

Juliana Nicolielo

“Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de ésteres orgânicos derivados do óleo de mamona”

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Bioengenharia

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice

São Carlos

2008

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus pais, **Norival** e **Ângela**, por todo amor e todo o exemplo. Vocês me ensinaram a importância de acreditar em meus sonhos e foram indispensáveis para que eles se tornassem realidade.

Á minha irmã **Ana Paola** por toda ajuda na realização deste trabalho e pelo incentivo nos momentos mais difíceis. Seu apoio foi fundamental e encorajador.

Ao meu irmão **Rafael** pelo carinho, amizade e por toda a alegria que traz para minha vida. Você é muito especial.

Ao meu amor, **Pablo**, pelo companheirismo e compreensão. Por me fazer sentir amada todos os dias. Por nunca medir esforços para me ajudar.

Meu amor... Sempre!!!

Agradecimento especial

Ao Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice, pela confiança e pela oportunidade de realização deste trabalho.

Meu muito obrigada!

Agradecimento especial

Ao Prof. Dr. Sérgio Aparecido Torres. Por me receber de braços abertos e por ter me orientado em tudo o que foi necessário para a realização deste trabalho. Toda a sua atenção e dedicação foram indispensáveis para que eu pudesse chegar até aqui.

Minha eterna gratidão!

Agradecimento especial

Ao Prof. Dr. Salvador Claro Neto. Pelas orientações e incentivo.
Pela transmissão dos conhecimentos necessários para a realização
deste trabalho.

Meu reconhecimento!

À Minha avó, **Norma**, por ter me recebido em sua casa com todo o amor do mundo! Você é uma avó maravilhosa!

À **Tia Marta** e **Tio Ivo**, por terem acreditado tanto no meu sucesso e serem sempre meus incentivadores. Não há palavras para agradecer tudo o que fizeram por mim.

Aos meus primos **Ana Letícia**, **Victor** e **João** pelos momentos de diversão e alegria.

Aos meus sogros, **Helena** e **Mário** pelo convívio maravilhoso e por serem tão especiais.

Às minhas sempre amigas **Máira**, **Graziela** e **Karine** por fazerem parte de minha vida há tanto tempo e em tantos momentos especiais.

Aos amigos de Faculdade e Centrinho, **Aline**, **Ana**, **Celene**, **Lígia**, **Tati**, **Kazuza**, **Marcelo**, **Fábio** e **Elisa** pelos bons momentos que passamos juntos.

Agradeço também:

Ao **Prof. Dr. Sebastião Luiz Aguiar Greghi**, da Faculdade de Odontologia de Bauru, por ter colaborado tão brilhantemente para minha formação acadêmica.

Ao **André**, funcionário do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru pela participação em todas as etapas laboratoriais deste trabalho. Sem sua ajuda nada seria possível. Muito obrigada.

À **Dalva**, do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, pela atenção dispensada.

À **Janete** e a todos os colegas do **Departamento de Bioengenharia da USP São Carlos** pela grande ajuda e atenção.

Ao **Toninho** e a todos do **Instituto de Química da USP - São Carlos** pela disponibilidade e apoio.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

NICOLIELO, J. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de ésteres orgânicos derivados do óleo de mamona.** 2008. 97f. Dissertação de Mestrado- Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

O acúmulo e metabolismo de microorganismos na cavidade oral são considerados as principais causas das cáries, doenças periodontais, infecções endodônticas, infecções periimplantares e estomatites. Tanto no tratamento da periodontite quanto de infecções endodônticas soluções irrigadoras com atividade antimicrobiana podem ser utilizadas, juntamente com terapias mecânicas, com o intuito de eliminar ou diminuir o número de microorganismos e assim colaborar com a erradicação do processo infeccioso. Vários tipos de soluções têm sido indicadas e utilizadas na irrigação de bolsas periodontais e canais radiculares e a pesquisa de novos agentes e soluções justifica-se pela importância de se aliar a maior ação antimicrobiana com a menor toxicidade possível. O objetivo do presente estudo foi avaliar “*in vitro*” a ação antimicrobiana de ésteres orgânicos derivados do óleo de mamona sobre os microorganismos *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, utilizando como controle positivo a solução de digluconato de clorexidina a 2%. O experimento utilizou os métodos de difusão em ágar e de microdiluição em caldo. No teste de difusão em ágar a mistura de ésteres derivados do óleo de mamona parcialmente hidratado inibiu o crescimento das bactérias Gram-positivas *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Endoquil® e Perioquil® exibiram halos inibitórios frente à bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis*. No teste de microdiluição em caldo as mesmas bactérias foram utilizadas para avaliação da diluição inibitória máxima (DIM) das soluções estudadas. Na placa de 96 poços a mistura de ésteres derivados do óleo de mamona parcialmente hidratado apresentou atividade antimicrobiana sobre as bactérias gram-positivas *Enterococcus faecalis* (DIM 128), *Staphylococcus aureus* (DIM 1024), *Staphylococcus epidermidis* (DIM 32768) e para a levedura *Candida albicans* (DIM 512). Endoquil® e Perioquil® não exibiram ação antimicrobiana. Ao transferir-se uma alíquota de cada orifício da placa de microdiluição para tubos, pode-se verificar que, em alguns casos, a DIM foi menor que a observada na placa. Nestas situações, concluiu-se que as soluções apresentaram na placa, em menores diluições, ação bactericida e em diluições elevadas, ação bacteriostática.

Palavras-chave: Óleo de Rícino. Microbiologia.

ABSTRACT

NICOLIELO, J. **In vitro evaluation of the antimicrobial activity of Castor-oil based irrigants** 2008. 97f. Master's Dissertation- Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

The accumulation and metabolism of microorganisms in the mouth are considered the main causes of the caries, periodontal diseases, endodontic infections, periimplantar infections and stomatitis. Solutions with antimicrobial activity, together with mechanical therapies, can be used in the treatment of periodontal diseases and endodontic infection to eliminate or reduce the number of microorganisms and thus collaborate with the eradication of the infectious process. Different types of solutions have been indicated and used in the irrigation of periodontal pockets and radicular canals. The research of new agents and solutions is justified because the importance of finding a solution with the highest antimicrobial action and the least possible toxicity. The purpose of this study was to evaluate *in vitro* the antimicrobial action of solutions derived from the castor oil on the microorganisms *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, using as positive control the solution of 2% Chlorhexidine digluconate. The experiment used the methods of diffusion in agar and microdilution. In the diffusion agar test the solution of 2% Chlorhexidine digluconate presented inhibition halos against all tested microorganisms. The ester derived from the castor bean oil in its concentrated form inhibited the growth of Gram-positive bacteria *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Endoquil® and Perioquil® exhibited halos against Gram-positive bacteria *Enterococcus faecalis*. In the microdilution test the same bacteria were used to assess the maximum inhibitory dilution (DIM) of the solutions studied. In plate of 96 holes the solution of 2% Chlorhexidine digluconate inhibited the growth of all microorganisms tested with DIM ranging from 128 to *Enterococcus faecalis* to 32768 for *Staphylococcus epidermidis*. The ester derived from the castor bean oil concentrate presented antimicrobial activity on gram-positive bacteria *Enterococcus faecalis* (DIM 128), *Staphylococcus aureus* (DIM 1024), *Staphylococcus epidermidis* (DIM 32768) and the yeast *Candida albicans* (DIM 512). Endoquil® and Perioquil® did not exhibit antimicrobial action. Transferring a rate from each microdilution hole for tubes, it can be observed that, in some cases, the DIM was lower than that observed in the plate. In these situations it is concluded that the solutions presented in lower dilutions, a bactericidal action and in high dilutions, a bacteriostatic action.

Keywords: Castor oil. Microbiology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Dente e periodonto -----	21
FIGURA 2 - Composto ósseo de rícinus - diferentes formas -----	36
FIGURA 3 - Cacho de mamona -----	37
FIGURA 4 - Soluções irrigadoras derivadas do óleo de mamona: Perioquil® e Endoquil® -----	39
FIGURA 5 - Soluções avaliadas -----	53
FIGURA 6 - Capela de fluxo laminar -----	54
FIGURA 7 - Discos de papel absorvente posicionados -----	55
FIGURA 8 - Espectrofotômetro -----	55
FIGURA 9 - Placa após adição do cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) -----	56
FIGURA 10 - Método de disco-difusão em ágar-----	57
FIGURA 11 - Placa de 96 poços -----	58
FIGURA 12 - Placa de microdiluição após aplicação de resazurina-----	60
FIGURA 13 - Tubos de ensaio 13X10 mm após transferência de 10µl de cada orifício da placa e incubação -----	61
FIGURA 14 - Halos inibitórios apresentados pelas soluções frente ao <i>Enterococcus faecalis</i> -----	63
FIGURA 15 - Halo inibitório apresentado pela solução de digluconato de clorexidina a 2% frente à bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -----	64

LISTA DE TABELAS

TABELAS 1 - Médias e desvios-padrão dos diâmetros dos halos de inibição exibidos por cada uma das soluções testadas-----65

TABELA 2 - Avaliação da placa de microdiluição. Diluição inibitória máxima das soluções avaliadas. -----66

TABELA 3 - Avaliação dos tubos 13x10mm. Diluição inibitória máxima das soluções avaliadas -----67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C- graus Celsius

mm - milímetro

mg- miligrama

mL- mililitro

ATCC- American Type Culture Collection

CIM- Concentração inibitória mínima

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute

CLX- Clorexidina

C.O.R- Composto Ósseo de Rícinus

DIM- Diluição inibitória máxima

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

FDA- Food and Drug Administration

NaOCl- Hipoclorito de sódio

NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards

Ni-Ti- Níquel-titânio

TTC- Cloreto de trifeniltetrazolium

UFC- Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	Soluções irrigadoras utilizadas em Periodontia	21
2.2	Soluções irrigadoras utilizadas em Endodontia	28
2.3	Derivados do óleo de mamona	34
2.4	Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana	46
3.	PROPOSIÇÃO	49
4.	MATERIAIS E MÉTODO	51
4.1	Microorganismos indicadores	52
4.2	Soluções avaliadas	53
4.3	Metodologia	
5.	RESULTADOS	62
6.	DISCUSSÃO	69
7.	CONCLUSÕES	78
8.	ANEXOS	80
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1- Introdução

1) INTRODUÇÃO

Durante a vida, todas as superfícies de interface do corpo são expostas à colonização por uma grande variedade de microorganismos. De uma maneira geral, a microbiota estabelecida vive em harmonia com o hospedeiro. A renovação constante das superfícies por descamação previne o acúmulo de grandes quantidades de microorganismos. Na cavidade oral, entretanto, os dentes apresentam uma superfície dura, não-descamativa, que favorece o desenvolvimento de grandes depósitos bacterianos (LINDHE, 1999).

A placa bacteriana é constituída por uma porção celular, que são os microorganismos da placa, e por uma porção acelular, conhecida como matriz da placa formada por glicoproteínas salivares e polissacarídeos extracelulares. Em 1 mm³ de placa pesando cerca de 1 mg, podem ser contadas mais de 10⁸ bactérias. Uma grande quantidade de diferentes espécies microbianas está presente e determinados padrões de composição microbiana da placa de diferentes áreas da cavidade bucal tornam-se claros. Aparentemente, as características ambientais de cada local favorecem o desenvolvimento de uma determinada comunidade microbiana (THEILADE; THEILADE, 1985). O acúmulo e metabolismo das bactérias sobre as superfícies duras da cavidade oral são considerados as principais causas das cáries, gengivites, doenças periodontais, infecções periimplantares e estomatites (LINDHE, 1999).

Periodontite crônica é uma doença infecciosa que resulta em inflamação dos tecidos de proteção e sustentação do dente. Essa patologia bastante freqüente na população pode ocorrer em qualquer idade, embora envolva mais comumente indivíduos

adultos (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1999). Suas características clínicas incluem inflamação gengival, perda progressiva de inserção conjuntiva e osso alveolar de suporte e formação de bolsa periodontal. Além disso, pode ser observado sangramento gengival à sondagem, mobilidade dentária aumentada e, finalmente, inclinação e exfoliação dentária (PAGE; SCHROEDER, 1976). A quantidade de destruição tecidual observada na periodontite crônica é consistente com a presença de fatores locais, como a presença de diferentes espécies microbianas e cálculo subgengival.

Os microorganismos e seus produtos metabólicos também são considerados as maiores causas das patologias pulpares e periapicais. A invasão bacteriana por meio das lesões de cárie provoca a necrose pulpar e suas toxinas podem alcançar o canal radicular e penetrar nos canalículos dentinários, chegando muitas vezes à região periapical. O objetivo do tratamento endodôntico é a completa remoção do tecido pulpar e dos microorganismos e seus produtos, propiciando uma adequada obturação do sistema de canais radiculares para que ocorra o reparo dos tecidos periapicais (BRISEÑO et. al, 1992). Levando-se em consideração a complexidade da anatomia interna do sistema de canais radiculares, somente a ação mecânica dos instrumentos não seria suficiente para promover o total saneamento desta região. Dessa forma, a limpeza do canal depende também da ação das soluções irrigadoras, que através de suas propriedades físicas, químicas e biológicas promoverão a desinfecção do sistema. A busca por uma solução irrigadora ideal em Endodontia vem sendo o objetivo de vários estudos (SIQUEIRA, 2005).

Tanto em Periodontia quanto em Endodontia novos agentes que apresentem ação antimicrobiana e baixa toxicidade devem ser pesquisados. Nesse sentido destacam-se dois produtos desenvolvidos no Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo e comercializados pela empresa Poliquil (Araraquara-SP): o Endoquil® e o Perioquil®. Trata-se de soluções derivadas de ésteres orgânicos do óleo da mamona, sendo indicadas para irrigação de canais radiculares (Endoquil®) e irrigação de bolsas periodontais (Perioquil®). A utilização destas soluções foi sugerida devido suas excelentes propriedades biológicas como também por sua atividade antimicrobiana, demonstrada em alguns trabalhos (FERREIRA, 1999a; LEONARDO et. al, 2001 ; SIQUEIRA, 2005), o que nos motivou a avaliar *in vitro* sua ação antimicrobiana e sua possível diluição inibitória para alguns microorganismos.

2- Revisão de Literatura

2) REVISÃO DE LITERATURA

Considerando o papel dos microorganismos na etiopatogenia das doenças periodontais e patologias pulpares, percebe-se a grande preocupação com o controle microbiano tanto em Periodontia quanto em Endodontia. Ressalta-se também a importância da constante busca por substâncias alternativas para uso em Odontologia que aliem atividade antimicrobiana satisfatória e propriedades biológicas ideais, sendo minimamente tóxicas ao organismo e altamente biocompatíveis.

2.1) SOLUÇÕES IRRIGADORAS UTILIZADAS EM PERIODONTIA

Doença periodontal é um termo que faz referência a todas as doenças que acometem as estruturas de proteção e suporte do periodonto (gengiva, cemento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar).

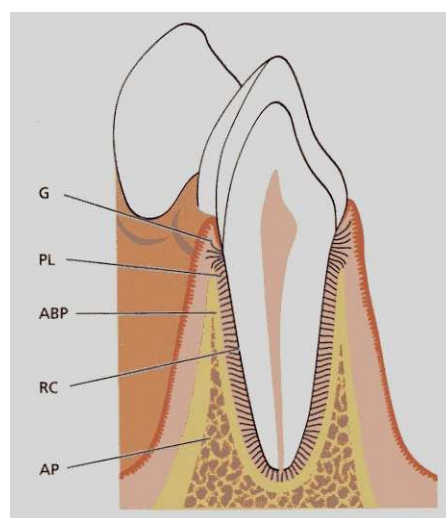


Figura 1: Dente e periodonto: gengiva(G), ligamento periodontal (PL), cemento radicular (RC) e osso alveolar (o osso alveolar propriamente dito (ABP) e o processo alveolar (AP)). (LINDHE, 1999).

Embora as doenças periodontais possuam muitos aspectos em comum com outras doenças infecciosas, existem algumas características que são bastante peculiares. A principal razão desta peculiaridade é a característica anatômica incomum que uma estrutura mineralizada, o dente, passa através dos tecidos, de modo que uma parte é exposta ao ambiente externo enquanto outra se encontra no interior do tecido conjuntivo. As camadas externas dos dentes não “descamam” e assim é facilitada a colonização bacteriana. No contexto da cavidade oral, os depósitos bacterianos são denominados *placa bacteriana*. A placa bacteriana pode acumular-se supragengivalmente (coroa clínica dos dentes) ou subgengivalmente (sulco gengival ou bolsa periodontal). Na maioria das vezes, a colonização do sulco gengival e o subsequente desenvolvimento da bolsa periodontal se iniciam a partir de um depósito de placa supragengival já formado. Portanto, a composição bacteriana da placa subgengival é parcialmente influenciada pela microbiota que existe na placa supragengival. (LINDHE, 1999).

As bolsas periodontais podem conter mais de 400 espécies de microorganismos, cada uma com seu próprio potencial para indução da doença. A doença periodontal é considerada uma “infecção bacteriana mista” para assinalar que mais de uma espécie microbiana contribui para o desenvolvimento da doença (MAYRAND, 1985). As reações inflamatórias e imunológicas à placa bacteriana representam as características predominantes das principais doenças periodontais: a gengivite e a periodontite.

Pesquisas na área de microbiologia nos fornecem dados suficientes para que possamos considerar que espécies bacterianas como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus* e *Porphyromonas gingivalis* desempenham papel fundamental na ocorrência e desenvolvimento da doença

periodontal (QUIRYNEN et. al 2002). Outras espécies como *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum*, *Streptococcus intermedius* e espiroquetas também são freqüentemente citadas (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1996; SLOTS; RAMS, 1991; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1992; WOOLF et. al,1994). Trabalhos recentes também têm relacionado fungos, stafilococos, enterococos e pseudomonas com a ocorrência da doença (SLOTS, 2000).

A base da terapia periodontal consiste na remoção da placa bacteriana que se encontra sobre a superfície dentária, pois é através dela que as células do epitélio do sulco e do epitélio juncional tomam contato com os produtos residuais, enzimas e componentes da superfície das bactérias causando a reação inflamatória e imunológica específica. Clinicamente, a remoção da placa e do cálculo que se encontram aderidos à estrutura dental é realizada através da raspagem e alisamento radicular, que são técnicas eficazes no tratamento da doença periodontal (BADERSTEN; NILVÉUS; EGELBERG, 1984; GREENSTEIN, 1992). Entretanto, em alguns casos estes procedimentos não são capazes de manter a saúde periodontal. Isso é explicado pela freqüência de permanência da placa bacteriana e cálculo mesmo após a realização destes procedimentos (ADDY, 1999).

A efetividade do debridamento mecânico é bastante reduzida principalmente na presença de bolsas periodontais profundas e por variações anatômicas como concavidades radiculares, fendas e áreas de furca (JORGENSEN; AALAM; SLOTS, 2005). A aplicação subgingival de substâncias com atividade antimicrobiana foi sugerida como um adjunto da terapia mecânica para condições clínicas específicas.

Um dos possíveis métodos de aplicação de substâncias antimicrobianas em periodontia é a utilização de soluções para irrigação. Dos agentes antimicrobianos estudados, o grupo anti-séptico tem atraído muito interesse pelo potencial de poder ser aplicado topicamente para prevenção e tratamento da gengivite e periodontite. Além disso, o grupo de agentes anti-sépticos parece oferecer um risco mínimo ao usuário, e apenas poucos efeitos colaterais locais foram observados (LINDHE, 1999).

A irrigação subgengival foi introduzida no início de 1980 como um adjunto do que era conhecido como “regime de higiene bucal simplificada”. Nestes estudos os próprios pacientes eram orientados, após o tratamento de raspagem e alisamento radicular, a realizarem a irrigação subgengival diária de suas bolsas periodontais interdentais. O efeito deste controle de placa foi avaliado em uma série de estudos (SOH; NEWMAN; STRAHAN, 1982; WIEDER; NEWMAN; STRAHAN, 1983; WAN YSOF et. al, 1984; WATTS; NEWMAN, 1986). No estudo de SOH, NEWMAN e STRAHAN (1982) foi relatado que quatro semanas de irrigações diárias das bolsas interdentais com clorexidina resultou em uma significativa redução dos índices de placa subgengival, índices de sangramento sulcular e profundidades de sondagem quando comparado com a irrigação com solução salina. Concluiu-se que a irrigação diária com clorexidina foi efetiva na redução da inflamação periodontal e no controle da placa subgengival. Observou-se que o tratamento com irrigação, aliado ao debridamento mecânico, pode ter induzido algumas mudanças no ecossistema das bolsas periodontais.

A irrigação subgengival com soluções antimicrobianas utilizada como terapia única em bolsas periodontais foi avaliada em vários estudos e observou-se redução significativa das bactérias monitoradas (COBB; RODGERS; KILLOY, 1988; WESTLING; TYNELIUS-BRATTHALL, 1984; HASKEL; ESQUENASI; YUSSIM, 1986; LAZZARO; BISSADA, 1989). Entretanto, apesar do número de patógenos ter diminuído, eles não foram eliminados. Além disso, os microorganismos freqüentemente retornavam aos parâmetros iniciais dentro de 1 a 8 semanas após a irrigação.

A ação da irrigação subgengival quando precedida por raspagem e alisamento radicular foi avaliada por outros autores(MACAULAY, NEWMAN, 1986; BRAATZ et. al, 1985; LIESTGARTEN et. al, 1989; WENNSTRÖN et. al 1987). A redução bacteriana observada foi significativamente maior do que quando se utilizava a irrigação como terapia única. Além disso, a supressão desses microorganismos foi mais duradoura. Pôde-se concluir então que o debridamento mecânico é fundamental para a obtenção de melhores resultados clínicos e que a irrigação subgengival pode ser utilizada como um coadjuvante terapêutico.

Existem vários agentes utilizados como soluções irrigadoras em periodontia e entre eles podemos citar: clorexidina, iodo povidine, fluoreto estanhoso, peróxido de hidrogênio e solução salina. Na literatura a avaliação da utilização de soluções irrigadoras em periodontia torna-se bastante difícil devido ao grande número de agentes antimicrobianos utilizados e pelos protocolos bastante variáveis no que diz respeito à duração e freqüência da irrigação e parâmetros mensurados (LINDHE, 1999).

O digluconato de clorexidina é provavelmente a substância mais utilizada no tratamento periodontal tendo uma ampla ação antimicrobiana incluindo grande número de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, leveduras e alguns vírus. Sua molécula catiônica é facilmente atraída por cargas negativas presentes na superfície bacteriana. Após a adsorção, a integridade da membrana celular bacteriana é alterada podendo ocorrer vazamento dos componentes intracelulares, quando a clorexidina é usada em baixas concentrações, e precipitação do citoplasma bacteriano e morte da célula, quando em maiores concentrações (LINDHE, 1999).

Em 1970, LÖE e SCHIOTT demonstraram que dois bochechos diários com 10ml de uma solução aquosa de clorexidina a 0,2% inibiam quase que totalmente a formação da placa bacteriana supragengival e o desenvolvimento de gengivite em seres humanos. No entanto, apesar de o bochecho de clorexidina apresentar-se eficiente no controle da placa supragengival e da gengivite, não tem efeito sobre o biofilme subgengival (WIEDER; NEWMAN; STRAHAN, 1983).

CUMMING e LÖE (1973), sabendo dos benefícios clínicos do bochecho de clorexidina avaliaram sua ação como solução irrigadora subgengival. Apresentaram resultados controversos e observou-se efeito limitado da solução, o que pode ter ocorrido pelo curto tempo de contato da substância com a superfície radicular. (STABHOLZ et. al, 1993; SOSKOLNE; PROSKIN; STABHOLZ, 1998). Além disso, alguns trabalhos relatam que sua atividade é significativamente diminuída na presença de matéria orgânica, que existe em grandes quantidades em sítios subgengivais (HOANG et. al, 2003). Ao ser utilizada como solução para irrigação subgengival, mesmo baixas concentrações de clorexidina podem ser tóxicas para os fibroblastos gengivais e reduzir

a produção de proteínas colágenas e não-colágenas, impedindo potencialmente o reparo periodontal (MARIOTTI; RUMPF,1999).

O iodo povidine (PVP-I) é classificado como um iodóforo, que é um complexo de iodo fracamente ligado a um elemento transportador (polímero sintético). A atividade bactericida do PVP-I ocorre através da oxidação dos grupamentos amino (NH-), tiol (SH) e hidroxílicos (OH-) dos aminoácidos e nucleotídeos. Além disso, também reage com as ligações duplas dos ácidos graxos insaturados presentes na parede celular e na membrana das bactérias. É um antisséptico bastante potente e com um amplo espectro de ação, atuando sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, micobactérias, vírus e protozoários (SCHREIER *et al.*1997). Os trabalhos realizados com esta substância mostram como vantagens sua ação bactericida rápida, amplo espectro de ação, fácil utilização, não indução de resistência bacteriana, sua fácil aquisição e baixo custo (KÖNIG *et al.* ,1997; KUNISADA *et al.*,1997; LANKER KLOSSNER; WIDMER;FREY, 1997; SLOTS, 2002). Por outro lado o PVP-I não deve ser usado em pacientes que são alérgicos ao iodo, que apresentem disfunção de tireóide ou em mulheres grávidas (FLEISCHER; REIMER, 1997; NOBUKUNI *et al.*, 1997; LINDER; DAVIDIVITCH; REICHMAN, 1998).

O fluoreto estanhoso também tem sido empregado como substância antisséptica para ser utilizada em irrigações subgengivais. Existem hipóteses que este composto, mais provavelmente às expensas dos íons estanho, exerça uma ação antimicrobiana sobre a placa e provavelmente sobre os *Streptococos mutans*. Seu gosto metálico, a sua instabilidade química e as pigmentações escuras, decorrentes de seu uso, têm limitado sua aplicação (LINDHE, 1999).

A aplicação subgengival do peróxido de hidrogênio a 3% não induz mudanças consideráveis na microbiota da bolsa periodontal quando comparada com solução salina, pelo menos quando esta irrigação é realizada em conjunto com raspagem e alisamento radicular (LISTGARTEN et al,1989). Por outro lado, a irrigação subgengival de bolsas profundas, realizada pelo profissional duas vezes por semana resulta em uma supressão temporária do *A. actinomycetemcomitans* (WIKESJO et. al, 1989).

A irrigação subgengival com substâncias antissépticas em periodontia pode demonstrar efeitos benéficos em algumas condições clínicas. Estas soluções apresentam uma boa relação custo-benefício, são de fácil utilização, oferecem um risco mínimo ao usuário e os efeitos colaterais, quando presentes, são apenas locais.

2.2) SOLUÇÕES IRRIGADORAS UTILIZADAS EM ENDODONTIA

A necrose do tecido pulpar ocorre, na maioria das vezes, em decorrência da invasão bacteriana por meio das lesões de cárie. Os microorganismos e seus produtos alcançam a luz do canal e penetram nos canalículos dentinários, propagando-se por todo o sistema de canais radiculares e, invariavelmente, chegam à região periapical.(SIQUEIRA,2005).

O primeiro estudo microbiológico em endodontia foi realizado por MILLER, em 1894, que após a análise de material coletado do interior de canais radiculares fez a correlação entre bactérias e patologias pulpares e periapicais.

Estudos microbiológicos realizados até a década de 70 demonstravam um predomínio de bactérias facultativas, entre as quais as espécies mais comumente

isoladas eram: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* e enterococos. Com o surgimento de técnicas para o cultivo de microrganismos anaeróbios estritos, SUNDQVIST, em 1976, realizou um trabalho clássico, revolucionando os conceitos vigentes na época. Ele avaliou 32 dentes hígidos que apresentavam polpa necrótica causada por injúria. Dos 19 dentes que apresentavam lesões periapicais comprovadas através de exames radiográficos, 18 continham bactérias, confirmando a importância dos microrganismos na etiopatogenia das lesões pulpares.

Atualmente, aproximadamente 500 espécies bacterianas já foram isoladas na cavidade oral humana. Em princípio, todas essas espécies têm a possibilidade de atingir o sistema de canais radiculares (JUNG *et al.*, 2000). Porém somente cerca de 200 espécies foram identificadas do interior do sistema de canais radiculares, com grande prevalência de anaeróbios estritos (SUNDQVIST, 1992; GOMES *et al.*, 2004).

O principal objetivo da terapia endodôntica é evitar que o processo infeccioso se propague do interior dos canais radiculares em direção aos tecidos perirradiculares. Para que se consiga eliminar as espécies bacterianas e seus produtos tóxicos são utilizados procedimentos mecânicos auxiliados por substâncias químicas irrigadoras. Vários estudos têm demonstrado que a instrumentação realizada sem o auxílio de uma substância irrigadora com poder antimicrobiano, não consegue reduzir a carga bacteriana efetivamente (BYSTRÖM; SUNDQVIST, 1981; ALMYROUDI *et al.*, 2002). A irrigação atua removendo os microrganismos e seus produtos e solubilizando o tecido pulpar, permitindo assim que a medicação

intracanal possa agir adequadamente, favorecendo o reparo (LEONARDO; LEAL, 1991).

As substâncias irrigadoras devem ser eficazes em todo o complexo dos canais radiculares, tais como túbulos dentinários, ramificações apicais e áreas de reabsorção radicular (ÖNÇAG *et al.*, 2003). Para isso, as substâncias químicas utilizadas devem apresentar ação antimicrobiana e capacidade de dissolução ou remoção de tecido orgânico (CHEUNG; STOCK, 1993). Essas funções devem ser executadas por meio do somatório de suas propriedades físicas, químicas e biológicas, aliadas a um custo acessível aos profissionais da área. Além disso, a solução irrigadora ideal deve possuir boa atividade antimicrobiana sem ser tóxica aos tecidos periapicais (YESILSOY; EUGENE; CLEVELAND, 1995).

Dentro deste contexto, diversas substâncias foram propostas para utilização durante o tratamento endodôntico, entre elas destaca-se o hipoclorito de sódio e a clorexidina, em diversas concentrações (SIQUEIRA, 2005).

O hipoclorito de sódio (NaOCl), em suas várias concentrações, é um composto halogenado e foi introduzido na Endodontia em 1936 por Walker. Desde então se tornou a solução auxiliar da instrumentação mais utilizada na terapia endodôntica (SIQUEIRA, 1997). É uma solução fortemente alcalina que atua dissolvendo o tecido necrótico e eliminando a microbiota endodôntica, devido à formação de compostos contendo cloro ativo, como o ácido hipocloroso e o íon hipoclorito. O NaOCl apresenta excelente atividade antimicrobiana frente aos microorganismos presentes

na lesão endodôntica (BYSTRÖM, SUNDQVIST,1983). Esta ação ocorre por oxidação de enzimas bacterianas que leva à desorganização de seu metabolismo.

Por outro lado, o NaOCl é altamente tóxico em altas concentrações causando, nesta situação, danos ao tecido periapical quando em contato com o mesmo (FERRAZ *et al.*, 2001). Outras características negativas são o odor e gosto desagradável, tendência a manchar roupas, potencial corrosivo (BAUMGARTNER; CUENIN, 1992) e capacidade de causar reações alérgicas (KAUFMAN; KEILA, 1989).

SPANGBERG, ENGSTROM e LANGELAND (1973) testaram *in vivo* e *in vitro* várias soluções de hipoclorito de sódio que poderiam ser utilizadas como irrigantes em Endodontia. Comentaram que a solução desejada seria aquela que combinasse o máximo efeito antimicrobiano e a mínima toxicidade. Nenhuma das soluções testadas preencheu este importante requisito. Relatou-se que o hipoclorito de sódio a 5,25% foi considerado mais forte que o necessário para matar as bactérias comumente presentes no canal radicular além de apresentar grande toxicidade. Por outro lado, o hipoclorito a 0,5% dissolveu satisfatoriamente o tecido necrótico, mas não apresentou efeito contra *Staphylococcus aureus*.

BYSTRÖM e SUNDQVIST (1983) analisaram a ação antibacteriana da solução de hipoclorito de sódio a 0,5% em dentes com necrose pulpar. Cada dente foi tratado em cinco sessões, sem o uso de curativos intracanaís entre elas, e a presença de bactérias nos canais radiculares analisada em cada ocasião. Os resultados mostraram que o hipoclorito de sódio a 0,5% foi mais efetivo como solução antibacteriana do que a solução salina.

SIQUEIRA Jr. et al. (1998) avaliaram, pelo teste de difusão ágar, o efeito antimicrobiano dos irrigantes hipoclorito de sódio a 0,5%; 2,5% e 4%; clorexidina a 0,2% e 2%; ácido cítrico a 10% e EDTA a 17% contra anaeróbios gram-negativos pigmentados de preto e bactérias facultativas. Observaram que a solução de hipoclorito de sódio a 4% forneceu os maiores halos de inibição bacteriana, que foi significativamente superior quando comparado com as outras soluções, exceto o hipoclorito de sódio a 2,5%. Baseado nas médias dos diâmetros das zonas de inibição do crescimento bacteriano, as soluções podem ser classificadas quanto à sua efetividade da seguinte maneira decrescente: hipoclorito de sódio a 4%; a 2,5%; clorexidina a 2,0%; a 0,2%; EDTA a 17%; ácido cítrico a 10% e hipoclorito de sódio a 0,5%.

CLARKSON e MOULET (1998) descreveram o hipoclorito de sódio como uma das principais soluções irrigantes endodônticas. Ressaltaram que a irrigação dos canais radiculares com essa solução em concentrações que variam de 1% até 5,25% tem sido amplamente aceita. Como um irrigante endodôntico, a solução de hipoclorito de sódio é relativamente barata, possui propriedade bactericida, baixa viscosidade, apresenta capacidade de dissolver proteínas, além do tempo de vida útil razoável. Entre as desvantagens destacam o sabor desagradável, a toxicidade aos tecidos, poder de corrosão aos metais, além de ser fortemente alcalina.

A clorexidina tem sido utilizada em endodontia como solução irrigadora e medicação intracanal. É uma substância efetiva contra vários microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, leveduras, anaeróbios, facultativos e aeróbios (FERRAZ *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2001). Possui várias propriedades que a

tornam bastante interessante para ser utilizada como irrigante endodôntico: amplo espectro de ação, substantividade e relativa ausência de toxicidade.

DELANY, PATTERSON e MILLER (1982) testaram o gluconato de clorexidina a 2% em um estudo *in vitro* utilizando dentes extraídos. Relataram que a solução é um agente antibacteriano efetivo quando utilizado em endodontia e recomendaram também a utilização da clorexidina como mediação intracanal.

AYHAN et. al (1999) realizaram um estudo com o objetivo de determinar a atividade antimicrobiana de vários irrigantes endodônticos sobre seis microorganismos selecionados. Entre estes irrigantes testaram a ação do gluconato de clorexidina a 2%. Concluíram que a substância é eficiente para ser utilizada como solução irrigadora de canais radiculares. Esta eficácia foi atribuída principalmente a sua capacidade de ser adsorvida e posteriormente liberada pelos tecidos dentais, o que manteria o sistema de canais radiculares livre de microorganismos.

FERRAZ et. al (2007) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana do gluconato de clorexidina gel, como irrigante endodôntico, comparando-o ao gluconato de clorexidina líquido. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo teste de difusão em ágar. As zonas de inibição de crescimento bacteriano produzidas pela clorexidina gel a 0,2%, 1% e 2% foram observados frente a 5 anaeróbios facultativos e 4 anaeróbios estritos, e comparados com os resultados obtidos pela clorexidina líquida. Todas as espécies testadas foram inibidas tanto pelo gluconato de clorexidina em gel quanto pela clorexidina líquida. Não houve diferença

estatisticamente significante comparando os halos de inibição produzidos por concentrações semelhantes dos dois tipos de clorexidina.

Frente à restrospectiva da literatura, observa-se uma grande preocupação com a limpeza e com o controle microbiano durante o tratamento dos canais radiculares infectados, o que valoriza a busca de alternativas que possuam eficiência antimicrobiana, aliada às propriedades biológicas consideradas para a irrigação dos canais radiculares, aumentando ainda mais as possibilidades de obtenção de sucesso nos tratamentos endodônticos. (SIQUEIRA, 2005)

2.3) DERIVADOS DO ÓLEO DE MAMONA

Em 1937 foram produzidos os primeiros polímeros utilizando reações uretanas e desde então os chamados “poliuretanos” tornaram-se um dos principais polímeros deste século, principalmente devido a sua versatilidade. A uretana é formada pela reação química entre um grupo isocianato e um grupo hidroxila. (CLARO NETO, 1997).



Quadro 1: Reação uretana (CLARO NETO, 1997)

O polímero de poliuretana é formado quando reagimos um composto com dois ou mais isocianatos em sua estrutura com um polioliol, ou seja, um álcool polifuncional.

Em 1984 o Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros da USP São Carlos iniciou o desenvolvimento de um poliuretano a base de moléculas extraídas da mamona.

O principal produto desenvolvido a partir da poliuretana do óleo de mamona e utilizado em medicina e odontologia é o Composto Ósseo de Rícinus (C.O.R). Trata-se de uma poliuretana composta por um pré-polímero derivado de isocianato, um polioliol poliéster derivado do óleo de mamona e carbonato de cálcio. A inclusão do carbonato de cálcio permite a formação de poros e confere melhor padrão de resistência e elasticidade em relação ao tecido ósseo. O polímero, desenvolvido pelo professor Gilberto Orivaldo Chierice da USP São Carlos e aprovado pelo Ministério da Saúde desde 1999, recebeu em junho de 2003 a aprovação da Food and Drug Administration (FDA), responsável pela liberação de novos alimentos e medicamentos nos Estados Unidos. Para conceder a aprovação, a FDA fez testes químicos e biológicos, como o de citotoxicidade, e uma série de outros que já haviam sido realizados no Brasil. Ao longo de todo este tempo mais de 2 mil pessoas - vítimas de acidentes com armas, carros, motos e de tumores – foram beneficiadas com próteses para substituir ossos na face e crânio (ERENO, 2003).

O C.O.R é apresentado na forma líquida, grânulos, pré-moldado ou prototipado (Figura 2).

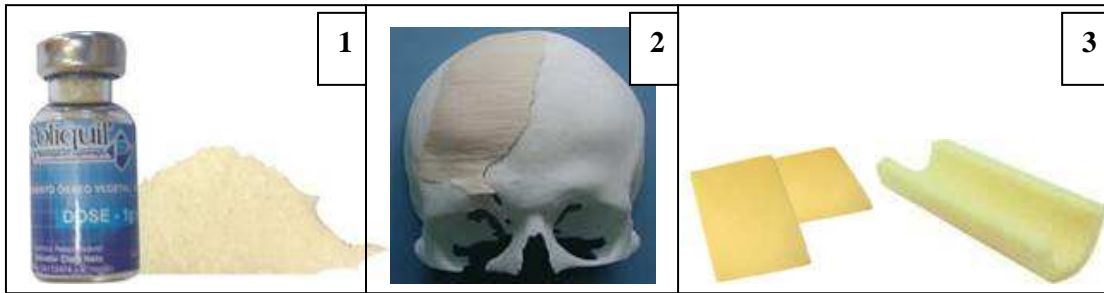


Figura 2: Composto ósseo de rícino nas formas: 1) Granulado; 2) Prototipado, 3) Pré-moldado. (<http://www.poliquil.com.br/produtos.htm>)

Diversos estudos têm relatado a utilização da poliuretana desenvolvida a partir do óleo da mamona. A maioria dos trabalhos publicados utilizaram o implante de C.O.R para testar a biocompatibilidade do material e seu comportamento no interior de tecidos variados. Estes implantes têm-se mostrado biocompatíveis em variadas condições experimentais: no interior de ossos longos e região intra-articular de ratos (FUENTEFRÍA; BRITO; WEISMANN, 1998) e coelhos (FIGUEIREDO et al. 2004); nos tecidos subcutâneos (COSTA et al, 1997), alvéolo dental (LAMANO CARVALHO et. al, 1997a; LAMANO CARVALHO et. al 1997b) e arco zigomático de ratos (LEONEL et. al, 2003 ; LEONEL, 2004), alvéolo dental de cães (KONIG JR et. al, 1999), na câmara anterior do olho de camundongos (VILARINHO; HETEM; RAMALHO, 1996) e no fêmur de cães (IGNACIO et. al, 2002). Os resultados favoráveis de tais pesquisas encorajaram a aplicação do material em ortopedia, cirurgia plástica e cirurgia bucomaxilofacial.

O óleo de mamona, conhecido no Brasil como óleo de rícino e internacionalmente como “*castor oil*”, é extraído das sementes da mamona, um arbusto típico de climas tropicais pertencente à classe Dicotiledônea, ordem Geraneales, família Euforbaceae, gênero *Ricinus*, espécie *Communis* (Figura 3).



Figura 3: Cacho de mamona. (www.sct.embrapa.br/diacampo/2004/img/mamona.jpg)

O fruto da mamoneira apresenta aproveitamento integral, obtendo-se como produto principal o óleo, estável sob variadas condições de pressão e temperatura, e como subproduto a torta, que pode ser utilizada como adubo orgânico (COSTA, 2004). Embora a toxicidade da mamoneira seja conhecida desde tempos remotos, o óleo de rícino não é tóxico, visto que a ricina, proteína tóxica presente nas sementes, não é solúvel em lipídeos, ficando todo o componente tóxico restrito à torta. Por ser muito versátil o óleo de mamona é utilizado na síntese de uma grande variedade de produtos, desde cosméticos e chocolates até lubrificantes de motores a jato, podendo também ser um substituto do petróleo na síntese de vários produtos.

A extração do óleo de mamona pode ser feita da semente completa (sem descascar) ou da semente descascada. O método utilizado para extrair o óleo pode ser a prensagem, a frio ou a quente, ou a extração por solvente. Para obtenção do óleo medicinal a prensagem é realizada a frio e obtêm-se um óleo com baixo teor de acidez e impurezas (OLIVEIRA, 2005).

Os óleos vegetais, assim como a gordura animal, são triglicerídeos compostos basicamente por ácidos graxos. O óleo da mamona é predominantemente composto pela molécula do ácido ricinoleico (89,5% da sua composição) que apresenta a peculiaridade de ser um dos poucos ácidos graxos naturais cuja estrutura química possui três grupos funcionais altamente reativos. Por este motivo pode ser considerado um poliol natural trifuncional. Este ácido possui estrutura química semelhante aos ácidos graxos essenciais humanos como o ácido linoleico e o ácido alfa-hidroxi-nervônico, presente no sistema nervoso central humano.

O óleo de mamona é um éster de álcool polihídrico e pode dar origem a diversos tipos de ésteres. A partir desta mistura de ésteres desenvolveram-se duas substâncias irrigadoras indicadas para utilização em Endodontia (Endoquil®) e em Periodontia (Perioquil®) (Figura 4)



Figura 4: Soluções irrigadoras derivadas do óleo de mamona: Perioquil® e Endoquil®

Essas soluções irrigadoras também foram alvo de trabalhos devido, principalmente, a sua possível ação antimicrobiana e detergente.

Tendo em vista as excelentes propriedades biológicas do polímero de mamona, FERREIRA et. al (1999a) utilizaram o “detergente de mamona” em um estudo *in vivo* para avaliação de sua atividade antimicrobiana. Compararam a atividade antimicrobiana do gel de papaína a 0,4%, detergente derivado do óleo de mamona a 10% e hipoclorito de sódio a 0,5% em 60 dentes com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente. Após isolamento absoluto e abertura coronária dos dentes, e antes de qualquer intervenção endodôntica, realizou-se a primeira colheita do conteúdo do canal radicular utilizando-se cones de papel esterelizados. Realizou-se, então, o preparo biomecânico dos canais utilizando-se em cada grupo de dentes um tipo de solução irrigadora. Após 72 horas realizou-se a segunda colheita microbiológica. Foi executado o processamento microbiológico dos cones de papel e a contagem do número de unidades formadoras de colônia, de cada uma das colheitas. Após análise dos resultados obtidos, os autores observaram que as

três soluções testadas apresentaram ação antimicrobiana. Entretanto, o gel de papaína a 0,4% apresentou o menor efeito, enquanto que o detergente de mamona e hipoclorito de sódio mostraram ações antimicrobianas semelhantes.

FERREIRA (1999b) realizou também um outro trabalho com o objetivo de determinar a suscetibilidade de anaeróbios estritos frente a agentes irrigadores utilizados no tratamento endodôntico. Avaliou a ação do éster derivado do óleo de mamona a 10%, digluconato de clorexidina a 2%, paramonoclorofenol canforado a 35% e solução de hidróxido de cálcio a 10% sobre cepas de referência de *Prevotella intermédia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Clostridium perfringens*. O autor realizou previamente o teste de microdiluição em microplacas, visando uma triagem das concentrações bactericidas mínimas. Em seguida adotou o teste da macrodiluição para confirmação de seus resultados. Concluiu que a clorexidina foi a droga que demonstrou maior eficiência, com as menores concentrações inibitórias mínimas, seguida pelo detergente de mamona, paramonoclorofenol canforado e hidróxido de cálcio. A eficácia de cada droga variou para diferentes bactérias. O *Clostridium perfringens* apresentou maior resistência que a *Prevotella intermédia* e o *Fusobacterium nucleatum*.

ITO et al. (1999) estudaram a diluição máxima inibitória dos ésteres derivados do óleo ricinoléico, subproduto da mamona, para diferentes tipos de cocos gram positivos, bacilos gram negativos e leveduras. As diluições variaram de 1:5 a 1:5120. Os resultados mostraram que o detergente derivado da mamona não tem ação sobre gram negativos, mas apresenta atividade antimicrobiana contra gram positivos e leveduras, podendo ser utilizado como anti-séptico.

SAMPAIO (1999) avaliou, por meio da microscopia eletrônica de varredura, a capacidade de limpeza de diferentes detergentes e do quelante EDTA em superfícies radiculares submetidas à raspagem e aplainamento periodontal. Após o procedimento periodontal foram aplicados Tergipol, Perioquil, Plax ou EDTA 24% para remoção da smear layer. Os melhores resultados foram obtidos com o EDTA, seguido pelo Plax e o derivado da mamona (Perioquil). O detergente lauril sulfato de sódio (Tergipol) apresentou menor eficiência na remoção da smear layer das paredes dentinárias submetidas ao tratamento periodontal prévio.

PÉCORA et al. (2000) observaram o efeito do detergente derivado da mamona e do gel de papaína sobre a permeabilidade dentinária radicular. Utilizando método histoquímico por íons cobre e morfometria, os autores concluíram que o detergente derivado da mamona a 3,3%, o gel de papaína a 0,4% e a solução de hipoclorito de sódio a 0,5% promoveram um aumento da permeabilidade dentinária. Observaram ainda que o terço apical foi menos permeável a qualquer substância avaliada em comparação aos terços médio e cervical.

MANTESSO et. al (2000) relatam que as soluções irrigadoras derivadas do óleo da mamona apresentam propriedades anti-sépticas. Estes mesmos autores avaliaram *in vitro* a citotoxicidade deste material através da exclusão de células coradas por azul de Trypan. A solução de mamona foi diluída nas concentrações de 3.3×10^{-3} e 3.3×10^{-4} e aplicada sobre fibroblastos orais humanos e osteoblastos de calvária de rato. Células crescidas em DME fresco serviram como controle. Depois de 1, 3, 4 e 6 h (viabilidade - curto tempo) e 2, 4, 5, 7 e 8 dias (viabilidade - longo tempo) as células foram contadas. Nos testes de longo tempo as culturas cresceram igualmente, com exceção das culturas tratadas com solução a 3.3×10^{-3} ,

as quais apresentaram um crescimento estatisticamente menor do que os outros grupos. A porcentagem de viabilidade celular ficou entre 75 e 100% em todos os grupos, sem diferenças estatísticas entre o grupo controle e o tratado com a solução mais diluída (3.3×10^{-4}). Nos experimentos de curto tempo o grupo controle e o tratado apresentaram a mesma viabilidade celular variando entre 70 e 100%, sem diferenças estatísticas. A solução de mamona mostrou-se biocompatível em testes de curto e longo tempo. Sendo assim, adicionando estes resultados às possíveis propriedades antisépticas e detergentes do material, os autores sugeriram que a solução de mamona poderia ser utilizada como irrigante com aplicações amplas, incluindo o tratamento endodôntico.

BONIFÁCIO et. al (2000) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras empregadas em endodontia (Endoquil®, Clorexidina alcoólica a 5,0% (CLX 5,0%), Gluconato de clorexidina a 2% (CLX 2%) e solução de NaOCl 0,5%) , frente a microrganismos gram-positivos (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus sobrinus*), gram-negativos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) e a levedura *Candida albicans*.. A avaliação foi realizada pelo método de difusão em ágar, pela técnica de duas camadas. Discos de papel absorvente (6,0mm de diâmetro), embebidos nas respectivas soluções experimentais foram distribuídos em pontos equidistantes. As placas permaneceram à temperatura ambiente por período de 2 horas (pré-incubação), sendo em seguida incubadas a 37°C por 24 horas. Todos os testes foram realizados em duplicata. Após incubação, as placas foram otimizadas pela adição do gel de TTC a 0,05% em 1% de ágar, e os halos de inibição mensurados. Halos de inibição foram observados com CLX 5,0% e

CLX 2,0% frente a todas as cepas, sendo os maiores valores sobre *S mutans* (saliva 1, 2 e 3) e *S sobrinus*. Bacilos gram-negativos foram resistentes ao Endoquil e à solução de NaOCl a 0,5%. Concluiu-se que as soluções irrigadoras de CLX 5,0% e CLX 2,0% apresentaram atividade antibacteriana *in vitro*. A solução de Endoquil® foi efetiva apenas frente a microrganismos gram-positivos.

LEONARDO et. al (2001) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana do Endoquil®, solução de clorexidina a 2% e solução de hipoclorito de sódio a 0,5% sobre cocos Gram-positivos (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*), bacilos gram-negativos (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e a levedura *Candida albicans*. A atividade foi avaliada utilizando-se o teste de difusão em ágar pela técnica de dupla camada. A camada base consistia de 10,0 ml de meio Mueller-Hinton ou 10,0 ml de Brain Heart infusion ágar em uma placa de Petri. Após a solidificação uma camada de 5,0 ml de ágar Mueller-Hinton ou Brain heart infusion com o inóculo (10^6 /mL) foi adicionada. Discos de papéis absorventes (6mm de diâmetro) foram imersos nas soluções testadas e colocados em pontos equidistantes da placa. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 2 horas para a pré-difusão das soluções e posteriormente incubada a 37°C por 24 horas. Todos os testes foram realizados em duplicata. Após incubação o meio foi otimizado com a adição de cloreto de trifeniltetrazolium a 0,05 % e os halos de inibição foram medidos. Todos os microorganismos foram inibidos pelo gluconato de clorexidina a 2%.O Endoquil® foi efetivo contra microorganismos Gram-positivos e a solução de 0,5% de hipoclorito de sódio foi efetiva somente contra *S. aureus*.

TEIXEIRA et. al (2001) realizaram uma pesquisa com o objetivo de avaliar a capacidade de remoção da smear layer dos canais radiculares empregando diferentes tipos de irrigantes endodônticos. Utilizaram 20 dentes, distribuídos entre 4 grupos: EDTA 17%, Hipoclorito de sódio a 5,25%, Endoquil® e água destilada (controle positivo). Após instrumentação mecânica realizou-se a irrigação dos canais radiculares utilizando-se uma seringa com 5mL de volume e agulha 25-gauge. Os grupos foram irrigados com 3mL de solução teste e instrumentados com lima Hedströen #30 por 20 segundos. Este processo (instrumentação/irrigação) foi repetido mais duas vezes. Por fim, os dentes foram irrigados com 5mL de água destilada e armazenados em glutaraldeído a 2,5%. Posteriormente os dentes foram clivados no sentido do seu longo eixo e as amostras foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura. Concluiu-se, após realização da microscopia, que o Endoquil e o EDTA a 17% promoveram maior capacidade de remoção da smear layer, não diferindo estatisticamente entre si.

YAMASHITA et. al (2003) avaliaram, utilizando a microscopia eletrônica de varredura, a característica da superfície dentinária após o preparo biomecânico endodôntico, utilizando diferentes soluções de irrigação. Trinta e seis dentes foram divididos em seis grupos experimentais: 1- Hipoclorito de sódio a 2,5%; 2- Hipoclorito de sódio a 2,5% + EDTA; 3- Clorexidina a 2%; 4- Clorexidina a 2% + EDTA; 5- Detergente de mamona; 6- Detergente de mamona+EDTA. Concluíram que nos grupos em que se utilizou o EDTA, observou-se menor quantidade de resíduos nas paredes dos canais. Os três tipos de irrigantes testados comportaram-

se de forma semelhante e o detergente de mamona foi sugerido como possível irrigante endodôntico.

SIQUEIRA (2005) avaliou comparativamente *in vivo* o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio a 1%, da clorexidina a 2% e do Endoquil® na irrigação de canais radiculares de 18 dentes anteriores superiores humanos com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente. Realizou a abertura coronária e 1ª colheita microbiológica, utilizando cones de papel esterelizados. Em seguida realizou a neutralização das substâncias antimicrobianas e a 2ª colheita microbiológica. Decorridas 72 horas efetuou-se a 3ª colheita e as amostras foram transportadas em solução de PBS. As amostras foram semeadas em placa e incubadas em aerobiose e anaerobiose para posterior contagem do número de unidades formadoras de colônia. Concluiu, após análise dos resultados que: todas as substâncias irrigadoras utilizadas mostraram uma redução significativa do número de bactérias da 1ª para a 2ª colheita; em relação à 2ª colheita as três substâncias irrigadoras se comportaram de maneira semelhante na redução do número de microorganismos; em relação à 3ª colheita em anaerobiose a clorexidina a 2% e o Endoquil® foram significativamente melhores que o hipoclorito de sódio a 1% quanto à presença bacteriana.

MENEGHIN et. al (2006), estudaram, por meio de análise morfológica e morfométrica, a capacidade de limpeza promovida pela instrumentação rotatória com limas Ni-Ti e irrigação com diferentes soluções. Vinte e sete pré-molares inferiores foram distribuídos em três grupos, de acordo com a solução irrigadora utilizada: água destilada, Hipoclorito de sódio a 1% e Endoquil®. A irrigação com 2mL de solução foi realizada durante todo o preparo mecânico, a cada troca de

instrumento, totalizando um volume de 20 mL para cada dente. Os terços apicais dos dentes foram então submetidos ao processamento histológico. Os espécimes foram analisados em microscópio óptico conectado a um computador. As imagens foram capturadas e analisadas utilizando-se softwares específicos e submetidas à análise morfométrica. Calculou-se a porcentagem de debris presente no terço apical dos canais radiculares. Os dentes irrigados com Endoquil e hipoclorito de sódio a 1% apresentaram menor porcentagem de debris no terço apical, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles.

2.4) MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os dois métodos mais comumente utilizados para avaliação da ação antimicrobiana de soluções utilizadas em odontologia são o de **difusão em ágar** e o de **diluição em caldo**.

2.4.1) *TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR*

O **teste de difusão em ágar** é um dos métodos mais utilizados para avaliação da atividade antimicrobiana de materiais odontológicos e pode ser realizado através das técnicas do disco, do poço ou *template*. O teste é realizado em placas de Petri contendo meio de cultura, sobre o qual é semeado o microorganismo indicado. Os agentes antimicrobianos a serem testados são colocados em discos de papéis ou mesmo em poços feitos no meio de cultura. O diâmetro formado da zona de inibição adjacente aos discos demonstra a ação do agente antimicrobiano.

O método de difusão em ágar geralmente é utilizado para microorganismos de crescimento rápido e para alguns de crescimento fastidiosos. Para um resultado confiável dos testes, é preciso trabalhar com uma metodologia padronizada. O método padronizado que é atualmente recomendado pelo NCCLS (atualmente CLSI) se baseia no originalmente descrito por BAUER *et. a* (1966).

2.4.2) *TESTE DE DILUIÇÃO EM CALDO*

Atualmente, o **método de diluição** é usado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) ou a diluição inibitória máxima (DIM) de um agente necessário para inibir ou matar um microorganismo. Os procedimentos para determinar a atividade inibitória podem ser realizados tanto pelas técnicas de diluição em caldo ou em ágar. Os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a Concentração Inibitória Mínima (ALVES *et al*, 2007). Quando se trabalha com o conceito de diluição, a maior diluição que inibe o crescimento microbiano é determinada Diluição Inibitória Máxima. Segundo ANDREWS (2005), as CIM e as DIM são consideradas excelentes ferramentas para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos e, portanto, usadas para julgar o desempenho de todos os outros métodos de susceptibilidade.

Para realizar o teste preparam-se vários tubos de ensaio ou placas com meio caldo ou ágar, aos quais são acrescentadas diversas concentrações dos agentes antimicrobianos. A seguir, os tubos ou as placas são inoculados com uma suspensão padrão do organismo a ser testado. Após incubação, examinam-se os

testes para determinar a CIM. A CIM pode ser detectada a “olho nu” ou através de aparelhos baseados em leitura óptica.

A **técnica de microdiluição em caldo** é uma adaptação da macrodiluição em caldo. É denominada “microdiluição”, porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas de 80 ou 96 poços de fundo redondo ou cônico estéreis, próprias para microdiluição. As placas de microdiluição inoculadas devem ser incubadas a 37 °C por 16-24 h, com no máximo quatro placas em cada pilha, a fim de manter a mesma temperatura de incubação para todas as culturas. Os fatores primários que influenciam nos valores de CIM no método de diluição em caldo são os mesmos tanto para a técnica de macrodiluição como para de microdiluição, ou seja, a sensibilidade do organismo, o diluente utilizado, o estágio e a taxa de crescimento bacteriano (ALVES et. al, 2007)

3- Proposição

3) PROPOSIÇÃO

- Avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana da mistura de ésteres derivados do óleo de mamona parcialmente hidratado, do Endoquil® e do Perioquil® sobre os microorganismos *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.
- Avaliar, pelo método de Microdiluição em caldo, a Diluição Inibitória Máxima destas substâncias para os microorganismos citados acima.
- Comparar as técnicas de Difusão em Agar e Microdiluição em caldo para avaliar a ação antimicrobiana dos derivados do óleo de mamona.

4- Materiais e Método

4) MATERIAIS E MÉTODO

4.1) MICROORGANISMOS INDICADORES:

Neste estudo foram utilizados microorganismos provenientes da “*American Type Culture Collection*” (ATCC) com distintas características morfológicas e tintoriais: cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos e uma levedura (Quadro 3). A preservação dos microorganismos foi realizada através de repiques, em meio próprio e incubação em condições de aerobiose a 37C° por 24-48 horas.

Microorganismos	Morfotipos
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	Coco Gram-positivo
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	Bacilo Gram-negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Bacilo Gram-negativo
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29923)	Coco Gram-positivo
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12288)	Coco Gram-positivo
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	Levedura

Quadro 2- Microorganismos e seus morfotipos

4.2) SOLUÇÕES AVALIADAS:

A ação antimicrobiana das seguintes substâncias foi avaliada (Figura 5):

- **Mistura de ésteres derivados do óleo de mamona parcialmente hidratado**

- Fornecido pelo laboratório do Instituto de Química de São Carlos-USP.

- **Endoquil®**- Mistura de ésteres derivados do óleo de mamona produzido pela Poliquil, Araraquara-SP.

- **Perioquil®**- Mistura de ésteres derivados do óleo de mamona produzido pela Poliquil, Araraquara-SP.

- **Solução de digluconato de clorexidina a 2%**-(controle positivo). Preparada pela Pharmácia Specifica, Bauru - SP.

- **Água destilada**- (controle negativo). Obtida no laboratório de microbiologia, FOB-USP.



Figura 5: Soluções utilizadas- 1) Clorexidina 2%, 2) Perioquil®, 3)Endoquil®, 4) Mistura de ésteres derivados do óleo de mamona parcialmente hidratado.

4.3) METODOLOGIA:

4.3.1) *TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR*

Todas as etapas de preparação e montagem das placas a serem utilizadas neste teste foram realizadas em capela de fluxo laminar (Velco Ind. Bras - Campinas-SP) (Figura 6).



Figura 6: Capela de fluxo laminar

Cada placa de Petri, devidamente esterilizada, recebeu como camada base 10 mL de meio Mueller-Hinton agar e após a geleificação as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para confirmar a esterilidade.

Discos de papel absorvente (6 mm de diâmetro) foram embebidos com 20µL de cada uma das soluções testadas e posicionados com uma pinça em pontos equidistantes da placa (Figura 7).

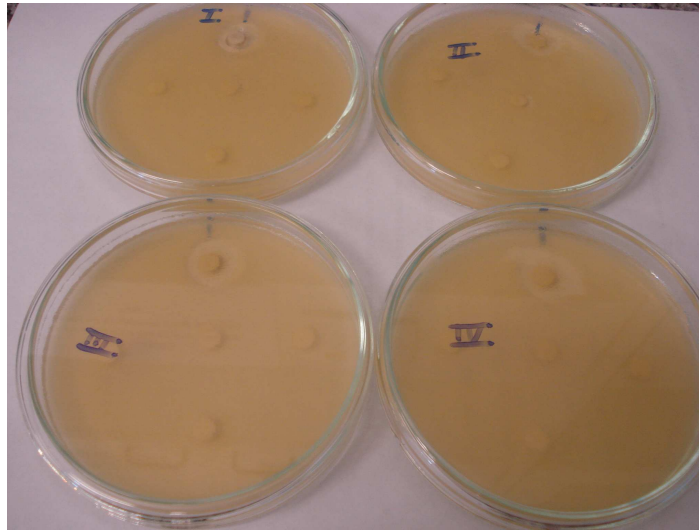


Figura 7: Discos de papel absorvente posicionados em pontos eqüidistantes da placa. A ação de cada solução sobre cada uma das cepas de referência foi testada em quaduplicata.

A padronização da quantidade de UFC/mL utilizada foi realizada em um espectrofotômetro (Figura 8) baseando-se na escala 0,5 de MacFarland, o que corresponde a $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL. Foi adicionado então, em cada placa, 15 mL de Meio Mueller-Hinton com $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL do inoculo.

A ação de cada solução sobre as cepas de referência foi testada em quaduplicata.



Figura 8: Espectrofotômetro e utilização do tubo da escala 0,5 de MacFarland para padronização dos inoculos bacterianos utilizados.

Após adição do inóculo as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e posteriormente ao período de incubação foi acrescentado 15 mL de cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) a 0,05% em cada placa. A maioria das bactérias forma colônias vermelhas no ágar adicionado de TTC, o que facilita a leitura (Figura 9). Os halos de inibição foram então mensurados em milímetros e o valor final foi dado pela média das quatro repetições.

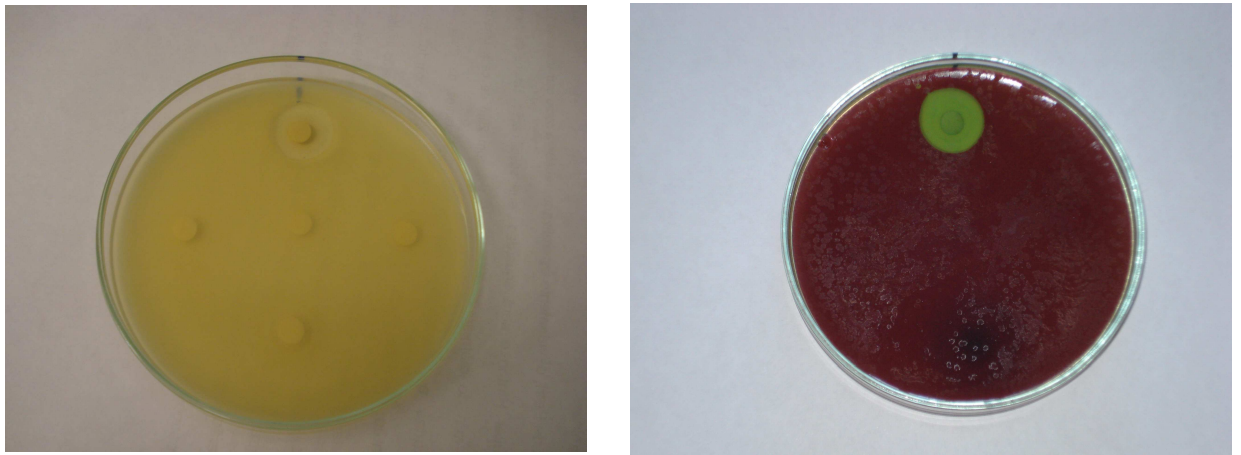


Figura 9: Aspecto de placas antes e após adição do cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) a 0,05%. A coloração avermelhada das áreas onde há crescimento bacteriano facilita a observação e mensuração dos halos de inibição.

A Figura 10 ilustra a seqüência de realização do teste de difusão em ágar.

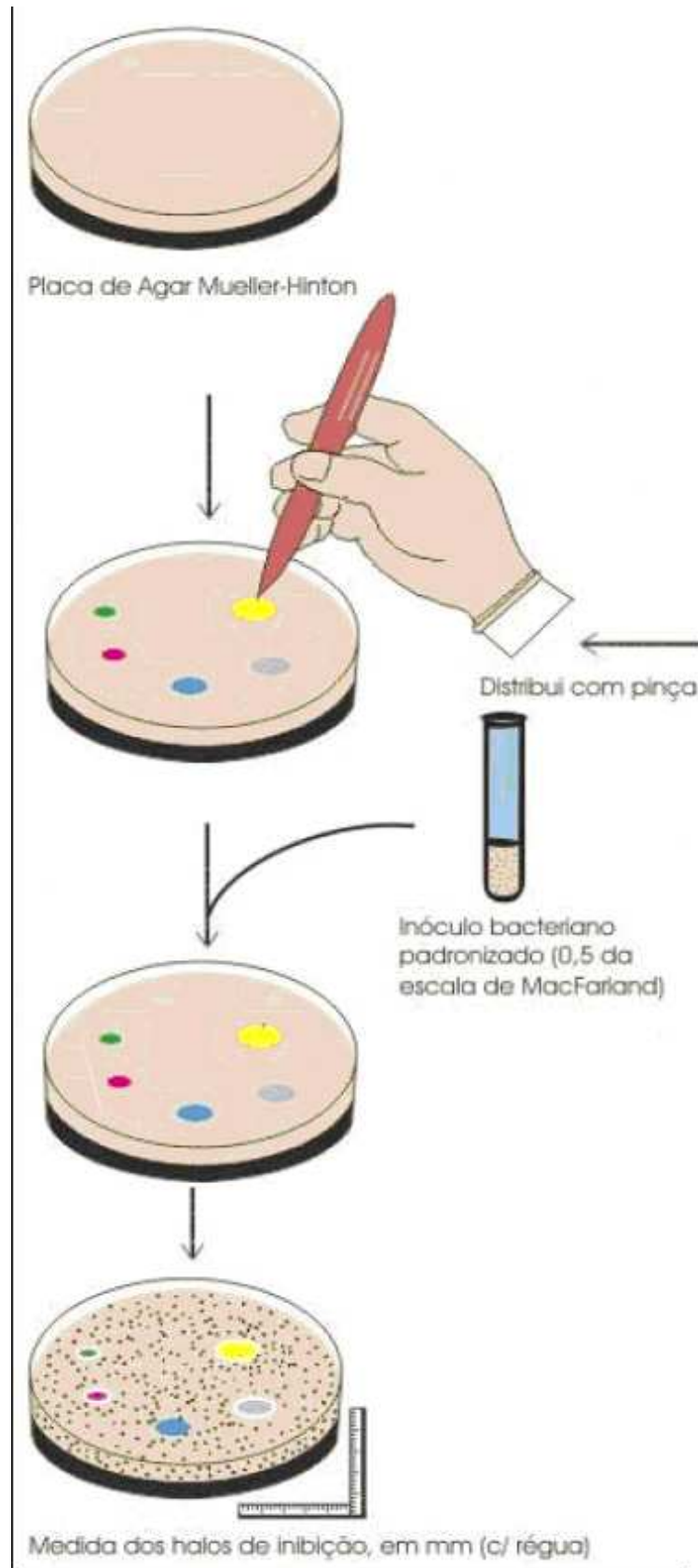


Figura 10: Método de disco-difusão em ágar.

4.3.2) *TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO*

O teste de microdiluição em caldo visou determinar as diluições inibitórias máximas das soluções estudadas. Para realização desta metodologia foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato (TPP-92096, Mandel Scientific Company Inc – Ontário, Canadá) que são compostas por colunas numeradas de 1 a 12 e fileiras de “A” a “H” (Figura 11). Padronizou-se a distribuição das soluções nas placas da seguinte maneira:

- Fileiras “A” e “B”- Digluconato de clorexidina a 2%, totalizando 24 poços.
- Fileira “C”- Perioquil®, totalizando 12 poços
- Fileira “D”- Endoquil®, totalizando 12 poços
- Fileiras “E” e “F”- Mistura de Ésteres derivados do óleo de mamona parcialmente hidratado, totalizando 24 poços.

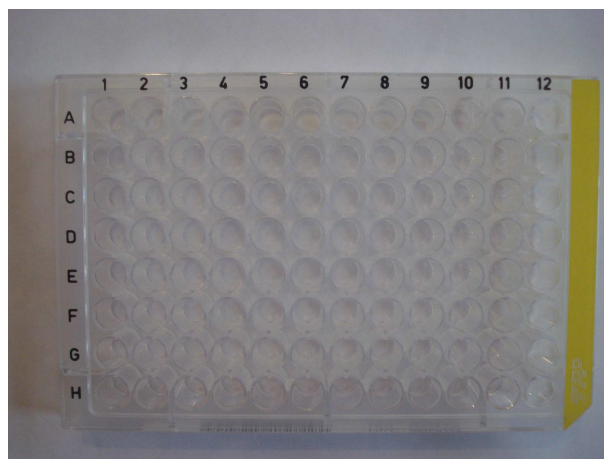


Figura 11: Placa de 96 poços utilizada no método de microdiluição

Esta padronização foi realizada após um estudo piloto em que se determinou a quantidade de poços necessária para que se pudesse observar as diluições inibitórias máximas das soluções sobre cada microorganismo.

Inicialmente cada poço recebeu 100µL de caldo Mueller-Hinton, distribuídos com ponteiros esterilizados. Em seguida 100µL da droga foram adicionados ao primeiro casulo de sua fileira, fazendo-se então a diluição seriada com fator 2, pipetando-se 100µl do casulo inicial, após homogeneização, para o segundo casulo e assim por diante. As diluições seriadas com fator 2, seguiram portanto a seguinte seqüência : 1:2 (1º poço); 1:4 (2º poço); 1:8 (3º poço);1:16 (4º poço) e assim por diante.

Uma vez realizada a distribuição das drogas, cada poço recebeu 50µL do inoculo padronizado. A padronização foi realizada através de leitura no espectrofotômetro, baseando-se na escala 0,5 de MacFarland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL. A placa de microdiluição foi então encubada em estufa a 37°C por 18 horas.

Após incubação, alíquotas de 10µL de cada poço foram transferidas para tubos 13X10mm contendo 3mL de Caldo Mueller-Hinton. Estes tubos foram levados à estufa a 37°C para confirmação da leitura observada na microplaca.

Na placa, após a retirada das alíquotas, devido à impossibilidade de análise visual direta, adicionou-se a cada orifício 30 µL de resazurina a 2%. A resazurina é um indicador de óxido-redução que facilita verificar a presença de crescimento dos

microorganismos em volumes bastante pequenos sem o uso de espectrofotômetro. Quando adquire coloração azul indica ausência de crescimento, enquanto a cor rosa indica a presença de células viáveis (Figura 12).

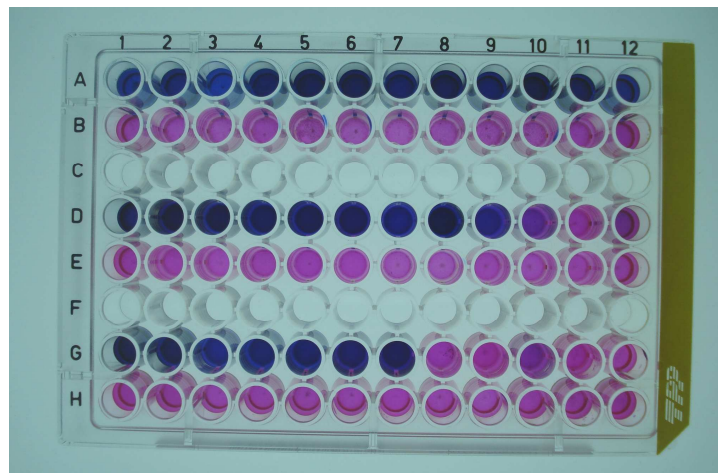


Figura 12: Placa de microdiluição após aplicação de resazurina. Poços corados de azul não apresentam crescimento microbiano. Poços corados de rosa apresentam células microbianas viáveis.

Imediatamente após a adição do corante a placa foi encubada em estufa a 37°C por aproximadamente 4 horas, quando foi então realizada a leitura dos orifícios. O último poço a adquirir coloração azul foi considerado o poço correspondente à diluição inibitória máxima da solução na placa de 96 orifícios.

Os tubos, por sua vez, foram avaliados quanto à ausência ou presença de crescimento bacteriano após 48 horas de incubação, como forma de confirmação da leitura verificada na placa. Esta avaliação foi realizada através de análise visual, observando-se a presença ou ausência de turvação do meio. A turvação indica a ocorrência de crescimento (Figura 13). O último tubo em que se observou ausência de turvação foi considerado correspondente à diluição inibitória máxima.

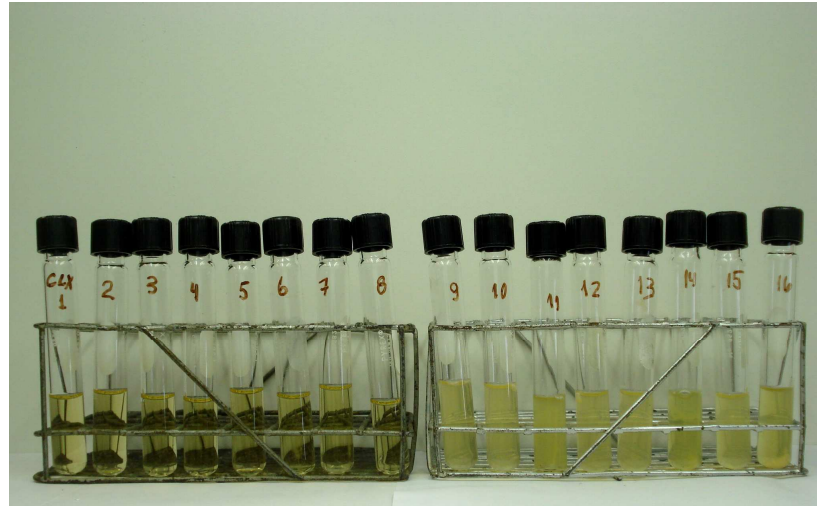


Figura 13: Tubos de ensaio 13X10 mm após transferência de 10 μ l de cada orifício da placa e incubação. (Observe a ausência de turvação do meio nos tubos de 1 a 8 e a presença de turvação, indicando crescimento microbiano, nos tubos de 9 a 16).

5- Resultados

5) RESULTADOS

5.1) DIFUSÃO EM ÁGAR:

A mistura de ésteres derivados do óleo de mamona parcialmente hidratado apresentou halos de inibição quando em contato com as bactérias Gram-positivas *Enterococcus faecalis* ($20,00 \pm 0,81\text{mm}$), *Staphylococcus aureus* ($19,25 \pm 0,95\text{mm}$) e *Staphylococcus epidermidis* ($14,25 \pm 0,50\text{mm}$).

Endoquil® e **Perioquil®** exibiram halos inibitórios para a bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis* de $13,00 \pm 1,15\text{mm}$ e $15,25 \pm 1,89\text{mm}$, respectivamente. (Figura 14).

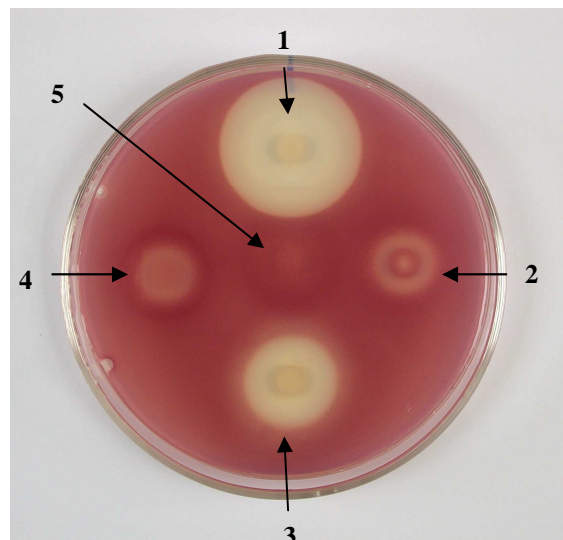


Figura 14: Halos inibitórios apresentados pelas soluções frente ao *Enterococcus faecalis* : 1) digluconato de clorexidina a 2% 2) Perioquil® 3) Mistura de ésteres de mamona parcialmente hidratado 4) Endoquil®. O disco embebido com água destilada (5) não apresentou halo de inibição.

A solução de **digluconato de clorexidina a 2%**, utilizada como controle positivo, apresentou halos de inibição frente a todos os microorganismos estudados (Figura 15). O diâmetro dos halos variou de $16,25 \pm 0,95$ mm para *Pseudomonas aeruginosa* a $31,50 \pm 1,29$ mm frente à bactéria *Enterococcus faecalis*.

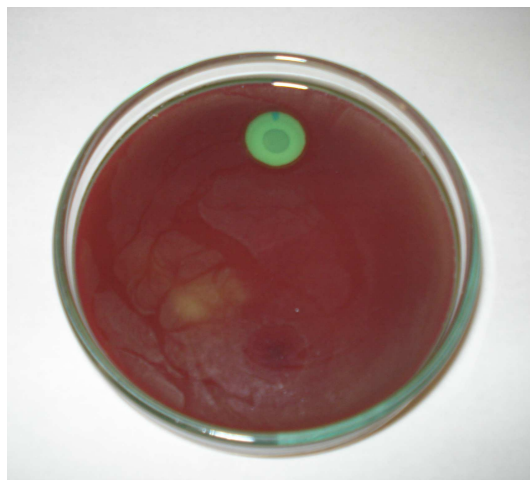


Figura 15: Halo inibitório apresentado pela solução de digluconato de clorexidina a 2% frente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Nesta figura observa-se também que os discos embebidos com as outras soluções testadas não apresentaram halos inibitórios e foram encobertos pela coloração do crescimento bacteriano com o corante cloreto de trifeniltetrazolium (TTC).

O controle negativo utilizado foi a água destilada, que não exibiu halos de inibição.

Os resultados dos diâmetros dos halos de inibição observados na metodologia de difusão em ágar encontram-se dispostos na tabela 1.

Tabela 1: Médias e desvios-padrão dos diâmetros dos halos de inibição (em mm) exibidos por cada uma das soluções testadas frente aos microrganismos utilizados.

Microorganismos	Média ± DPM do halo de inibição			
	CLX 2% (Controle positivo)	SOLUÇÕES TESTE		
		Éster parcialmente hidratado	Perioquil	Endoquil
<i>C. albicans</i>	25,00±0,81	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
<i>E.coli</i>	17,50±0,57	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
<i>E.faecalis</i>	31,50 ±1,29	20,00±0,81	15,25±1,89	13,00±1,15
<i>P.aeruginosa</i>	16,25±0,95	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
<i>S.aureus</i>	28,75±0,50	19,25±0,95	0,0±0,0	0,0±0,0
<i>S.epidermidis</i>	29,50±1,29	14,25±0,50	0,0±0,0	0,0±0,0

5.1) MICRODILUIÇÃO EM CALDO:

Os resultados obtidos com o método de microdiluição em caldo encontram-se dispostos a seguir. Na Tabela 2 apresentam-se os resultados observados na **placa de microdiluição**. Foram tabuladas a diluições inibitórias máximas de cada uma das soluções testadas.

Tabela 2: Avaliação da placa de microdiluição. Diluição inibitória máxima das soluções avaliadas

Microorganismos	CLX 2% (Controle positivo)	SOLUÇÕES TESTE		
		Éster parcialmente hidratado	Perioquil	Endoquil
<i>C. albicans</i>	4096	512	*	*
<i>E.coli</i>	4096	*	*	*
<i>E.faecalis</i>	128	128	*	*
<i>P.aeruginosa</i>	1024	*	*	*
<i>S.aureus</i>	4096	1024	*	*
<i>S.epidermidis</i>	32768	32768	*	*

* - Observou-se crescimento microbiano em todos os poços. Não se aplica, portanto, o conceito de diluição inibitória máxima.

Na Tabela 3 encontram-se dispostos os resultados obtidos com a avaliação dos **tubos 13X10mm**. Foram tabulados os tubos correspondentes à diluição inibitória máxima de cada uma das soluções testadas.

Tabela 3: Avaliação dos tubos 13x10mm. Diluição inibitória máxima das soluções avaliadas.

Microorganismos	CLX 2% (Controle positivo)	SOLUÇÕES TESTE		
		Éster parcialmente hidratado	Perioquil	Endoquil
<i>C. albicans</i>	4096	*	*	*
<i>E.coli</i>	1024	*	*	*
<i>E.faecalis</i>	128	64	*	*
<i>P.aeruginosa</i>	256	*	*	*
<i>S.aureus</i>	2048	2	*	*
<i>S.epidermidis</i>	64	32	*	*

* - Observou-se crescimento microbiano em todos os tubos. Não se aplica, portanto, o conceito de diluição inibitória máxima

Nesta metodologia, a solução de **digluconato de clorexidina a 2%** inibiu o crescimento de todos os microorganismos testados. Na placa de microdiluição, as DIM da solução variaram de 128 para o *Enterococcus faecalis* até 32768 para o *Staphylococcus epidermidis*. Comparando-se os resultados da placa e dos tubos para a clorexidina, observa-se que a DIM foi a mesma apenas para *Candida albicans* (4096) e para o *Enterococcus faecalis* (128) . Para os demais microorganismos, a DIM foi menor nos tubos que na placa de microdiluição.

A **mistura de ésteres derivados do óleo de mamona parcialmente hidratado** apresentou, na placa de microdiluição, atividade antimicrobiana sobre as

bactérias gram-positivas *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e para a levedura *Candida albicans*. As DIM foram respectivamente 128, 1024, 32768 e 512. Nos tubos observou-se ação sobre *Enterococcus faecalis* (DIM 64), *Staphylococcus aureus* (DIM 2) e *Staphylococcus epidermidis* (DIM 32). Nota-se que, para todos os microorganismos em que se observou ação da substância, a DIM foi menor nos tubos que na placa.

Endoquil® e **Perioquil®**, não exibiram ação antimicrobiana sobre nenhum dos microorganismos testados tanto na placa de microdiluição quanto nos tubos.

6-Discussão

6) DISCUSSÃO

É fato comprovado que as doenças que acometem a cavidade bucal são de origem infecciosa. Dependendo de fatores tais como a dieta e a remoção mecânica regular da placa, o tipo de microbiota predominante pode variar. Em indivíduos que mantêm uma adequada higiene oral e fazem uso comedido da sacarose, a microbiota predominante pode ser menos patogênica, podendo o indivíduo possuir placa, e ainda assim ter saúde. Todavia, quando a remoção mecânica do biofilme é deficiente ocorre uma sucessão de organismos patogênicos e a placa adquire potencial, podendo resultar tanto em lesões de tecido duro (cáries), quanto de tecido mole (doenças periodontais) (CURY, 1997).

Na vigência de processos infecciosos já consolidados, o profissional deverá agir de forma terapêutica, adotando medidas tanto de controle mecânico quanto químico da microbiota, de forma a restabelecer seu equilíbrio o mais prontamente possível. Neste sentido, em muitas situações clínicas em Odontologia, a utilização de antissépticos se faz necessária (LINDHE, 1999).

Alguns fatores merecem ser destacados em relação à metodologia empregada neste trabalho.

Os microrganismos utilizados nesta pesquisa constituíram-se de cepas de referência para o estudo da atividade antimicrobiana, sendo também utilizadas por outros autores (ESTRELA et al., 1998; AYHAN et al., 1999; HAAPASALO et al, 2000).

Os testes de sensibilidade antimicrobiana de substâncias odontológicas têm se mostrado úteis tanto na orientação do tratamento clínico como nos estudos que investigam o efeito antimicrobiano de substâncias odontológicas utilizadas para controle microbiano. Atualmente existem várias técnicas para definir se determinadas substâncias possuem atividade antimicrobiana, desde as mais simples, que podem ser realizadas rotineiramente, até as mais sofisticadas, que muitas vezes se tornam indisponíveis em alguns laboratórios (ALVES et. al,2007).

A escolha da metodologia a ser utilizada em qualquer experimento científico pode influenciar consideravelmente nos resultados obtidos. Assim, sempre que possível, deve-se aliar dois ou mais métodos para se obter interpretações mais confiáveis dos dados coletados. Desta forma, utilizou-se no presente trabalho duas metodologias de avaliação da ação antimicrobiana: difusão em ágar e microdiluição em caldo. Ambas as técnicas apresentam vantagens e desvantagens.

Há vários problemas relacionados ao teste de difusão em ágar, sendo a maior desvantagem a ausência de distinção entre propriedades bactericidas e bacteriostáticas de materiais dentários. Além disso, este teste requer cuidadosa padronização da densidade do inóculo, conteúdo de meio, viscosidade do ágar, número e tamanho dos espécimes contidos em cada placa (TOBIAS, 1988). Outras variáveis, segundo TOBIAS (1988), que podem influenciar nos resultados observados quando se utiliza este método são:

- *Contato*: É importante que exista um bom contato entre o material testado e o meio de cultura. Esta variável se aplica particularmente a testes com materiais sólidos.

- *Difusibilidade*: A taxa de difusão do agente antibacteriano depende do seu peso molecular, de sua carga, da concentração do agente no material testado, viscosidade do ágar, da temperatura e da concentração iônica do meio.
- *Densidade do inóculo*: É importante controlar e padronizar a densidade do inóculo para que se produzam resultados reprodutíveis e confiáveis.
- *Tempo*: O tamanho da zona de inibição deve ser medido tão logo os microorganismos comecem a se multiplicar.
- *Escolha do ágar*: A capacidade nutritiva do ágar influencia a taxa de crescimento dos microorganismos. Um meio que permita um crescimento muito rápido dos microorganismos testados não é ideal já que pode provocar uma falsa redução do tamanho da zona de inibição. Já um meio que permite taxas de crescimento muito lentas pode produzir halos de inibição maiores, dando a falsa impressão de melhor atividade antimicrobiana do produto testado.
- *Temperatura*: As placas inoculadas devem ser incubadas a 37°C. Caso não se atinja a temperatura correta pode haver um atraso no crescimento e multiplicação dos microorganismos o que resultaria em uma leitura errada dos halos de inibição.

No teste de difusão em agar o tamanho da zona de inibição estará diretamente relacionado à solubilidade e a difusibilidade da substância testada (SIQUEIRA JR *et al.*, 1998; ESTRELA, 2000). Como o método não oferece condições de igualdade para se comparar substâncias com solubilidade e difusibilidade distintas (ESTRELA, 2000), os halos de inibição apresentados pelas diferentes substâncias, neste estudo,

não foram comparados entre si. Levou-se em consideração apenas a inibição ou não do crescimento dos microorganismos testados por cada uma das substâncias, embora SIQUEIRA JR (1998) tenha utilizado estas medidas para classificar a efetividade das substâncias por ele testadas.

O método de diluição em caldo é comumente utilizado para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano. Nos laboratórios de diagnóstico é útil como uma ferramenta de pesquisa para determinar a atividade *in vitro* de novos antimicrobianos. Esta técnica também apresenta algumas desvantagens como o fato de só poder ser utilizada para avaliar substâncias solúveis ao meio de cultura. Além disso, a determinação da concentração inibitória mínima é extremamente método-dependente, portanto os resultados devem ser observados com cautela, visto desconhecer-se como o medicamento interage com o meio, o que afeta o crescimento bacteriano. Outro fator que deve ser considerado é que as condições utilizadas em laboratório para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) ou a diluição inibitória máxima (DIM) não representam a realidade de crescimento *in vivo*, onde bactérias crescem em comunidade formando um biofilme (ALVES et. al, 2007).

O gluconato de clorexidina é uma das substâncias antimicrobianas mais utilizadas em Odontologia sendo comprovadamente efetiva contra um grande número de microorganismos Gram-negativos e Gram-positivos, leveduras, anaeróbios estritos e facultativos (GOMES *et al.* 2001, VIANNA *et al.* 2004). Sua ação é resultado de sua adsorção à parede bacteriana, alterando sua estrutura e ocasionando um extravasamento de componentes intracelulares. É bacteriostático

em baixa concentração, e bactericida em altas concentrações. Além disso, é adsorvido pelos tecidos dentais e mucosas, resultando numa prolongada e gradual liberação (ERCAN *et al.*, 2004; HAUMAN, LOVE, 2003; ÖNÇAG *et al.*, 2003).

Diversos autores avaliaram a eficácia antimicrobiana da clorexidina em estudos *in vitro*, utilizando diferentes formas de apresentação da substância, concentrações e metodologias (SASSONE *et. al*, 2008; FERRAZ *et. al*, 2007; ESTRELA *et. al*, 2003). Analisando-se os resultados obtidos no presente trabalho, observou-se que a solução de digluconato de clorexidina a 2% apresentou, nas duas metodologias utilizadas, ação antimicrobiana sobre todos os microorganismos testados, confirmando os dados da literatura consultada.

A procura por novas substâncias, principalmente de origem animal, vegetal ou mineral tem sido atualmente enfocada em todas as áreas de pesquisa e recomendada pela Organização Mundial de Saúde (FERREIRA, 1999). Nesse sentido destacam-se as soluções derivadas do óleo da mamona desenvolvidas no Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Os trabalhos já publicados utilizando estas soluções irrigadoras parecem concordar que, utilizando metodologias *in vitro*, e bactérias isoladas, as soluções atuam inibindo microorganismos Gram-positivos (ITO *et. al*, 1999; BONIFÁCIO *et. al*, 2000; LEONARDO *et. al*, 2001). Entretanto, quando se compara estes trabalhos, os resultados são bastante variáveis sobre quais bactérias Gram-positivas são inibidas. Isso talvez possa ser explicado pela variedade de metodologias que são utilizadas.

Com relação aos resultados do presente trabalho, observando-se a ação das substâncias sobre as bactérias testadas nota-se que, no método de difusão em ágar,

a mistura de ésteres orgânicos derivado do óleo de mamona parcialmente hidratado apresentou halos de inibição frente a todas as bactérias Gram-positivas testadas e não inibiu os bacilos Gram-negativos. A levedura *Candida albicans* não foi inibida. Endoquil® e Perioquil®, por sua vez, exibiram halos de inibição sobre a bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis*.

Já na metodologia de microdiluição em caldo a mistura de ésteres parcialmente hidratado apresentou atividade antimicrobiana sobre as mesmas bactérias Gram-positivas e também sobre a levedura *Candida albicans*. Nesta metodologia Endoquil® e Perioquil® não apresentaram atividade sobre nenhum dos microorganismos estudados.

Nas placas, não é possível verificar se ação antimicrobiana das substâncias foi bacteriostática ou bactericida. Entretanto, no teste de microdiluição, ao transferirmos a alíquota de 10µl da placa para os tubos pudemos avaliar se houve algum poço em que a substância teve ação bacteriostática. A mistura de ésteres derivados do óleo de mamona parcialmente hidratada, por exemplo, exibiu DIM de 128 (7º poço) na placa de microdiluição, sobre o *Enterococcus faecalis*. Nos tubos, a DIM para esta bactéria foi 64 (6º tubo). No 7º poço da placa, portanto, a ação do éster foi bacteriostática para o *Enterococcus faecalis*. A mesma análise pode ser feita para os outros microorganismos. O que se observou, de maneira geral, foi que a DIM foi a mesma, quando se comparou placa de microdiluição e tubos, para a clorexidina frente aos microorganismos *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. Nas demais situações em que houve ação antimicrobiana a DIM foi sempre menor nos tubos que na placa. Isto indica que, nestes casos, em maiores diluições as substâncias apresentavam ação bacteriostática sobre os microorganismos estudados.

É importante ressaltar que os ésteres orgânicos derivados do óleo de mamona comprovadamente hidrolisam polissacarídeos (OLIVEIRA, 2005). Um exemplo destes polissacarídeos é o N-acetil- D- glicosamina e o ácido- acetilmurâmico, que constituem a parede celular das bactérias. A ação da mistura de ésteres sobre a parede celular bacteriana, hidrolisando-a, é citada como mecanismo de ação da substância. Por outro lado, o meio de cultura utilizado no presente estudo contém em sua composição um polissacarídeo: o amido (Anexo A). Desta maneira além de atuarem sobre a parede celular das bactérias estudadas as substâncias testadas podem ter agido também sobre o meio de cultura, diminuindo assim a efetividade observada sobre os microorganismos. A grande dificuldade encontrada para a pesquisa da ação dos ésteres derivados da mamona é que os meios de cultura atualmente utilizados em microbiologia são compostos por polissacarídeos, já que estes são de fundamental importância para a nutrição microbiana. Os resultados encontrados em estudos *in vitro*, portanto, podem não reproduzir a atuação da substância *in vivo*.

Devemos ainda destacar que os resultados encontrados em estudos *in vitro*, com bactérias isoladas, devem ser cuidadosamente avaliados, considerando-se que as infecções odontológicas são mistas e apresentam interações microbianas complexas. Além disso, apesar de em metodologias *in vitro* observar-se ação das soluções derivadas do óleo da mamona apenas sobre Gram-positivos, existem trabalhos que relatam uma redução da microbiota do canal radicular *in vivo* quando se utiliza estas soluções (FERREIRA, 1999). Esta redução do número de unidades formadoras de colônia pode ser explicada por uma possível ação no biofilme causando sua dissolução. Devemos lembrar que os microorganismos, ao se

organizarem em comunidades nos biofilmes, possuem uma dependência nutricional. Qualquer alteração nesta organização pode levar a morte de toda a comunidade.

7- Conclusões

7) CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

- 1) No teste de difusão em agar a mistura de ésteres derivada do óleo de mamona parcialmente hidratado inibiu o crescimento das bactérias Gram-positivas *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Perioquil® e Endoquil® exibiram atividade antimicrobiana sobre a bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis*.
- 2) Na placa de microdiluição a mistura de ésteres derivada do óleo de mamona parcialmente hidratado inibiu o crescimento das bactérias Gram-positivas *Enterococcus faecalis* (DIM 128), *Staphylococcus aureus* (DIM 1024), *Staphylococcus epidermidis* (DIM 32768) e da levedura *Candida albicans* (DIM 512). Nos tubos as DIM foi menor para todos os microorganismos, evidenciando que, em maiores diluições na placa, a substância apresentou ação bacteriostática. Endoquil® e Perioquil® não exibiram ação antimicrobiana nesta metodologia.
- 3) Comparando-se os testes de difusão em ágar e microdiluição em caldo conclui-se que ambos são úteis para uma melhor compreensão da atividade antimicrobiana e que sempre que possível devem ser utilizados em conjunto para uma interpretação mais confiável dos resultados obtidos.

Anexos

ANEXO A - Composição dos meios de cultura utilizados.

- Mueller-Hinton – MH (Merck®) – Utilizado para pesquisa de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Composição:

Infusão de carne bovina -----	300,0 g
Peptona ácida -----	17,5 g
Amido -----	1,5 g

- Mueller-Hinton ágar – MHa (Merck®) - Utilizado para pesquisa de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Composição:

Infusão de carne bovina -----	300,0 g
Peptona ácida -----	17,5 g
Amido -----	1,5 g
Agar -----	17,0 g

ANEXO B - Avaliação da placa de microdiluição. Poços correspondentes à diluição inibitória máxima das soluções avaliadas

Microorganismos	CLX 2% (Controle positivo)	SOLUÇÕES TESTE		
		Éster parcialmente hidratado	Perioquil	Endoquil
<i>C. albicans</i>	12º poço	9º poço	*	*
<i>E.coli</i>	12º poço	*	*	*
<i>E.faecalis</i>	7º poço	7º poço	*	*
<i>P.aeruginosa</i>	10º poço	*	*	*
<i>S.aureus</i>	12º poço	10º poço	*	*
<i>S.epidermidis</i>	15º poço	15º poço	*	*

* - Observou-se crescimento microbiano em todos os poços. Não se aplica, portanto, o conceito de diluição inibitória máxima.

ANEXO C - Avaliação dos tubos 13X10mm. Tubos correspondentes à diluição inibitória máxima das soluções avaliadas.

Microorganismos	CLX 2% (Controle positivo)	SOLUÇÕES TESTE		
		Éster parcialmente hidratado	Perioquil	Endoquil
<i>C. albicans</i>	12° tubo	*	*	*
<i>E.coli</i>	10° tubo	*	*	*
<i>E.faecalis</i>	7° tubo	6° tubo	*	*
<i>P.aeruginosa</i>	8° tubo	*	*	*
<i>S.aureus</i>	11° tubo	1° tubo	*	*
<i>S.epidermidis</i>	6° tubo	5° tubo	*	*

* - Observou-se crescimento microbiano em todos os tubos. Não se aplica, portanto, o conceito de diluição inibitória máxima

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ADDY, M. Anti-sépticos na Terapia Periodontal. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 332-349, 1999

- 2- ALMYROUD, A.; MACKENSIE, D; MCHUGH, S; SAUNDERS, W.P. The effectiveness of various desinfectants used as endodontic intracanal medications: an in vitro study. **Journal of Endodontics**. n.2, p. 163-167,2002

- 3- ALVES, E.G; VINHOLIS, A.H.C; CASEMIRO, L.A ; FURTADO, N.A.J.C; ANDRADE E SILVA, M.L; CUNHA, W.R ; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quimica Nova**, vol XY, n.00, p. 1-6, 2007

- 4- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Consensus report Proceedings of the 1996 World Workshop in Periodontics. **Annals of Periodontology**, v. 1, p. 926–932, 1996.

- 5- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. International Workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. **Annals of Periodontology**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 1999.

- 6- ANDEWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n.1, p. 13-15, 2005

- 7- AYHAN,H.; SULTAN, N.; CIRAK, M.; RUHI, M.Z.; BODUR, H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. **International Endodontic Journal**, v. 32,p. 99-102, 1999

- 8- AZEVEDO, P.E.S; GUEIROS, G.V.T.; FREIRE, V.G.; CHIERICE, G.O. Uso da membrana de polímero de mamona em regeneração óssea guiada em defeitos ao redor de implantes osseointegrado. **Revista Brasileira de Implantodontia** , v.3, n.6, p. 8-12, 1997.

9- BADERSTEN, A; NILVÉUS, R; EGELBERG, J. Effect of non-surgical periodontal therapy.II. Severely advanced periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, n 8, p. 63-76, 1984.

10- BAUER, A.W; KIRBY, W.M.M; SHERRIS, J.C; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

11- BAUMGARTNER, I.C; CUENIN, P.R. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. **Journal of Endodontics**. V. 18, p. 605-612, 1992.

12- BONIFÁCIO, K.C.; LEONARDO, M.R.; TANOMARU FILHO, M.; DA SILVA, L.A.B.; ITO, I.Y. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras em pregadas em endodontia. In: Reunião da SBPqO, 16., 1999, Águas de São Pedro. **Resumos da 16ª Reunião da SBPqO**, Águas de São Pedro, p.16, resumo A042, 1999

13- BRAATZ, L.; GARRET,S.; CLAFFEY, N.; EGELBERG, J. Antimicrobial irrigation of deep pockets to supplement non surgical periodontal therapy. Daily irrigation. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 12, p.66-74, 1985

14- BRISEÑO, B.M; WIRTH, R; HAMIN, G; STANDHARTINGER, W. Efficacy of different irrigation methods and concentrations of root canal irrigation solution on bacteria in root canal. **Endodontic Dental Traumatology**, v.8, p. 6-11, 1992

15- BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scandinavian Journal of Dental Research**, n. 89, p. 321-328, 1981

16- BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriological evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. **Oral Surgery**, V.55, p. 307-312, 1983.

17- CALIXTO, R.F.E.; TEÓFILO, J.M.; BRENTAGANI, L.G.; LAMANO CARVALHO, T.L. Implante de um floculado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.15, n.3, p. 257-262, jul./set. 2001

- 18- CHEUNG, G.S; STOCK, C.J. In vitro cleaning ability of root canal irrigants with and without endosonics. **International Endodontic Journal**, v.26, n.6, p. 334-43, 1993
- 19- CLARKSON, R.M.; MOULET, A.J. Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. **Australian Dental Journal**, v.4, n.43, p.250-256, 1998.
- 20- CLARO NETO, S. **Caracterizações físico-químicas de um poliuretano derivado de óleo de mamona utilizado para implantes ósseos**. São Carlos, 127p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1997.
- 21- COOB, C.M.; RODGERS, R.L; KILLOY, W.J. Ultrastructural examination of human periodontal pockets following the use of an oral irrigation device in vivo. **Journal of Periodontology**, v.59, p. 155-163, 1988.
- 22- COLLINS, J.G; OFFENBACHER, S; ARNOLD, R.R. Effects of a combination therapy to eliminate *Porphyromonas gingivalis* in refractory periodontitis. **Journal of Periodontology**,; v. 64, p. 998-1007, 1993
- 23- COSTA, C.A.S.; MARCANTONIO, R.A.C.; HEBLING,J.; TEIXEIRA KURAMAE, H.M.M. Biocompatibilidade do polímero de poliuretano vegetal derivada do óleo de mamona em estudo comparativo com cimento de óxido de zinco e eugenol. Avaliação histopatológica de implantes subcutâneos de ratos. **Odonto 2000**, v.1, n.1, p. 44-48, 1997
- 24- COSTA, H.M.. Effects from the castor oil on sílica-filled natural rubber compounds. **Polímeros**, v.14, p.46-50, 2004.
- 25- CUMMING, B.R; LÖE H. Optimal dosage and method of delivering chlorhexidine solutions for the inhibition of dental plaque. **Journal of Periodontal Research**., v. 8, n.2, p. 57-62, 1973
- 26- CURY, J.A. Controle químico da placa dental. In : KRIGER,L. (Coord.). ABOPREV : Promoção de saúde bucal. SãoPaulo : Artes Médicas,Cap.7, p.129-140,1997

27- DELANY, G.M; PATTERSON, S.S.; MILLER, C.H.; The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 53, p. 518-22, 1982

28- DONTOS, A.C. **Fio lifting biológico (fio serrilhado de poliuretana do óleo de mamona): avaliação de sua biocompatibilidade e eficácia no rejuvenescimento facial**. São Carlos, 2005. 92p. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia d São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2005.

29- EAKLE, W; FORD, C; BOYD R. Depth of penetration in periodontal pockets with oral irrigation. **Journal of Clinical Periodontology**, v.13, p. 39–44, 1986

30- ERCAN, E; OZEKINCI, T; ATAKUL, F; GÜL, K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal:In vivo study. **Journal of Endodontics.**, v. 30, p. 84-87, 2004

31- ERENO, D. Polímero derivado de óleo vegetal, sintetizado por químico de São Carlos, ganha mercado internacional. **Revista Pesquisa Fapesp**, Edição Impressa 91 - Setembro 2003.

32- ESTRELA, C. ; PIMENTA, F.C. ; ITO, I.Y.; BAMMANN, L.L. *In vitro* determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, v. 24, n. 1, p. 15-17, Jan.1998.

33- ESTRELA, C.R.A **Eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras de canais radiculares**. 2000. 88p., Dissertação (Mestrado em Microbiologia)- Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2000

34- ESTRELA,C.; RIBEIRO,R.G.; ESTRELA, C.R.A.; PÉCORÁ,. J.D.; SOUSA-NETO, M.D. Antimicrobial Effect of 2% Sodium Hypochlorite and 2% Chlorexidine tested by different methods. **Brazilian Dental Journal**, v. 14, n. 1, 2003

35- FERRAZ, C.C.R; GOMES, B.P.F.A; ZAIA A.A; TEIXEIRA F,B; SOUZA-FILHO F.J. In vitro assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **Journal of Endodontics**. v 7,p. 452-455, 2001.

36- FERRAZ, C.C.R.; GOMES, B.P.F.A; ZAIA A.A; TEIXEIRA F,B; SOUZA-FILHO F.J. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine solution and

sodium hypochlorite as endodontics irrigants. **Brazilian Dental Journal**, v.18, n.4,p. 294-298, 2007.

37- FERREIRA, C.M. Evaluation of the antimicrobial activity of three irrigants solutions in teeth with pulpar necrosis. **Brazilian Dental Journal**, v.10, n.1, p. 15-21,1999a

38- FERREIRA, C.M. **Avaliação “in vitro” da atividade antimicrobiana de substâncias utilizadas em endodontia sobre bactérias anaeróbias**. Bauru, 1999. 117p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 1999b

39- FIGUEIREDO, A.S; FAGUNDES, D.J;NOVO, N.F; INOUE, C.M; TAKITA, L.C; SASSIOTO, M.C.P Osteointegração de osso bovino desvitalizado, hidroxiapatita de coral, poliuretana de mamona e enxerto ósseo autógeno em coelhos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, vol. 19, n.4, July/Aug. 2004

40- FLEISCHER, W; REIMER, K. Povidone Iodine in antisepsis – state of the art. **Dermatology**., v. 70, p. 1397-1405, 1997.

41- FUENTEFRIA,N.; BRITO,J.H.M.; WEISMANN,R. Avaliação histológica da reação tecidual frente a implante de poliuretana vegetal, na tíbia de rato. **Revista Odonto Ciência**, v.13, n.26, p. 29-49, 1998

42- GREENSTEIN, G. Periodontal response to mechanical non-surgical therapy: A review. **Journal of Periodontology**., v. 63, p. 118-130, 1992

43- GOMES, B.P.F.A; FERRAZ, C.C.R; VIANNA, M.E; BERBER, V.B; TEIXEIRA, F.B, SOUZA-FILHO, F.J. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and clorexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal** v.34,p. 424-428, 2001.

44- GOMES, B.P.F.A; PEDROSO, J; JACINTO, R.C, VIANNA, M.E; FERRAZ, C.C.R; ZAIA, A.A; SOUZA-FILHO, F.J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. **Brazilian Dental Journal** v.15, n.1, p. 30-35, 2004.

45- GOODSON, J. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. **Journal of Dental Research**, v.68, p. 1625–1632, 1989.

- 46- HAAPASALO, H. K.; SIRÉN, E. K.; WALTIMO, T.M.T.et al. Inactivation of local root canal medicaments by dentine; an *in vitro* study. **International Endodontic Journal**, v. 33, n. 2, p. 126-131, 2000.
- 47- HASKEL, E.; ESQUENASI, J.; YUSSIM, L. Effects of subgingival chlorhexidine irrigation in chronic moderate periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 57, p. 305-310, 1986
- 48- HAUMAN, C.H.J; Love, R.M. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. **International Endodontic Journal**, v. 36, p.75-85, 2003.
- 49- HOANG T, JORGENSEN MG, KEIM RG, PATTISON AM, SLOTS J. Povidone-iodine as a periodontal pocket disinfectant. **Journal of Periodontal Research**. v. 38, n. 3, p. 311-317, 2003
- 50- IGNÁCIO,H.; MAZZER,N.; BARBIERI, C.H.; CHIERICE,G.O. Utilização da poliuretana da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falha óssea: estudo experimental em cães. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.37, n.5, p.187-194, 2002
- 51- ITO, I.Y.; FRÖNER, I.C.; MIAN, H.; CHIERICE, G.O. Castor oil: antimicrobial activity of detergent derived from ricinolic acid. **Journal of Dental Research**, v.78, p.344, abstract 1906, Mar. 1999.
- 52- JORGENSEN, M.G.; AALAM, A.; SLOTS,J. Periodontal antimicrobials-finding the right solutions. **International Dental Journal**, v.55, n.1, p. 3-12, 2005.
- 53- JUNG, I.Y; CHOI, B.K; KUM, K.Y; LEE, S.J; LEE, C.Y; PARK, D.S. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. **Journal of Endodontics**, v.26, p.599-604, 2000.
- 54- KAUFMAN, A.Y; KEILA, S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. **Journal of Endodontics** , v. 15, p.224-226, 1989.
- 55- KÖNIG, B; REIMER, K; FLEISCHER, W; KÖNIG, W. Effects of Betaisodona® on parameters of host defense. **Dermatology**., v. 195, Suppl 2, p. 42-48, 1997.

- 56- KÖNIG JÚNIOR,B.; FORGER,S.E.; MASCARO, M.B.; BECK, T.J. Biocompatibility of the polyurethane resin of the castor bean inserted into the alveolar bone of the dog. **Annals of Anatomy**, v.6, n. 181, p. 581-584, 1999
- 57- KUNISADA, T; YAMADA, K; ODA, S; HARA, O. Investigation on the efficacy of povidone-iodine against antiseptic-resistant species. **Dermatology**, v. 195, Suppl 2, p. 14-18, 1997
- 58- LAMANO CARVALHO, T.L.; ARAÚJO, C.A.C.A; TEÓFILO, J.M.; BRENTGANI, L.G. Histologic and histometric evaluation of rat alveolar wound healing around polyurethane resin implants. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery** v.26, p. 149-152, 1997a
- 59- LAMANO CARVALHO, T.L.; TEÓFILO, J.M.; ARAÚJO, C.A.C.A; BRENTGANI, L.G. Chronology of alveolar healing following immediate implantation of *Ricinus communis* polyurethane resin: Histometric analyses in rats. **Journal of Biomedic Material Research**, v.37, n.4, p. 449-452, 1997b.
- 60- LANKER KLOSSNER, B; WIDMER, H.R; FREY, F. Nondevelopment of resistance by bacteria during hospital use of povidone-iodine. **Dermatology**,v. 195, Suppl 2, p.10-13, 1997
- 61- LAZZARO, A.J.; BISSADA, N.F. Clinical and microbiologic changes following the irrigation of periodontal pockets with metronidazole or stannous fluoride. **Periodontology Case Report**, v.1, p. 12-19, 1989
- 62- LEONARDO,M.R; LEAL,J.M. **Endodontia**. Tratamento de canais radiculares. 2. ed.São Paulo, Panamericana,1991
- 63- LEONARDO,M.R; SILVA, L.A.B; TANOMARU FILHO, M.; BONIFÁCIO, K.C. ITO, IY. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. **Journal of Endodontics**,v.27, n.12, p.717-719, 2001
- 64- LEONEL, E.C.F.; MANGILI, P.D.; RAMALHO, L.T.O.; SOBRINHO, J.A. A importância da porosidade interna do polímero de mamona durante a neoformação óssea- estudo em ratos. **Ciencia Odontológica Brasileira**, v.6, n.3, p.19-25, 2003
- 65- LEONEL,E.C.F.; et al. A ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.19, n.4, July/Aug., 2004

66- LINDER N, DAVIDOVITCH N, REICHMAN B. Topical iodine-containing antiseptics and subclinical hypothyroidism in preterm infants. **Journal of Pediatrics**, v.133, p. 309-319, 1998

67- LINDHE, J. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

68- LISTGARTEN, M.A; GROSSBERG, D; SCHWIMMER, C; VITO, A; GAFFAR, A. Effect of subgingival irrigation with tetrapotassium peroxydiphosphate on scaled and untreated periodontal pockets. **Journal of Periodontology**, v. 60, p. 4–11, 1989

69- LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S.B. Experimental gingivitis in man. **Journal of Periodontology**, v.36, p.177-187, 1965

70- LÖE, H; SCHIOTT, C.R. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. **Journal of Periodontology Research**, v. 5, n.2, p. 79-83, 1970

71- MACAULAY, W.J.; NEWMAN, H.N; The effect on the composition of subgingival plaque of a simplified oral hygiene system including pulsating jet subgingival irrigation. **Journal of Periodontal Research**, v.21, p. 375-385, 1986

72- MANTESSO,A; FRONER, I.C; CHIERICE, G.O.; JAEGER,M.M. in vitro cytotoxicity evaluation of mamona solutions. **Journal of Dental Research**, v. 79, n.5, p. 1075-1075, 2000.

73- MARRIOTTI, A.J.; RUMPF,D.A. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. **Journal of Periodontology**, v.70, p. 1443-1448, 1999.

74- MAYRAND, D. Virulence promotion by mixed bacterial infections. In: Jackson,G.G; Thomas,H. eds. **The pathogenesis of bacterial infections**, Berlin: Springer-Verlag, pp. 282-291, 1985

75- MENEGHIN, M.P. **Análise morfológica e morfométrica da capacidade de limpeza dos canais radiculares, submetidos ao preparo biomecânico com solução irrigante à base de Ricinus communis em comparação ao NaOCl a 1%** Ribeirão Preto, 2005, 84 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia, Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, 2005.

76- MILLER, W.D. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. **Dental Cosmos**, v. 36, p. 505-528, 1894.

77- NOBUKUNI, S; WATANABE, K; INAOUE, J.; NOBUKUNI, K; HAYAKAWA, N; NAMBA, R. The influence of long-term treatment with povidone-iodine on thyroid function. **Dermatology**, v. 195, Suppl 2, p. 69-72, 1997

78- OLIVEIRA, M.G.R **Estudo da decomposição de sacarose por hidrólise utilizando uma mistura de ésteres derivados do óleo de mamona**. São Carlos, 2005, 98p. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2005

79- ÖNÇAG, Ö; HOSGÖR, M; HILMIOGLU, S; ZEKIOGLU, O; ERONAT, C; BURHANOGLU, D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. **International Endodontic Journal.**, v. 36, p. 423-432, 2003.

80- PAGE, R. C.; SCHROEDER, H. E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. **Laboratory Investigation**, v. 33, p. 235-49, 1976.

81- PÉCORA, J.D.; MARCHESAN, M.; SOUZA NETO, M.D.; GUERISOLI, D.M.Z.; DA SILVA, R.S. Effects of Ricinus comunis detergent and pain gel on radicular permeability. **Journal of Israelian Dental Association**, v.17, n.2, p.9-11, Apr. 2000.

82- QUIRYNEN,M.; TEUGHEL,S,W.; SOETE,M.; STEENBERGHE,D. Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. **Periodontology 2000**, v.28, p.72-90, 2002.

83- ROSLINDO, N.C.; et al. Biocompatibilidade da resina poliuretana vegetal e germes dentários *in vitro*. **Revista de Odontologia Unesp**, v. 26, n.2, p.265-274, 1997

84- SAMPAIO, J.E. **Eficiência de detergentes e EDTA na remoção da smear layer de superfícies radiculares submetidas a raspagem e aplainamento. Análise através da microscopia eletrônica de varredura**. Araraquara, 67p., Tese (Livre-Docência)- Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 1999

- 85- SCHREIER, H; ERDOS, G; REIMER, K; KÖNIG, B; KÖNIG, W; FLEISCHER, W. Molecular effects of povidone-iodine on relevant microorganisms: An electronmicroscopic and biochemical study. **Dermatology**, v. 195, Suppl 2, p. 111-117, 1997.
- 86- SILVA, C. H. P. M.; *Bacteriologia: Um Texto Ilustrado*, Ed. Eventos: Teresópolis, 1999.
- 87- SIQUEIRA, D.C.R. **Avaliação comparativa in vivo da atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 1%, da clorexidina a 2% e do detergente derivado do óleo de mamona a 10%, utilizados como soluções irrigadoras em endodontia.** Bauru,135p.Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2005.
- 88- SIQUEIRA, J.R; UZEDA, M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. **Journal of Endodontics**, v. 23, p. 167-9, 1997.
- 89- SIQUEIRA Jr., J.F.; BATISTA, M.M.D.; FRAGA, R.C.; DE UZEDA, M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. **Journal of Endodontics.**, v.24, n.6, p.414-416, 1998.
- 90- SLOTS, J; RAMS, T.E. New views on periodontal microbiota in special patient categories. **Journal of Clinical Periodontology**, v.18, p. 411–420, 1991.
- 91- SLOTS, J. Primer for antimicrobial periodontal therapy. **Journal of Periodontal Research**, v. 35, p. 108–114, 2000
- 92- SLOTS, J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. **Journal of Periodontal Research.**; v. 37, p. 389-398, 2002
- 93- SOCRANSKY, S.S, HAFFAJEE, A,D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. **Journal of Periodontology**, v. 63, p. 322–331, 1992.
- 94- SOH, L.L; NEWMAN, H.N.; STRAHAN, J.D. Effects of subgingival chlorhexidine irrigation on periodontal inflammation. **Journal of Clinical Periodontology**, v.9, p.66-74, 1982.

95- SOSKOLNE, W.A; PROSKIN, H.M; STABHOLZ, A. Probing depth changes following 2 years of periodontal maintenance therapy including adjunctive controlled release of chlorhexidine. **Journal of Periodontology**, v.74, n. 4, p. 420-427, 1998.

96- SOUZA, A.M.G.; BRANDT, C.T.; LIMA, J.A. Biopolímero da mamona na reconstrução de falhas ósseas após ressecção de tumor ósseo. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.18 (supl. 2), 2003

97- SPANGBERG, L.; ENGSTROM,B.; LANGELAND,K. Biological effects of dental materials. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 36, p. 856-871, 1973

98- STABHOLZ, A; KETTERING, J; APRECIO, R; ZIMMERMAN, G; BAKER, P.J; WIKESJO, U.M. Retention of antimicrobial activity by human root surface after in situ subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine. **Journal of Periodontology**, v.64, n.2, p.137-41, 1993.

99- SUNDQVIST, G. **Bacteriological studies of necrotic dental pulps**. Umea, 1976. 94p.(Dissertation Master) - University of Umeo, Sweden.

100- SUNDQVIST. G. Ecology of the root canals flora. **Journal of Endodontics**, v. 18, n. 9, p. 427-430, Sept.1992.

101- TEIXEIRA,F.B.; FERRAZ, C.C.R; ZAIA, A.A; GOMES,B.P.F.A.; SOUZA-FILHO,F.J.; OLIVEIRA,D.P. Remoção de Smear Layer dos canais radiculares utilizando o irrigante Endoquil. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 58, n.6, p.424-426, 2001

102- THEILADE, E.; THEILADE, J. Formation and ecology of plaque at different locations in the mouth. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 93, p. 90-95, 1985

103- TOBIAS,R.S. Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. **International Endodontic Journal**, v.21, p. 155-160, 1998.

104- TONETTI M,S. Local delivery of tetracycline: from concept to clinical application. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 25, p. 969–977, 1998.

105- VIANNA, M.E; GOMES, B.P.F.A; BERBER, V.B; ZAIA, A.A; FERRAZ, C.C, DE SOUZA-FILHO F.J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine

and sodium hypochlorite. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, V, 97, p. 79-84, 2004.

106- VILARINHO, R.H.; HETEM, S.; RAMALHO, L.T.O. Implante de resina de poliuretana vegetal na câmara anterior do olho de camundongo. **Odontologia 2000**, v. 1,n.00, p.25-29, 1996

107- WALKER, A. A definer and dependable therapy for pulpless teeth. **J Am Dent Ass**, v. 23, n. 2, p. 1418-1425, 1992.

108- WAN YSOF, W.Z.A.; NEWMAN,H.N.; STRAHAN,J.D.; COVENTRY,J.F. Subgingival metronidazole in dialysis tubing and subgingival chlorhexidine irrigation in the control of plaque and chronic inflammatory periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v.11, p. 166-175, 1984.

109- WATTS, E.A.; NEWMAN,H.N. Clinical effects on chronic periodontitis of a simplified system of oral hygiene including subgingival pulsated jet irrigation with chlorhexidine. **Journal of Clinical Periodontology**, v.13, p. 666-670, 1986.

110- WENNSTROM, J.L.; DAHLEN, G.; GRONDAHL, K.; HEIJL, L. Periodic subgingival antimicrobial irrigation of pockets. Microbiologic and radiographical observations. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 14, p. 573-580, 1987

111- WESTLING,M.; TYNELIUS-BRATTHALL,G. Microbiological and clinical short-term effects of repeated intracrevicular chlorhexidine rinsing. **Journal of Periodontal Research** , v.19, p.202-209, 1984

112- WIEDER, S.G.; NEWMAN, H.N.; STRAHAN,J.D. Stannous fluoride and subgingival chlorhexidine irrigation in the control of plaque and chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v.10, p. 172-181, 1983

113- WIKESJO, U.M, REYNOLDS, H.S, CHRISTERSSON L.A, ZAMBON J.J,GENCO R.J. Effects of subgingival irrigation on *A. actinomycetemcomitans*. **Journal of Clinical Periodontology** v. 16, p. 116–119, 1989.

114- WOLFF LF, BAKDASH MB, PILHLSTROM BL, BANDT CL, AEPPLI DM. The effect of professional and home subgingival irrigation with antimicrobial agents on gingivitis and early periodontitis. **Journal of Dental Hygiene**, v. 63, p. 630-635, 1989.

115- WOLFF, L; DAHLE´N, G; AEPPLI, D. Bacteria as risk markers for periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 65, p. 498–510, 1994.

116- YAMASHITA, J. C.; TANOMARU FILHO, M.; LEONARDO, M. R.; ROSSI, M. A.; SILVA, L. A. B. Scanning electron microscopic study of the cleaning ability of chlorhexidine as a root-canal irrigant. **International Endodontic Journal**., v. 36, n. 5, p. 391-394, 2003.

117- YESILSOY,C; EUGENE, W; CLEVELAND, D. Antimicrobial and toxic effects of established and potencial root canal irrigants. **Journal of Endodontics**. , v. 21, p. 513-515, 1995