. Coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª. Coleta:** imediatamente após a MIC; **4ª. Coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

APÊNDICE H - Valores médios obtidos da quantidade de endotoxinas de *E. coli* (EU/mL) obtidos em cada espécime do grupo G4*(nanopartículas de prata e hidróxido de cálcio, n=12) nas 4 coletas

	1ª. Coleta	2ª. Coleta	3ª. Coleta	4ª. Coleta
1	32100	39300	15400	16200
2	500000	1020000	1900	114
3	109000	330000	1760	529
4	276000	204000	3800	1260
5	78800	54400	2440	230
6	50000	303000	6810	222
7	212000	393000	2900	2690
8	2340	173000	50000	715
9	116355	255445	50000	2247
10	7260	126000	17300	1710
11	8500	140000	8520	843
12	3910	27200	26800	212

* **1ª. Coleta:** imediatamente após instrumentação; **2ª. Coleta:** após 7 dias da instrumentação; **3ª. Coleta:** imediatamente após a MIC; **4ª. Coleta:** após 7 dias da remoção da MIC.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR 261694
Protocolo 83/2009

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa “Avaliação in vitro do controle da infecção e da neutralização de endotoxinas presentes em canais radiculares por nanopartículas de prata”, de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Claudia de Moura Carreira, de responsabilidade do(a) Prof.(a) Dr.(a.) Antonio Carlos Bombana.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em “cd”. Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 22 de outubro de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO B – Certificado de Esterilização por radiação Gama-cobalto – EMBRARAD

Tecnologia em Esterilização

EMPRESA BRASILEIRA DE RADIAÇÕES LTDA.

AV. CRUZADA BANDEIRANTE, 290 - COTIA - SP

C.N.P.J 45.789.724/0002-85

REGISTRO MS 926/81

CLIENTE.....: CLAUDIA DE MOURA CARREIRA
CERTIFICADO N.: 182357 - EMITIDO EM 11/08/2009

PROCESSADO EM : 04/08/2009

MATERIAL PROCESSADO:

QUANT.	PRODUTO	LOTE
--------	---------	------

1	CX MATERIAL DIVERSOS LABORATORIO////	
	PONTEIRA DE PIPETA AUTOMATICA/TUBOS EPP////	
	/FALCON/GAZE/LUVA/LIMAS ENDODONTICAS////	
	PINCAS/EXPLORADORES.////	

DOSE: 20 KGY

MATERIAL REFERENTE SUA NF: 019278 DE 03/08/2009

CERTIFICAMOS QUE O MATERIAL ACIMA DESCRITO FOI PROCESSADO
ATRAVES DE RAIOS GAMA E REMETIDO ATRAVES DE NOSSA N.F. 019771.

SISTEMA DE MEDIDA DOSIMETRICA RED PERSPEX 4034.
O MATERIAL E' CONSIDERADO PROCESSADO DESDE QUE INVIOLADAS
AS EMBALAGENS.

FERNANDO REICHMANN

Responsável Técnico