

GUILHERME HENRIQUE ROSA MARTINS

**AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA A LUZ DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
TRANSMISSÃO DA AÇÃO DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO E IODOFÓRMIO SOBRE
O *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

CAMPINAS
2008

GUILHERME HENRIQUE ROSA MARTINS

**AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA A LUZ DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
TRANSMISSÃO DA AÇÃO DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO E IODOFÓRMIO SOBRE
O *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

Dissertação apresentada ao Centro de Pós-Graduação / CPO São Leopoldo Mandic, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo da Silveira Bueno.

Co-Orientador: Prof. Dr. Manoel E. de Lima Machado

CAMPINAS
2008

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca "São Leopoldo Mandic"

M386a Martins, Guilherme Henrique Rosa.
Avaliação antibacteriana a luz da microscopia eletrônica de transmissão da ação do hidróxido de cálcio e iodofórmio sobre o *Enterococcus faecalis* / Guilherme Henrique Rosa Martins. – Campinas: [s.n.], 2008.
84f.: il.

Orientador: Carlos Eduardo da Silveira Bueno.
Dissertação (Mestrado em Endodontia) – C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação.

1. *Enterococcus faecalis*. 2. Hidróxido de cálcio. 3. Endodontia.
I. Bueno, Carlos Eduardo da Silveira. II. C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação. III. Título.

**C.P.O. - CENTRO DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS
SÃO LEOPOLDO MANDIC**

Folha de Aprovação

A dissertação intitulada: “**Avaliação antibacteriana a luz da microscopia eletrônica de transmissão da ação do hidróxido de cálcio e iodofórmio sobre o *Enterococcus faecalis***” apresentada ao Centro de Pós-Graduação, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração: **Endodontia** em __/__/__, à comissão examinadora abaixo denominada, foi aprovada após liberação pelo orientador.

Prof. (a) Dr (a)
Orientador

Prof. (a) Dr (a)
1º Membro

Prof. (a) Dr (a)
2º Membro

DEDICATÓRIA

A Deus, a força maior deste Universo e criador de todas as coisas, porque nós pobres imortais sempre estaremos à busca das explicações sobre este mistério que é a vida.

Aos meus pais, Paulo e Rosineli, e ao meu irmão Ricardo pelo constante apoio e incentivo aos meus estudos, pois este trabalho foi mais um resultado de minha ausência na vida de vocês como nas dos demais familiares.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. e Orientador Manoel Eduardo de Lima Machado,

Neste momento, palavras são poucas para agradecer seus ensinamentos durante esta fase de construção de minha vida, pois o nosso “Mestre” não somente criou mais professores e sim ajudou no processo de desenvolvimento de seres humanos.

Com maestria, soube conduzir com exatidão os compassos e andamentos desta sinfonia terminando num soberbo *presto*. Seu exemplo ficará marcado em nossas vidas.

Agradeço pela amizade, atenção, consideração e dedicação durante este tempo. Muito obrigado por tudo, Professor!

Ao Laboratório Alerta / Lemc - UNIFESP, em nome da **Prof^a. Dra. Ana Cristina Gales**, por ter me recebido com confiança, pelos ensinamentos e permissão da realização deste experimento, pois com seu nobre apoio pude realizar este experimento.

A estagiária do Laboratório - Alerta / Lemc, **Adriana Giannini Nicoletti** pela amizade e ajuda nos momentos mais críticos da realização deste trabalho, assim como de toda a equipe do Alerta / Lemc.

A **Prof^a. Dra. Edna Freymüller Haapalainen**, Diretora do Centro de Microscopia Eletrônica (CEME) da UNIFESP, pelo apoio e orientação na realização de uma etapa deste trabalho, pois seu grande conhecimento me guiou bastante.

Aos técnicos do laboratório CEME - UNIFESP, **André Haraguti Aguilera e Márcia Fujie Araguth Tanakai**, pelas explicações e execuções do material examinado.

As amigas **Karina Tramontina e Karine Carreira**, pela colaboração e apoio na execução deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Doutores do curso: **Arlindo di Spagna Souza**, pela amizade e conhecimento transmitidos durante este tempo percorrido e pelos conselhos que me ajudaram a crescer como pessoa e profissional.

Maria Letícia Borges Britto, pelos seus conhecimentos e atitudes durante o convívio e ensinamento.

Raul Capp Pallotta, um professor e uma amizade que se firmaram neste período acadêmico, seu exemplo sempre ficará marcado na minha vida.

Ao Professor Doutor **Carlos Eduardo da Silveira Bueno**, pela confiança em mim depositada permitindo a defesa deste trabalho.

Aos colegas e amigos de turma: **Andriw (R.O.), Guilherme Soares, Gustavo Povoleri, Kellen Ferreira, Liliane Costa, Miguel Vigatti, Patrícia Blomm e Regina Valadares** - o exemplo de cada um de vocês ficará para sempre... Valeu por tudo...

Muito obrigado!

Aos amigos de equipe de Endodontia - ACDbs - **Luciana Cabral, Luciana Magrin, Maria Amélia, Luiz Sapia e respectivos familiares** - muito obrigado pelo apoio, incentivo e companheirismo em todos os momentos, pois amizade de vocês tornou importante a mim!

Ao amigo Professor **Miguel Simão Haddad Filho e família**, seu incentivo e apoio quando da decisão de seguir carreira acadêmica foi primordial, eis aqui o resultado das nossas conversas às segundas-feiras em Santos. Obrigado pela amizade e por tudo!

Ao pessoal do Consultório: **Cassius, Tatiana e Cristine**, pelo apoio em todos os momentos deste curso de Pós-Graduação. Valeu!

A todos os meus amigos, por compreenderem a minha ausência neste período e apoiarem neste momento.

“Nunca conseguimos fazer nada direito enquanto não paramos de pensar em como fazê-lo”.

William Hazlitt (1778-1830)

RESUMO

Na Endodontia, as lesões periapicais persistentes vêm sendo eliminadas através do preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares e do uso de medicações intra e extracanal. A proposta terapêutica está vinculada à busca de uma ação local e a distância com vistas à variação observada na estrutura anatômica do sistema de canais radiculares, na intimidade da dentina e na região periapical. O objetivo deste trabalho foi de investigar a ação do Hidróxido de Cálcio e do Iodofórmio sobre o *Enterococcus faecalis*, visto que esta bactéria se tornou referência na avaliação de métodos de limpeza graças a sua alta resistência. Para tanto, foi realizado um teste antimicrobiano com cepas de *E.faecalis* (ATCC 29212) inoculadas em caldo de cultura BHI com as medicações de Hidróxido de Cálcio e Iodofórmio numa concentração de 64mg mL^{-1} . Amostras foram retiradas nos seguintes tempos experimentais : inicial, sete, quatorze e vinte e um dias, em que foi realizada a contagem de colônias formadas. No tempo experimental de sete dias, 5mL das amostras foram retiradas para análise morfológica através da Microscopia Eletrônica de Transmissão. Os resultados do teste antimicrobiano foram analisados através do Teste Exato de Fisher, e revelaram que entre o sétimo e o décimo quarto dia, houve um decréscimo na quantidade de bactéria para ambas as medicações ($p=0,0976$; $\alpha=0,05$), eliminando as bactérias entre o décimo quarto e vigésimo primeiro dia, comparando-se com o grupo controle positivo. Quanto à análise pela MET, foram observadas alterações nas estruturas morfológicas do *E.faecalis* ocorrendo até o processo de lise bacteriana. Conclui-se através da metodologia aplicada que as medicações de Hidróxido de Cálcio e de Iodofórmio agem sobre o *E.faecalis* quando em contato entre o sétimo e décimo quarto dia, não tendo viabilidade celular após este período e causando alterações irreversíveis na sua morfologia.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*. Hidróxido de Cálcio. Iodofórmio.

ABSTRACT

In Endodontics, the persistent periapical lesions have been eradicated by root canal preparation and the use of an intra and extra canal medicament. The therapeutic proposal is linked to seek of a local action and aside with intention to the observed alteration in the anatomical structure of the root canal system, throughout the dentin and in the periapical region. The aim of this study was to investigate the action of the Calcium hydroxide and the Iodoformium on the *Enterococcus faecalis*, since this bacterium became reference in the cleaning methods evaluation because of its resistance. An antimicrobial test was carried out with *E.faecalis* (ATCC 29212) inoculated in BHI media culture where Calcium hydroxide and Iodoformium medication were diluted to reach the concentration of 64mg mL⁻¹. Samples were obtained in the following experimental times: beginning, seven, fourteen and twenty one days which were determined the colony forming units (CFU). On the experimental time of the seventh day, 5mL of the samples were obtained to morphological analysis by Transmission Electronic Microscopy. The antimicrobial test results were analyzed by Fisher Exact Test which revealed that between the seventh and the fourteenth day, there was a decrease of the bacterial quantity to both medicaments ($p=0,0976$; $\alpha=0,05$), which eradicated all bacteria between the fourteenth and twenty-first day, confronting with the positive control group. By TEM analysis, it was observed alterations on the *E.faecalis* morphological structures which showed the bacterial lyses process. By methodology applied, it was concluded that both medicaments - calcium hydroxide and iodoformium - act on the *E.faecalis* when in contact within seventh and fourteenth day, not occurring viability of the cells after this period, and caused irreversible alteration in their morphology.

Keywords: *Enterococcus faecalis*. Calcium hydroxide. Iodoformium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Cepas de <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212).....	54
FIGURA 2 - Frascos das medicações utilizadas neste trabalho.....	54
FIGURA 3 - Suporte contendo Tubos com amostras do trabalho	55
FIGURA 4 - Verificação no Turbidímetro de uma amostra	55
FIGURA 5 - Demonstração de uma Micropipeta e suporte com frascos Eppendorf.....	56
FIGURA 6 - Gotejamento de 20µl da amostra na placa de Petri.....	57
FIGURA 7 - Equipamento de Fluxo laminar	58
FIGURA 8 - Estufa Microbiológica.....	58
FIGURA 9 - Colônias de <i>E. faecalis</i> para contagem	59
FIGURA 10 - Microscópio Eletrônico de Transmissão	61
TABELA 1 - Valores médios em número logaritmo dos grupos	62
GRAFICO 1 - Demonstração gráfica da ação das medicações sobre o <i>E. faecalis</i>	63
TABELA 2 - Resultado do Teste Exato de Fisher	64
FIGURA 11 - <i>E. faecalis</i> após 7 dias de Incubação (Grupo Controle).....	65
FIGURA 12 - Formações vesiculares no <i>E. faecalis</i>	66
FIGURA 13 - Exteriorização do material citoplasmático do <i>E. faecalis</i>	67
FIGURA 14 - <i>E. faecalis</i> após 7 dias de contato com Ca(OH) ₂	68
FIGURA 15 - Exteriorização de material citoplasmático da bactéria	69
FIGURA 16 - <i>E. faecalis</i> em processo de bacteriólise.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

%	-	porcentagem
µl	-	micro litro
µm	-	micrometro
ATCC	-	American Type Culture Collection
BHI	-	Brain Heart Infusion
Ca (OH) ₂	-	Hidróxido de Cálcio
CFC	-	25% de Ciprofloxacina, 25% Metronidazol e 50% de Ca (OH) ₂
CHI ₃	-	Iodofórmio
g	-	gramas
IKI	-	2% Iodo, 4% Iodeto de potássio veiculados em glicerina
kV	-	quilovolt
L	-	Litros
Log	-	Logaritmo
mg	-	miligrama
MIC	-	Concentração Mínima Inibitória
mL	-	Mililitro
mol	-	molécula grama
NIH	-	National Institute of Health
nm	-	nanômetro
Nº	-	número
p	-	probabilidade de valores (0 a 1)
P.A.	-	Pró - Análise
PEG	-	Polietilenoglicol
pH	-	potencial hidrogeniônico
PRP	-	Paramonoclorofenol + Rinosoro + Polietilenoglicol
TSB	-	Tryptic Soy Broth
UFC	-	Unidade Formadora de Colônia
α	-	nível de significância

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 O <i>Enterococcus faecalis</i>	17
2.2 Medicação Intra Canal.....	25
2.2.1 O Hidróxido de Cálcio.....	25
2.2.2 O Iodofórmio.....	37
2.3 Metodologia	43
3 PROPOSIÇÃO	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1 Materiais.....	50
4.2 Equipamentos	52
4.3 Métodos.....	53
4.3.1 Teste Antibacteriano	53
4.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão	60
5 RESULTADOS	62
5.2 Análise pela Microscopia Eletrônica de Transmissão	62
5.1 Teste Antibacteriano	64
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXO A - Resultados do Teste Antimicrobiano.....	85
ANEXO B - Valores em Log do Teste Antimicrobiano.....	87
ANEXO C - Resultado do Teste Estatístico para o Grupo Controle Positivo	89
ANEXO D - Resultado do Teste estatístico para o Grupo do Iodofórmio	92
ANEXO E - Resultado do Teste Estatístico para o Grupo do Hidróxido de Cálcio.....	96
ANEXO F - Resultado do Teste Estatístico entre os Grupos investigados	100

1 INTRODUÇÃO

A Endodontia é a especialidade da Odontologia que trata das alterações patológicas do tecido pulpar e periapical, devolvendo ao órgão dental seu restabelecimento ao sistema estomatognático. Quando não se consegue um processo de reparação tecidual na região periapical e devolver as funções fisiológicas do dente de maneira satisfatória, certamente há um fator etiológico, que sendo de ordem microbiana, impede o processo de reparo pela liberação de subprodutos bacterianos. Fator este que não foi eliminado por razões diversas durante o tratamento do canal radicular.

Quando não ocorre este objetivo almejado, realiza-se o retratamento do canal radicular, visando à desinfecção do sistema de canais radiculares. Pois a porção dentinária da raiz dentária, por apresentar uma anatomia peculiar contendo canalículos dentinários, canais secundários e até de uma terminação do canal em delta-apical, pode promover uma condição favorável de sobrevivência de microorganismos de diversas espécies, onde se podem encontrar bactérias facultativas, anaeróbias, aeróbias e até mesmo de fungos.

Dentre os microorganismos existentes, o *Enterococcus faecalis* - coco GrãM positivo e anaeróbio facultativo - assume um papel predominante nas lesões periapicais persistentes podendo sobreviver sobre quaisquer circunstâncias como: em pH elevado, regiões escassas de nutrientes e sua afinidade ao tecido colágeno.

Desta maneira, esta bactéria tornou-se uma das mais estudadas, principalmente quanto à ação de medicações intracanaís sobre ela.

A medicação intracanal, utilizada como curativo de demora tem o objetivo de complementar a sanificação obtida com o preparo químico-cirúrgico do canal radicular, de destruir bactérias e inativar suas endotoxinas presentes nos túbulos dentinários e em áreas inacessíveis pelos instrumentos endodônticos e substâncias químicas.

No tratamento endodôntico, utiliza-se duas medicações a base de Hidróxido de Cálcio e de Iodofórmio com finalidades anti-sépticas importantes no combate a microorganismos presentes no sistema de canais radiculares.

O Hidróxido de Cálcio é uma medicação intracanal que foi introduzida na Endodontia na década de vinte do século passado e que vem sendo utilizada mundialmente em diversas situações: como curativo entre sessões, no tratamento de dentes com polpa mortificada, nos casos de infecções refratárias, nos casos de reabsorção externa, dentes com rizogênese incompleta, dentes traumatizados, com perfurações e lesões extensas. Seu mecanismo de ação está relacionado à dissociação da medicação havendo liberação de hidroxila e de íons cálcio, tornando o meio com um pH alcalino. Esta alcalinidade confere o seu papel antimicrobiano.

O Iodofórmio por sua vez, é um medicamento utilizado há mais de 150 anos, entretanto, o seu mecanismo de ação como medicação intracanal nunca foi bem pesquisado. Tem sido empregado, endodônticamente, nos casos de lesões refratárias, perfurações, dentes com lesões periapicais extensas, apicificações e como possui uma excelente radiopacidade, é empregado como material contrastante em algumas medicações para exames e controles radiográficos. Seu mecanismo de ação está relacionado à liberação de iodo apresentando suas propriedades detergentes, desinfetantes, desodorizantes, de ação anestésica e de atividade tixotrópica.

Na literatura, ambas as medicações possuem propriedades que eliminam o *E.faecalis*, apesar de existir controvérsias quanto a determinadas propriedades e trabalhos comprovando a inativação das mesmas quando em contato com a dentina. Em certos trabalhos clínicos, estas medicações mostraram resultados animadores contra este microorganismo e assim como em outros microorganismos predominantes nas lesões periapicais.

A ação da medicação intracanal sempre é estudada através de testes microbiológicos, pois são protocolos desenvolvidos para este fim sem que se observe a ação dos mesmos sobre as estruturas morfológicas dos microorganismos. A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) vem sendo empregada nas ciências biológicas desde seu advento para o estudo morfológico de células, microorganismos, órgãos, tecidos e até para finalidade de diagnóstico. Esta investigação é realizada através de um feixe de elétrons que passa pela amostra resultando em imagens de alta precisão em que se podem compreender certos fenômenos, e com as associações de metodologias diferenciadas, pode-se entender e comprovar os objetivos propostos de um estudo.

Deste modo, verifica-se a necessidade de realizar novos trabalhos com métodos diferenciados a fim de se averiguar a ação destas medicações sobre o *E.faecalis*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste trabalho, a revisão da literatura foi dividida de acordo com os temas envolvidos na investigação. Na primeira parte, foi abordada a questão microbiológica incidente no processo infeccioso do sistema de canais radiculares com ênfase especial ao papel do *Enterococcus faecalis*. Isto posto, foi apresentado o tema referente ao papel dos dois fármacos de grande uso em Endodontia realçando sua ação sobre o agente microbiano já relacionado. Finalizando o capítulo, foi selecionada através da análise bibliográfica, uma metodologia apropriada a ser aplicada na elaboração do presente estudo.

2.1 O *Enterococcus faecalis*

É uma bactéria Grã-m-positiva, anaeróbia facultativa e a espécie mais freqüente do gênero *Enterococcus*, compreendendo cerca de 80 a 85% das amostras de enterococos isoladas de material clínico. É membro da microflora normal do trato intestinal, podendo ser encontrado na mucosa oral, vaginal e na pele. Sua freqüência, relativamente, está nos alimentos, na água, no solo e no meio ambiente em geral, destacando-se como um dos agentes mais importantes das infecções hospitalares, como citado por Trabulsi & Althertum (2005).

Na Endodontia, o *E.faecalis* passou a ser um microorganismo mais estudado e nos casos de insucessos endodônticos, como descrito pela literatura a seguir:

Fukushima et al. (1990) realizaram um estudo através da localização e identificação de bactérias por culturas bacterianas e microscopia eletrônica de varredura em 21 dentes portadores de patologia periapical assintomática. Os resultados revelaram que 60% dos ápices continham infecções bacterianas mistas entre o material obturador e a parte superior do forâmen apical. Esses microorganismos consistiram predominantemente de espécies *Bacterioides*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* e *Enterococcus*, todos tendo potencial para o desenvolvimento de lesões periapicais.

Um estudo clássico realizado por Sundqvist (1992) sobre a flora ecológica do canal radicular baseado na literatura, nos revela que o canal radicular representa um meio especial nas quais as pressões seletivas resultam num estabelecimento de um grupo restrito da flora oral, como o caso das anaeróbias sobre as colônias mistas. As inter-relações bacterianas e os suplementos nutricionais são fatores chaves na determinação da infecção. O tratamento endodôntico, além da eliminação bacteriana, pode quebrar completamente a cadeia ecológica e desprevenir bactérias persistentes da sua fonte nutricional. O autor ressaltou que o *E.faecalis* são mais resistentes aos tratamentos endodônticos podendo ser favorecido pela mudança ecológica no canal radicular, estabelecendo infecções de difíceis tratamentos.

Para averiguar a associação de bactérias específicas com alguns sinais e sintomas endodônticos, Gomes et al. (1994), estudaram 30 canais radiculares microbiologicamente; desses, 14 apresentavam dor, 20 sensibilidade à percussão, 23 com canais úmidos, sete com edema, cinco com exsudato purulento e quatro com fístulas. Correlação clínica e microbiológica foi observada, particularmente em relação à dor onde 93% dos canais com dor foram de anaeróbios isolados e apenas 53% livre de sintomatologia. *Prevotella spp.* foram isoladas de 64,2% dos canais

sintomáticos e 12,5% dos canais assintomáticos ($p < 0,01$) semelhantemente, *peptostreptococci* foram isolados de 71,4% sintomáticos e 31,3% de assintomáticos ($p < 0,05$). Quanto ao *E.faecalis* não houve presença significativa em dentes que apresentaram sintomas, inchaço, dor, sensibilidade e canais úmidos, estando presente em dentes assintomáticos. Os autores concluíram que a dor esta presente quando há a presença de *Prevotella* e *Peptostreptococcus spp.* nas infecções de canais radiculares.

Jett et al. (1994) realizaram um estudo baseado na literatura relatando a virulência dos *Enterococci*. Os autores relataram que para os *Enterococci* tornarem virulentos, estes devem aderir primeiramente ao tecido hospedeiro, onde procuram um meio diferenciado para sobrevivência, com alto potencial redutor de oxigênio, nutrientes limitados essenciais, assim como leucócitos fagocíticos e outras defesas do hospedeiro. Neste meio, seus genes favorecem seu crescimento e seus fatores expressos de virulência permitem a aderência a células hospedeiras e matrix extracelular, facilitando a invasão tecidual, efeito de imuno modulação e danos a toxinas mediadas. Os fatores expressos de virulência para o *E.faecalis* são a citolisina (que ultrapassam a parede agindo no citoplasma modificando os genes intracelularmente), substância de agregação, feromones (componentes de sua parede bacteriana que podem ser antagônicos a migração leucocitária, induzindo a inflamação levando a provável ativação do sistema complemento - C5a), ácido lipoteitóico (liberado por este microorganismo torna-se um potente indutor de fator tumor necrótico - FTN e interferon, podendo facilitar a transferência plasmídica), protease, hialuronidase e AS-48 (bacteriocina - que inibem e causam lise a Gram-negativos e positivos). Desta maneira, o *E.faecalis* junto a outros microorganismos podem causar infecções em tecidos moles e abscessos. Os autores concluem

explicando que a virulência dos *Enterococci* é importante para entender o mecanismo de resistência frente aos antibióticos.

Quanto à questão de dentes obturados portadores de lesão periapical, Molander et al. (1998), examinaram o estado microbiológico de 100 dentes portadores de lesões periapicais verificados por exames radiográficos, onde foram encontradas 69% de espécies anaeróbias facultativas, em que os *Enterococci* foram os mais freqüentes em 25 dos 32 casos (78%). Os autores concluíram que a microflora dos canais obturados diferencia daquela encontrada em dentes com polpa necrótica, quantitativamente assim como qualitativamente e que estratégias ao retratamento não cirúrgico deveriam ser reconsideradas.

Peciulene et al. (2001) determinaram a ocorrência e o papel de fungos, rods entéricos Gram negativos e espécies de *Enterococcus* em dentes com canais obturados com periodontite apical crônica, e o efeito antimicrobiano da irrigação com Iodo Iodeto de Potássio (IKI). Foram utilizados quarenta dentes assintomáticos com periodontite apical crônica sendo divididos em dois grupos: grupo A, que foram desobturados, instrumentados e preenchidos com Hidróxido de Cálcio por um período de 10 a 14 dias e grupo B, que após a desinfecção, foram irrigados com IKI por 5 minutos e obturados definitivamente. Amostras microbiológicas foram retiradas para o processo de identificação através dos testes de motilidade e padrões de fermentação de carboidratos. Dos 40 dentes da amostra inicial, micróbios foram isolados em 33 dentes. Fungos isolados de 6 dentes, tendo 3 juntamente com *E.faecalis*. Rods entéricos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *proteus mirabilis*) presentes em três amostras e *E.faecalis* isolados em 21 das 33 culturas positivas dos dentes, onde 11 eram de cultura pura. Nas amostras secundárias (após a instrumentação), o crescimento bacteriano foi detectado em dez amostras,

sendo 6 casos de *E.faecalis*, com 5 de cultura pura. Na terceira amostra do grupo B (após a irrigação com IKI), apenas uma amostra com cultura pura. Os autores concluíram que a alta prevalência de bactéria entérica e fungos em dentes com canais tratados e periodontite apical crônica foi estabelecida e que a irrigação com IKI melhorou o efeito antimicrobiano do tratamento.

De acordo com Sunde et al. (2002) após tratarem 36 dentes com lesões periapicais refratárias usando Hidróxido de Cálcio como medicação intracanal por seis meses, obturados e depois de realizada a apicectomia, tiveram seus ápices estudados por cultura microbiológica, microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Os autores observaram uma grande variedade de microorganismos contendo bactérias anaeróbias e facultativas assim como fungos que permaneceram em lesões refratárias após longo período medicado com Hidróxido de Cálcio. Nesta microflora, 79,5% das cepas eram Grã m positivas e *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, e *Cândida species* foram detectadas em 27 (75%) das 36 lesões.

Pinheiro et al. (2003) identificaram a microflora de canais radiculares de dentes tratados endodonticamente com insucesso, associando várias espécies com dados clínicos. Foram utilizados 60 dentes com tratamento endodôntico portadores de lesões periapicais persistentes que quando realizado o retratamento, tiveram suas amostras retiradas e cultivadas de acordo com técnicas para espécies anaeróbias. As identificações das culturas foram através da coloração e morfologia de Grã m e a determinação das espécies, através de testes bioquímicos (reações enzimáticas). Os autores encontraram um número predominantemente de espécies Gram-positiva. Das facultativas anaeróbias, o *Enterococcus faecalis* foi o mais comumente isolado, apesar de infecções poli microbianas, os anaeróbios são os

mais encontrados em dentes com os canais radiculares tratados e que apresentem sintomatologia. Desta maneira, observa-se a resistência e a capacidade de sobrevivência deste agente microbiano a várias situações.

Rôças et al. (2004) com o propósito de associar o *E.faecalis* com diferentes formas de lesões periapicais, investigaram através da Reação em cadeia de polimerase (PCR) 80 amostras de pacientes e concluíram que o *E.faecalis* está mais associado com os casos assintomáticos (33%) e insucessos de terapia endodôntica (67%).

Pinheiro et al. (2004) testaram, *in vitro*, a susceptibilidade a diferentes antibióticos de *E.faecalis* isolados de dentes com canais obturados e com lesões periapicais. Para tanto, utilizaram 21 cepas de *E.faecalis* que foram testadas suas susceptibilidade a antibióticos através do método de E-Test System e produção de β -lactamase por nitrocefim. Todas as amostras foram susceptíveis a penicilina, vancomicina, moxifloxacina, 95.2% a cloranfenicol, 85.7% a tetraciclina e doxiciclina e 80.9% a ciprofloxacina. Entretanto a MIC de amoxicilina e amoxicilina mais ácido clavulânico ($0.75 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram mais baixas que a benzilpenicilina ($3.0 \mu\text{g mL}^{-1}$). A MIC da eritromicina variou de 0.38 a $> 256 \mu\text{g mL}^{-1}$, apenas 28.5% das cepas foram susceptíveis ($\text{MIC} < 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$). A azitromicina apresentou uma limitada susceptibilidade que foi ativa apenas em 14.2% das cepas e nenhuma cepa produziu β -lactamase. Concluíram que cepas isoladas de *E.faecalis* foram completamente susceptíveis, *in vitro*, à amoxicilina, ácido clavulânico mais amoxicilina, vancomicina e moxifloxacina. A maior parte dos isolados foi susceptível a cloranfenicol, tetraciclina, doxiciclina e ciprofloxacina. A eritromicina e a azitromicina foram os menos efetivos.

O *E.faecalis* tolera meios altamente alcalino, já que não se sabe qual o pH exato para matar este microorganismo. Assim sendo, McHugh et al. (2004) testaram o crescimento desta bactéria acrescentando 0.5 pH de 9.5 a 12 pH, realizando medições em turbidímetros e espectrofotômetros. Os autores concluíram que o pH entre 10.5 a 11 retarda o crescimento bacteriano, e que acima de 11.5 não mostrou crescimento.

Verificando o crescimento em alto pH para aumentar a adesividade do *E.faecalis* ao colágeno, Kayaoglu et al. (2005) variaram o pH entre 7.5 a 9.5, adicionando suspensões bacterianas à albumina de soro bovino e ao colágeno tipo I, e corados com violeta cristal, sendo analisados pela espectrofotometria, no que resultou numa união maior ao colágeno num pH de 8.5. Desta maneira, os autores concluíram que um menor aumento no pH até 8.5, pode ser uma consequência de tratamento insuficiente com medicamentos alcalinos como o Hidróxido de Cálcio, aumentando a união do colágeno ao *E.faecalis*, *in vitro*. Este pode ser um mecanismo crítico pelo qual o *E.faecalis* predomina as infecções endodônticas persistentes.

Vivacqua-Gomes et al. (2005) determinaram à presença de *E.faecalis* após o tratamento do canal radicular realizado em única sessão e em múltiplas sessões. Foram utilizados 45 dentes pré-molares infectados com *E.faecalis* por 60 dias, sendo divididos em cinco grupos: Grupo 1 (irrigação com Clorexidina e obturação numa única sessão), Grupo 2 (irrigação com Clorexidina, medicação intracanal de Hidróxido de Cálcio por 14 dias e obturação), Grupo 3 (irrigação com Clorexidina e obturação após sete dias), Grupo 4 (irrigação com soro fisiológico e obturação após sete dias) e Grupo 5 (irrigação com soro fisiológico e obturação imediata sem cimento). Os dentes foram incubados por 60 dias a 37°C, tendo 5 mm

da sua porção radicular (entre o terço médio e apical) seccionados para a remoção das amostras de dentina através de brocas, para análise microbiológica e contagem de colônias formadas. *E.faecalis* sobreviveu em 20% no Grupo 1, 25% no Grupo 2, 40% no Grupo 3, 60% no Grupo 4 e 100% no Grupo 5. Os autores concluíram que o *E.faecalis* não foi eliminado nos tratamentos de sessão única e nem em múltiplas sessões.

Sedgley et al. (2005), verificaram a capacidade de sobrevivência do *E.faecalis* sepultados em dentes unirradiculares obturados e sem nutrientes adicionados, onde utilizaram cepas isogênicas desta bactéria (OG1-S e OG1-X) nas quais foram inoculadas antes e após a obturação do canal radicular sendo incubadas a 37°C em 100% de umidade por até 12 meses. Para detectar a viabilidade celular, utilizaram os métodos de cultura, de reação em cadeia da polimerase (PCR) e histológicos. Os resultados ao teste histológico demonstraram a presença de bactérias nos túbulos dentinários sob a luz de microscopia após 48 h, 6 e 12 meses. Quanto ao teste de PCR, ambos os tipos de genes bacterianos diferentes estiveram presentes quando inoculados antes e após a obturação do canal radicular e ao teste microbiológico, a viabilidade do *E.faecalis* foi confirmada em todos os grupos. Os autores concluíram que o *E.faecalis* inoculado em dentes obturados mantém a viabilidade por até 12 meses *in vitro*.

Williams et al. (2006) realizaram um estudo comparando os métodos quantitativos de PCR (qPCR), PCR de transcrição reversa (RT-PCR) e microbiológico na detecção de *E.faecalis* durante o tratamento endodôntico. Amostras foram coletadas antes e após a instrumentação, como após a colocação de Hidróxido de Cálcio de 15 dentes com infecções primárias e 14 com infecções refratárias para ser analisadas pelos três métodos. Como conclusão, os autores

verificaram que os testes de qPCR e RT-PCR foram métodos mais precisos na detecção do *E.faecalis* em infecções endodônticas.

Conforme a literatura verifica-se que o *E.faecalis* é um microorganismo presente nos casos de infecções mais persistentes e que sua resistência é devida a sua capacidade de sobrevivência por longo período, em áreas na dentina radicular onde a nutrição é escassa e que a ação dos fármacos não atinge o seu potencial de ação. Por este motivo, observa-se à necessidade de mais estudos com este microorganismo para entendê-lo tanto do ponto de vista morfológico como de sua reação com os medicamentos utilizados na terapia endodôntica.

2.2 Medicação Intra Canal

2.2.1 O Hidróxido de Cálcio

O Hidróxido de Cálcio é o medicamento de grande uso na Endodontia, dentre as inúmeras investigações realçamos os ensaios de:

Stuart et al. (1991) compararam a efetividade antimicrobiana do Hidróxido de Cálcio, Paramonoclorofenol Canforado e Formocresol em noventa canais unirradiculares de dentes humanos extraídos, que foram instrumentados e inoculados com *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus*, e *Bacteroides gingivalis* ou *fragilis*. Após o emprego das medicações testadas, selamento e incubação por uma hora, amostras foram retiradas de cada dente para analisar o número de bactérias viáveis em relação aos dentes do grupo controle. Todas as medicações apresentaram atividade antibacteriana com redução de porcentagem de bactérias viáveis variando de 64.3% a 100%.Concluíram que o Hidróxido de Cálcio mostrou uma alta atividade antibacteriana que o Paramonoclorofenol Canforado e

Formocresol para *S.mutans* e *B.gingivalis* ou *B.fragilis*, mas não mostrou diferença para o *A.viscosus*.

Avaliando o efeito antimicrobiano do Hidróxido de Cálcio utilizado como medicação intracanal num período de 10 minutos e 7 dias em dentes humanos portadores de polpa mortificada, Sjögren et al. (1991) através de um exame microbiológico para identificação e determinação do número de bactérias, mostraram que o Hidróxido de Cálcio utilizado por sete dias elimina eficientemente as bactérias, enquanto que quando utilizado por dez minutos não possui efetividade.

Safavi et al. (1994) investigaram através da espectrometria, se o tratamento do Lipopolissacarídeo (LPS) com o Hidróxido de Cálcio alterava a ação biológica medida pela secreção de Prostaglandina E₂ de culturas de células de monócitos humanos. A Prostaglandina E₂ foi identificada na liberação da ação entre os monócitos e LPS, mas não naqueles de LPS tratados por Hidróxido de Cálcio. Os autores concluíram que o tratamento com o Hidróxido de Cálcio pode alterar a propriedade biológica do LPS bacteriano.

A desinfecção de cilindros de túbulos dentinários infectados com *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum* e *Enterococcus faecalis* por pasta de Hidróxido de Cálcio com soro fisiológico e Paramonoclorofenol Canforado (PMCC) num período experimental de 1h, 1 dia e 1 semana foi realizado por Siqueira Júnior & Uzeda (1996) através da incubação em meio de cultura sendo verificada a viabilidade bacteriana. A pasta de Hidróxido de Cálcio mais PMCC eliminou efetivamente as bactérias nos túbulos após um período de 1 h de exposição, exceto para o *E.faecalis* que precisou de um dia de exposição. Entretanto, a pasta de Hidróxido de Cálcio mais soro fisiológico foi inefetivo contra *E.faecalis* e *F.*

nucleatum mesmo após uma semana de exposição. Os resultados mostraram que o PMCC aumentou o efeito antibacteriano do Hidróxido de Cálcio.

Nesta mesma filosofia de pesquisa, Siqueira Júnior et al. (1997), avaliaram a atividade antibacteriana das pastas de Hidróxido de Cálcio - $\text{Ca}(\text{OH})_2$ com Iodofórmio (CHI_3): pasta 1 - Hidróxido de Cálcio/Paramonoclorofenol Canforado/Glicerina (H/P/G), 2- pasta de H/P/G e CHI_3 numa proporção de 3:1(v/v), 3- pasta de H/P/G e CHI_3 numa proporção de 6:1(v/v), 4-Hidróxido de Cálcio mais Glicerina e 5 - Iodofórmio mais Glicerina, em 3 bactérias anaeróbias estritas e em 3 facultativas. Os autores avaliaram esta atividade antibacteriana através da medição do halo de inibição em placa de petri contendo o inóculo bacteriano. Os resultados demonstraram que a adição de Iodofórmio a pasta de H/P/G não interferiu em suas propriedades antibacteriana. A pasta de Iodofórmio e Glicerina demonstrou uma discreta inibição sobre algumas cepas bacteriana, enquanto que a pasta de Hidróxido de Cálcio mais Glicerina não apresentou efeito antibacteriano sobre as espécies testadas.

Siqueira Júnior & Uzeda (1998) avaliaram a influência de três diferentes veículos sobre a atividade antibacteriana do Hidróxido de Cálcio contra cepas de *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus sanguis* e *E.faecalis* através do teste de diluição em caldo. Resultados demonstraram que todas as pastas foram eficientes em eliminar as bactérias testadas, mas em diferentes tempos. A pasta de Hidróxido de Cálcio/Paramonoclorofenol Canforado/Glicerina foi a mais efetiva contra as quatro cepas bacterianas testadas.

Uma revisão crítica baseada na literatura sobre a atividade antimicrobiana do Hidróxido de Cálcio foi realizada por Siqueira Júnior & Lopes (1999). Os autores relataram que as propriedades físico-químicas desta substância possuem limitações

quanto ao poder de desinfecção do sistema de canais radiculares. Além disso, o Hidróxido de Cálcio não possui efetividade contra todos os tipos de bactérias encontradas nas infecções endodônticas, e que associações com outras medicações podem melhorar a sua eficácia em eliminar bactérias residuais do sistema de canais radiculares.

Safavi & Nakayama (2000) investigaram a influência de veículos aquosos e oleosos na solução de Hidróxido de Cálcio, utilizando água destilada, glicerina e propilenoglicol. Para tanto, realizaram medições através de um medidor de condutividade das soluções saturadas de Hidróxido de Cálcio, onde observaram que os valores de condutividade da solução em água destilada foi de 7.3 ± 3 mS/cm e para soluções com glicerina ou propilenoglicol foi essencialmente zero. Concluíram que o uso de um veículo não aquoso pode impedir a efetividade do Hidróxido de Cálcio como medicação intracanal.

Realizando um estudo *in vitro* da inativação pela dentina de algumas substâncias de uso intracanal, Haapasalo et al. (2000) através de uma suspensão bacteriana de *E.faecalis* A197A com as medicações testadas de solução saturada de Hidróxido de Cálcio, 0.5% e 0.05% de Acetato de Clorexidina, 1% de Hipoclorito de Sódio e de 2/4% e 0.2/0.4% de Iodo Iodeto de Potássio (IKI), e alíquotas de pó de dentina incubadas por 5 min., 1h e 24h, observaram que o pó da dentina causou um efeito inibitório sobre o Hidróxido de Cálcio nos três tempos experimentais. Quanto ao IKI, este teve seu efeito perdido quando em contato por 1h e as outras substâncias tiveram seu efeito reduzido, mas não eliminado na presença da dentina. Os autores concluíram que este modelo de pó dentinário parece ser uma ferramenta eficiente para o estudo de interações entre as substâncias de uso intracanal, dentina e microorganismos.

Nesta mesma linha de pesquisa, Portenier et al. (2001) examinaram e compararam o efeito antibacteriano de solução saturada de Hidróxido de Cálcio, Acetato de Clorexidina e Iodo Iodeto de Potássio (IKI) por quatro concentrações de dentina, hidroxiapatita (HA) e soro de albumina bovina (BSA) em culturas bacterianas de *E.faecalis* A197A. O Hidróxido de Cálcio foi totalmente inativado pelas quatro concentrações das três substâncias, a Clorexidina foi fortemente inibida pelo BSA e a HA causou pouco efeito nesta substância, e o IKI teve seu efeito anulado na presença da dentina e pouco afetado pela HA e BSA. Concluíram que a inibição pela dentina da atividade antibacteriana do Hidróxido de Cálcio, Clorexidina e IKI ocorre por diferentes mecanismos e que os diferentes componentes da dentina podem ser responsáveis pela inibição destes três medicamentos. O Hidróxido de Cálcio teve particularmente seu efeito anulado pelos componentes orgânicos e inorgânicos da dentina.

Han et al. (2001) avaliaram a atividade antimicrobiana das pastas de Hidróxido de Cálcio contendo veículos aquosos e a base de óleo de silicone em dentes com magmas dentinários removidos e não removidos. Para tanto foram utilizadas 68 raízes humanas padronizadas e infectadas por *E.faecalis* divididas em quatro grupos sendo instrumentadas e colocadas medicações intracanaís permanecendo por sete dias. Amostras foram coletadas após este período para a análise quantitativa microbiológica através da espectrofotometria. Todas as pastas de Hidróxido de Cálcio foram efetivas na eliminação das bactérias dos túbulos dentinários, exceto o grupo sem magma dentinário com pasta de Hidróxido de Cálcio com óleo a base de silicone.

Para avaliar a atividade antimicrobiana de várias pastas de Hidróxido de Cálcio em canais radiculares bovinos infectados com *E.faecalis*, Behnen et al. (2001)

realizaram uma análise quantitativa microbiológica da dentina em várias profundidades. Todos os grupos mostraram uma diminuição significativa em números de *E.faecalis* em todas as profundidades comparado com o grupo controle. Esses resultados sugerem que o Hidróxido de Cálcio pode diminuir o número de *E.faecalis* para todas as profundidades dos túbulos dentinários dentro de 24h e que pastas menos viscosa podem ser mais efetivas na eliminação destas bactérias dos túbulos dentinários que pastas mais viscosa.

Sukawat & Srisuwan (2002) compararam a eficácia de três diferentes formulações de Hidróxido de Cálcio (com água destilada, clorexidina à 0,2% e paramonoclorofenol) utilizando amostras de dentinas infectadas com *E.faecalis* por sete dias, quando amostras de pó de dentina foram coletadas e colocadas em TSB a 37°C por 24h para avaliação da quantidade de bactéria através da espectrofotometria. Os autores concluíram que o Hidróxido de Cálcio mais água destilada e clorexidina a 0,2% foram ineficazes contra essa bactéria e que a pasta com paramonoclorofenol canforado erradicou este microorganismo em sete dias.

Com o intuito de averiguar a susceptibilidade microbiana das pastas de Hidróxido de Cálcio e seus veículos (água destilada, soro fisiológico, solução anestésica - mepivacaína, glicerina, polietilenoglicol, paramonoclorofenol canforado mais veículo oleoso numa proporção de 2:1 e paramonoclorofenol canforado mais glicerina na proporção de 2:1:1) medindo as zonas de inibição de crescimento bacteriano, Gomes et al. (2002) observaram que o *E.faecalis* foi o mais resistente, *Porphyromonas endodontalis* foi o mais susceptível à todas as medicações seguida de *P.gingivalis* e *Prevotella intermedia* que se apresentaram intermediário. O Hidróxido de Cálcio com paramonoclorofenol canforado e glicerina mostrou zonas de inibição mais largas quando comparadas a outras medicações. Os autores

concluíram que bactérias anaeróbias GrãM negativas são mais susceptíveis às pastas de Hidróxido de Cálcio que microorganismos facultativos GrãM positivos.

Desta maneira, Gomes et al. (2002) avaliaram *in vitro*, a atividade antimicrobiana das pastas de Hidróxido de Cálcio e seus veículos contra treze microorganismos comumente isolados do canal radicular, através do método de difusão em ágar. Após o período de incubação, as zonas de inibição foram medidas e analisadas estatisticamente. O efeito antimicrobiano das medicações foi ordenado do mais forte para o mais fraco: Ca(OH)_2 +PMCC+Glicerina, Ca(OH)_2 +PMCC, Ca(OH)_2 +Glicerina, Ca(OH)_2 +anestésico, Ca(OH)_2 +soro fisiológico, Ca(OH)_2 +água destilada e Ca(OH)_2 +polietilenoglicol. As pastas com veículos oleosos mostraram significativamente zonas mais largas de inibição comparadas com aquelas que foram utilizadas veículos aquosos e viscosos. Foi concluído que a atividade antimicrobiana e de difusão do Hidróxido de Cálcio foram afetadas pelo tipo de veículo usado.

Almyroudi et al. (2002) compararam *in vitro* a eficiência de quatro desinfetantes como medicação intracanal: Hidróxido de Cálcio, Gel de Clorexidina, PerioChip® (Clorexidina num sistema de liberação controlada) e a combinação de gel de Clorexidina mais Hidróxido de Cálcio. Foram utilizadas amostras de raízes dentárias humanas contaminadas com *E.faecalis*, testando as substâncias em três tempos experimentais (3,8 e 14 dias). A ação do Hidróxido de Cálcio foi muito eficiente no grupo do terceiro e oitavo dia, enquanto que no décimo quarto dia não foi efetivo. A combinação do Gel de Clorexidina com o Hidróxido de Cálcio e Gel de Clorexidina apresentaram mínima diferença com o PerioChip® não havendo diferença estatística entre as medicações.

Quanto à formação do biofilme em canais radiculares medicados com hidróxido de cálcio, Distel et al. (2002) observaram a presença de formação de

biofilme apical com *E.faecalis* através da microscopia eletrônica de varredura e da microscopia a laser confocal de varredura em 46 dentes anteriores num período de 77 dias e no grupo controle em dois dias. Também realizaram uma análise do perfil de proteína da parede bacteriana através da eletroforese (SDS-PAGE) onde observaram a presença de proteases ativa nas amostras. Os autores mostraram a evidente formação do biofilme e colonização do *E.faecalis* em dentes medicados com Hidróxido de Cálcio em dentes humanos e que novos estudos devem ser realizados para entender o mecanismo de resistência deste microorganismo.

Sobre os mecanismos envolvidos na resistência do *E.faecalis* ao hidróxido de cálcio, Evans et al. (2002) demonstraram os mecanismos que capacitam esta bactéria de sobreviver ao alto pH desta medicação, expondo a dose subletal de hidróxido de cálcio com ou sem vários pré-tratamentos. Agentes bloqueadores foram adicionados para determinar o papel de síntese de proteína por esforço induzido e da bomba de prótons associada à parede bacteriana. O *E.faecalis* foi resistente ao hidróxido de cálcio num pH de 11,1, mas não a 11,5 e sem diferença de sobrevivência celular quando a síntese de proteína foi bloqueada durante a indução esforçada, entretanto, a adição de um bloqueador de bomba de próton resultou numa redução drástica da viabilidade celular de *E.faecalis* com hidróxido de cálcio. Os autores concluíram que a sobrevivência do *E.faecalis* com o hidróxido de cálcio parece não estar relacionada à síntese de proteína por esforço induzido, mas a bomba de prótons funcionando é crítica para a sobrevivência desta bactéria em pH alto.

Haenni et al. (2003) testaram e compararam a atividade antimicrobiana e química das pastas de Hidróxido de Cálcio com Clorexidina (CHX), Hipoclorito de Sódio (NaOCl), Iodo Iodeto de Potássio (IKI) e pasta de Hidróxido de Cálcio mais

soro fisiológico, empregando o teste de ágar difusão inoculados com o *E.faecalis* e *C.albicans*. A capacidade do Ca(OH)_2 em aumentar o pH na dentina radicular foi permanecida quando foram usadas misturas de Ca(OH)_2 com CHX, NaOCl ou IKI. As misturas com o Ca(OH)_2 tiveram as mesmas propriedades antimicrobianas que as misturadas com soro fisiológico. A eficácia da CHX foi reduzida quando misturada com o Ca(OH)_2 , e o efeito anti-séptico não foi observado entre o Ca(OH)_2 e o IKI ou o Ca(OH)_2 e o NaOCl. Foi concluído que a mistura do Ca(OH)_2 com as soluções testadas não mostraram um aumento do efeito antimicrobiano quando comparado com a pasta de Ca(OH)_2 e soro fisiológico.

Lynne et al. (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana de medicações intracanaís em canais radiculares com a dentina infectada pelo *E.faecalis*. As medicações testadas foram: a) água destilada - grupo controle; b) uma mistura de 10% de Hidróxido de Cálcio USP em 10 mL de água destilada estéril; c) 10% de Ca(OH)_2 em 0.12% de Gluconato de Clorexidina (Peridex®); d) Peridex® e e) grupo controle negativo - BHI puro. Os espécimes foram incubados por 24h, quando amostras de dentina foram retiradas através de brocas de maneira consecutiva (ISO 029,035,042) para uma análise quantitativa microbiológica. Todos os grupos testados apresentaram atividade antimicrobiana em relação ao grupo controle ($p < 0.001$). O grupo 2 demonstrou significativamente uma maior atividade antimicrobiana que os grupos 3 e 4 em todas as profundidades dentinária ($p < 0.05$). Esses resultados sugerem que 10% Ca(OH)_2 pode ser mais efetivo que o Peridex® ou 10% Ca(OH)_2 mais o Peridex® para a eliminação de *E.faecalis* em túbulos dentinários.

Com o intuito de avaliar *in vitro* o efeito antimicrobiano do Hidróxido de Cálcio combinado com a Clorexidina (Acetato de Clorexidina a 0,5%) ou com o Iodo

Iodeto de Potássio (IKI) em bloco de dentina bovina contra o *E.faecalis*, Síren et al. (2004) realizaram testes microbiológicos da coleta de dentina por brocas e mantiveram em placas de ágar, confirmando ou não o crescimento bacteriano. Os autores também realizaram teste de citotoxicidade e de pH da mistura das medicações, e confirmaram que a combinação de Hidróxido de Cálcio com Clorexidina e o IKI são mais eficazes que o Hidróxido de Cálcio puro, e que esta mistura não altera a alcalinidade das medicações podendo permanecer como medicação intracanal por um longo período. Quanto aos testes citotóxicos, estas misturas não são mais tóxicas quando utilizadas com seus componentes puros.

Baker et al. (2004) investigaram o efeito antimicrobiano de irrigantes e medicamentos endodônticos (Hidróxido de Cálcio, da Betadine - Povedine® e Iodo Iodeto de Potássio sem ou com um detergente - Tween 20, e de Betadine Scrub®) e se suas ações antimicrobianas foram melhoradas com um agente surfactante. Para tanto, os autores lançaram mãos do uso de discos de dentina bovina inoculados com *E.faecalis* que após a irrigação e a medicação do lúmen do canal, os espécimes foram encubados por 15 min ou 24 h. Análise quantitativa microbiológica foi realizada, onde observaram que a adição de um detergente não melhora a ação antibacteriana dos medicamentos, que o Hidróxido de Cálcio falhou na eliminação do *E.faecalis* e ambos Betadine Scrub® e Iodo Iodeto de Potássio agiram em 90% das amostras tornando-as estéreis. Concluíram que o Iodo Iodeto de Potássio foi capaz de eliminar o *E.faecalis* da dentina bovina quando utilizado por 15 minutos por contato.

A difusão apical do Hidróxido de Cálcio sobre os tecidos periapicais foi tema de um estudo realizado por Robert et al. (2005). Para tanto, os autores desenvolveram um método onde os medicamentos testados foram colocados nas

pontas de pipetas que representavam as raízes dentárias em que eram fixadas em seringas contendo ágar de BHI e corante reagente para Cálcio. As concentrações de Íons de hidroxila e cálcio foram medidas em 24h. A concentração de Íons Cálcio e o pH aumentaram com um tamanho de abertura maior, e mais alto o pH e a difusão de Íons Cálcio quando utilizado a medicação de solução a 10% de Ca(OH)_2 que utilizado o Pulpodent® ou a pasta de Ca(OH)_2 . Foi concluído que as propriedades do Ca(OH)_2 contendo veículos podem afetar a ação dos medicamentos nos tecidos periapicais.

Schäfer & Bössmann (2005) estudaram a mistura de hidróxido de cálcio com a clorexidina a 2% e ambos puros também, utilizando dentes humanos unirradiculares que após o preparo do canal, inocularam-no com *E.faecalis* incubando-os por nove dias. Na seqüência, os canais foram preenchidos com as medicações e incubados por três dias. Os canais foram instrumentados novamente com limas de numero 45, 50,55 e 60 de onde se removeu a dentina para a análise microbiológica das amostras. A Clorexidina foi significativamente mais eficaz contra o *E.faecalis* que o Hidróxido de Cálcio e a mistura da pasta e não houve um aumento na eficácia da mistura da pasta de Hidróxido de Cálcio com a clorexidina a 2%.Concluíram que a Clorexidina foi eficiente na eliminação de *E.faecalis* dos túbulos dentinários, num período de três dias sob as condições deste estudo.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, avaliando três formulações diferentes de Hidróxido de Cálcio (misturado com água destilada, Iodo Iodeto de Potássio e misturado com Iodofórmio e óleo de silicone) em tubos de dentina infectados com *E.faecalis* por uma semana e avaliadas pela quantidade de unidades de colônias formadas, Cwikla et al. (2005) verificaram que o Metamex®(Hidróxido de Cálcio mais Iodofórmio e óleo de silicone) foi o mais efetivo desinfetante de

túbulos dentinários apresentando resultados similar quando verificado a profundidade de dentina extraída destes túbulos.

Zarella et al. (2005) avaliaram a efetividade antimicrobiana contra o *E.faecalis*, da pasta de Hidróxido de Cálcio com água destilada e com solução aquosa de Clorexidina a 2% em dentes com insucesso de tratamento endodôntico num intervalo de 7 a 10 dias por três semanas, onde foram coletadas várias amostras antes da instrumentação e até o momento da obturação. Os autores observaram que sobre o total da amostra da população, 30% apresentaram positivamente com bactérias antes da obturação. A medicação controle desinfetou 60% dos dentes e a medicação experimental 80%, não havendo diferença estatística entre as amostras testadas. Nenhum dos dentes que continham inicialmente *E.faecalis* apresentou remanescente desta bactéria antes da obturação. Concluíram que tanto a pasta de Hidróxido de Cálcio com Clorexidina a 2% como a com água destilada desinfetaram de maneira eficácia os dentes com insucesso de tratamento endodôntico.

Observando *in vitro* a ação da pasta de Hidróxido de Cálcio, de Hidróxido de Cálcio com a Clorexidina a 2% e da Clorexidina gel a 2% em dentes inoculados com diversos microorganismos por 15 seg. à 24h pelo método de ágar difusão e contato direto, Gomes et al. (2006) verificaram que a pasta de Hidróxido de Cálcio mais a Clorexidina a 2% produziu zonas de inibição variando de 2.84 a 6.5 mm, num tempo de 30 seg. a 6 h para eliminar os microorganismos testados. Entretanto, a Clorexidina gel a 2% resultou em maiores zonas de inibição variando de 4.33 a 21.67 mm, num tempo inferior a 1 min para eliminar todos os agentes microbianos testados. A pasta de Hidróxido de Cálcio mais água destilada eliminou somente os microorganismos em contato direto num período de 30 seg. a 24h. Concluíram, que

a pasta de Hidróxido de Cálcio mais a Clorexidina gel a 2% eliminou mais microorganismos que a pasta de Hidróxido de Cálcio com água destilada.

Baseado na literatura para verificar a eficácia antibacteriana da medicação de Hidróxido de Cálcio através de uma revisão sistemática e de uma meta-análise, Sathorn et al. (2007) estudaram oito trabalhos com 257 casos em que a avaliação pré e pós-medicação com a pasta apresentaram diferença estatística significativa em seis trabalhos, enquanto que em dois não apresentaram, havendo uma heterogeneidade entre os estudos. Através da análise estatística entre os estudos realizada pelos autores, não houve diferença estatística significativa entre a pré e pós-medicação ($P=0.12$). Concluíram que o hidróxido de cálcio tem uma efetividade limitada na eliminação das bactérias da dentina radicular humana quando utilizadas as técnicas de culturas.

2.2.2 O Iodofórmio

Dentre as inúmeras medicações aplicadas em Endodontia, o Iodofórmio encontra seu espaço neste particular:

Em 1984, através de uma revisão bibliográfica sobre o uso do Iodofórmio em Endodontia, Aydos & Milano, relataram que o material era radiopaco quando utilizados junto a pastas de Hidróxido de Cálcio, que não possuía ação antibacteriana “in vitro” e que autores divergiam quanto à mesma ação “in vivo”. Quanto à capacidade de estimulação biológica do Iodofórmio, que pela falta de investigações, só podia ser considerada como uma hipótese.

Daniel et al. (1996) analisaram a toxicidade do Iodofórmio mais veículo cremoso (carbowax) em cultura de células de fibroblastos NIH 3T3 SWISS e

observaram que não houve alteração do número e viabilidade celular até 12 horas, mas depois deste período houve uma queda drástica que em 24h todas as células morreram. Concluíram que até 12h o Iodofórmio mostrou-se biocompatível, e que após metabolizado, mostrou-se citotóxico.

Adotando o teste de coagulação do lisado de amebócitos do artrópodo *Limulus polyphemus* (teste LAL), a ressonância magnética nuclear de prótons e a análise espectrofotométrica, Fernandes (1997) verificou se havia uma interação entre o Iodofórmio e a endotoxina bacteriana. Após a análise dos resultados, o autor concluiu que possivelmente existe uma interação química entre o Iodofórmio e a endotoxina bacteriana, alteração esta que ocorre na sua porção polissacarídica.

Daniel (1998) com o intuito de analisar comparativamente a citotoxicidade *in vitro* do Iodofórmio e do Hidróxido de Cálcio, empregando-se dois veículos diferentes (carbowax e polietileno glicol 400) através da reação de fibroblastos NIH 3T3 Swiss e avaliada por ensaios de viabilidade pela exclusão de células coradas pelo azul de Trypan. Observou que independentemente do veículo utilizado, o Hidróxido de Cálcio mostrou não ser citotóxico em 24h. Mas, por outro lado, o Iodofórmio apresentou diferentes níveis de citotoxicidade, após 24hs e quando empregado com o carbowax, apresentou-se menos agressivo em comparação ao emprego com o polietileno glicol 400.

Daniel et al. (1999) realizaram uma revisão da literatura sobre o Iodofórmio, referente às suas propriedades anti-sépticas, de estimulação biológica e emprego clínico na Endodontia. Concluíram que o Iodofórmio é uma substância radiopaca, facilmente reabsorvível e apresentando alto índice de sucesso clínico, e que também há divergência entre os autores com relação à capacidade anti-séptica e de estimulação biológica. Pois novos estudos laboratoriais e clínicos referentes à

ação antimicrobiana e de estimulação biológica devem ser realizados para justificar seu emprego no tratamento endodôntico.

Pallotta (2001) avaliou *in vitro* a atividade antibacteriana de quatro medicações de uso endodôntico (Iodofórmio, Hidróxido de Cálcio, IKI e CFC), pelo método de diluição em caldo com *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Bacteroides fragilis*. O autor concluiu que as diferentes concentrações foram fatores fundamentais para a ação antimicrobiana dos medicamentos e que todos tiveram ação bactericida contra todas as bactérias exceto o IKI sobre o *Pseudomonas aeruginosa*.

Quanto à análise radiográfica e microscópica do processo de reparo de lesões periapicais induzidas, após empregar medicações intracanaís (Iodofórmio+ carbowax, Hidróxido de Cálcio + PEG 400, CFC + PRP) em dentes molares de ratos Wistar, Daniel (2001) observou as reações inflamatórias e de reparo em 7,15 e 30 dias. Nos tempos experimentais de sete dias, o Hidróxido de Cálcio atingiu seu pico máximo de reação inflamatória, fato ocorrido aos 15 dias com o Iodofórmio. Em 30 dias, através da imagem radiográfica, o Iodofórmio contribuiu para a diminuição da lesão periapical e do processo inflamatório, não havendo diferença estatística entre as medicações utilizadas.

Ferreira et al. (2002) avaliaram a ação antimicrobiana do Hidróxido de Cálcio - Ca(OH)_2 associados ao Paramonoclorofenol Canforado (PMCC) e polietilenoglicol como veículo, Ca(OH)_2 em propileno glicol - pasta Calen, pasta Calen mais PMCC, Ca(OH)_2 associado ao Iodofórmio em propileno glicol, Iodofórmio em propileno glicol e Ca(OH)_2 mais anestésicos. Para tanto, avaliaram o halo de inibição feita através de perfurações em placa de ágar (Brain Heart Infusion) semeada com *E.faecalis* (ATCC 29212), onde foram colocadas as medicações

sendo incubadas a 37°C por 48h. Constatou-se uma discreta atividade inibitória para o Iodofórmio e para a pasta Calen mais PMCC. Os demais medicamentos não apresentaram atividade inibitória.

Com o intuito de avaliar a comparação da atividade antibacteriana do Hidróxido de Cálcio e do Iodofórmio associados à dentina, Breder (2003) empregou raízes extraídas de molares superiores necrosados portadores de lesão periapical que foram trituradas e misturadas às medicações testadas e com acréscimo de bactérias extraídas de biofilme dentais. Os espécimes foram avaliados pelo método da difusão em ágar, e observou que ambas as drogas possuíam atividade antibacteriana semelhante e que esta propriedade não sofreu ação inibitória da dentina. Seguidamente, Gomes (2003) investigou a resposta tecidual após tratamento endodôntico em dentes de cães portadores de lesões induzidas, realizados em sessão única ou com curativos de demora a base de Iodofórmio e Hidróxido de Cálcio, permanecendo por 15 dias. Os tratamentos eram analisados histologicamente após 30 e 90 dias. Foi observada resposta semelhante nos grupos tratados com curativo de demora apresentando inflamação branda e freqüente visualização de neoformação óssea e cementária, ao passo que no grupo dos dentes tratados em sessão única, foi encontrado infiltrado inflamatório severo, sem indícios de processo de reparação.

Duarte et al. (2003) avaliaram por meio de entrevistas nas primeiras 24 horas, a dor pós-operatória de 20 pacientes portadores de dentes com lesões periapicais que foram retratados e receberam como curativo de demora uma pasta a base de Iodofórmio. Concluíram que 60% dos pacientes não tiveram manifestação dolorosa e aqueles que relataram dor antes do procedimento, continuaram a apresentá-la, não tendo necessariamente ligação direta com a medicação.

Pallotta (2003) analisou quantitativa e qualitativamente as reações inflamatórias frente a medicações de Hidróxido de Cálcio e Iodofórmio em dorso de ratos albinos nos tempos experimentais de três, cinco e onze dias. Amostras foram coradas com Hematoxilina-Eosina e tricrômico de Mason para a análise histológica proposta. Observou que o grupo do Iodofórmio interferiu menos no processo de reparo enquanto que o do Hidróxido de Cálcio mostrou grande área de necrose demorando todo o período experimental para ser parcialmente recomposta. À análise quantitativa mostrou que o Iodofórmio provocou uma demora na inicialização da resposta, com um pico da reação inflamatória aos 5 dias, enquanto que o Hidróxido de Cálcio gerou um processo de necrose retardando o reparo tecidual.

Franco (2005) avaliou qualitativamente a difusibilidade do Iodofórmio através da dentina e do cimento empregando como reagente externo o tetracloreto de carbono. Para tanto, inicialmente se utilizou uma raiz palatina que depois de instrumentada foi preenchida com uma pasta a base de Iodofórmio e selada na região cervical com cimento de ionômero de vidro e cianoacrilato sendo imersa na solução. Houve uma alteração da coloração do tetracloreto de carbono devido à difusão do Iodofórmio ou de subprodutos chegando até a parte extra-radicular. Para validar o experimento, este foi repetido onze vezes cujo resultado pôde-se concluir que o período de maior alteração de cor do tetracloreto de carbono se deu entre o sétimo e quatorze dias após o início do experimento.

Gentil (2007) verificou quantitativamente *in vitro* a exteriorização de Iodofórmio aplicado intracanal após a realização dos procedimentos básicos periodontais. Para este experimento, foram utilizadas 16 raízes de pré-molares inferiores que depois de instrumentadas foram divididas em: Grupo I (cimento intacto com pasta a base de Iodofórmio no interior do canal), grupo II (cimento

raspado e posterior colocação de Iodofórmio no canal), grupo III (colocação de Iodofórmio e cimento raspado após sete dias) que tiveram cada espécime submerso em 15 ml de etanol P.A. Amostras iniciais, 2, 5, 7 e 15 dias foram coletadas para análise em espectrofotometria. O autor concluiu que medicamentos à base de Iodofórmio impregnam a dentina e o cimento difundindo-se até o periodonto, especialmente a partir do 15º dia no grupo onde o cimento foi removido e mais intensamente quando a remoção do cimento ocorreu após sete dias.

Pallotta et al. (2007) determinaram a concentração mínima inibitória de quatro medicamentos (Iodofórmio, Hidróxido de Cálcio, CFC e IKI) utilizados em cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Bacteroides fragilis*. Neste experimento, os autores observaram que o IKI não mostrou ação contra o *S. aureus* e *P. aeruginosa*, assim como o hidróxido contra o *P. aeruginosa*. A MIC para o *E. faecalis* foi a mais alta para a CHI₃, seguida por Ca(OH)₂, IKI e CFC respectivamente. Para o *B. fragilis*, o CHI₃ e o CFC apresentaram a mesma MIC (0,25 mg mL⁻¹), mais baixa que o IKI e o Ca(OH)₂; para o *S. aureus* as MIC também foram mais baixas para o CFC, seguido pelo CHI₃ e Ca(OH)₂. Além disso, para o *P. aeruginosa*, a MIC foi de 0,125 e 64 mg mL⁻¹ respectivamente para o CFC e CHI₃.

Machado (2007) ressaltou a importância da utilização das medicações intracanaís após o preparo do sistema de canais radiculares como complementação da ação desinfetante não conseguida na instrumentação, pois esse procedimento promoverá a desinfecção química dos túbulos dentinários contra microorganismos presentes nesta complexa anatomia. Os autores preconizam a utilização do Iodofórmio como medicação extra e intracanal nos casos de lesões refratárias pela

suas características gerais, ação antimicrobiana e que ainda nestes casos favorece a reparação tecidual.

2.3 Metodologia

Neste contexto serão apresentadas algumas metodologias que poderão ser empregadas de maneiras isoladas ou associadas com a proposta de avaliar o comportamento destes fármacos sobre esta bactéria.

Ramachandran Nair (1987) analisou a microflora de 31 canais radiculares (30 granulomas e 1 cisto radicular) quanto a sua estrutura, relação com a parede dentinária, aspectos morfológicos da interação entre os microorganismos e a natureza dinâmica da resposta do hospedeiro. Para tanto, o autor lançou mão de estudos através da microscopia de luz e eletrônica, de onde observou que a flora era composta de *cocci*, *rods*, organismos filamentosos e espiroquetas. Os *rods* estavam freqüentes em paredes de bactérias Gram-negativas. A flora bacteriana era formada por um aglomerado de colônias auto agregadas de um tipo distinto ou comunidades co-agregadas de vários tipos. Camada bacteriana aderida às estruturas cercadas de placas bacterianas na superfície dentária. Foi observada também uma camada de células de defesa ao redor dos microorganismos revelando a resposta imunológica específica ao redor do periápice.

Wendt et al. (1998) utilizaram um método estatístico para comparar a habilidade de cepas de *E.faecium* (três *enterococci* resistentes a vancomicina - VRE e cinco *enterococci* suscetível a vancomicina - VSE) e cepas de *E.faecalis* (uma VRE e dez VSE) para sobreviver em condições secas. Para este experimento, suspensões bacterianas com as cepas foram inoculadas em cloreto polivinílico e

armazenadas nas condições definidas por até 16 semanas. Todas as amostras sobreviveram por pelo menos uma semana, e dois tipos de cepas sobreviveram por 4 semanas. O tipo de curva de sobrevivência não foi associado às espécies, ao meio de isolamento ou a susceptibilidade a vancomicina. Resistências para condições secas podem promover a transmissibilidade de uma cepa, mas VRE não possui vantagens sobre a VSE referente à capacidade de sobrevivência em condições secas.

Silver & Simon (2000) apresentaram um relato de caso clínico que o granuloma apical não respondeu ao tratamento endodôntico convencional. O material foi submetido a uma análise radiográfica, histopatológica e ultraestrutural. A Microscopia Eletrônica de Transmissão revelou a presença de cristais de Charcot-Leyden dentro da lesão periapical na qual foi confirmada histopatologicamente como de acordo com um granuloma apical. Após a análise dos resultados, os autores discutiram seu potencial clínico significativo.

Dorn et al. (2002) determinaram se microorganismos de cepas laboratoriais e isolados clinicamente associados com infecções de canais radiculares podem invadir culturas primárias de células cardiovasculares. Níveis quantitativos de invasão bacteriana em células endoteliais de artérias coronárias humanas (HCAEC) e células musculares lisas de artérias coronárias (CASMC) foram medidas usando uma análise de proteção para antibiótico padrão. A Microscopia Eletrônica de Transmissão foi usada para confirmar e visualizar a interiorização nas células vasculares. Das cepas testadas, apenas a *P.endodontalis* ATCC 35406 foi invasiva pela análise de proteção para antibiótico padrão usando HCAEC e CASMAC. Invasão de *P.endodontalis* ATCC 35406 foi confirmada pela MET. Os autores afirmaram que certos microorganismos associados com infecções endodônticas são

invasivos. Se a invasão bacteriana dos vasos contribui a patogênese de doenças cardiovasculares, então microorganismos da câmara pulpar representam um potencial patogênico.

Weiger et al. (2002) criaram neste estudo um método de caracterização do estado de vitalidade das bactérias em dentina radicular humana infectada pela diferenciação entre microorganismos viáveis e mortos. Vinte e quatro segmentos radiculares de dentes humanos extraídos foram infectados por *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus sanguinis* durante oito semanas, quando neste período experimental, os canais foram instrumentados e uma pasta de Hidróxido de Cálcio foi inserida permanecendo até a décima segunda semana. Amostras de dentina radicular e 1 ml do meio de cultura foram retiradas nos períodos de quatro, oito e doze semanas para análise microbiológica através da foto microscopia de fluorescência (PVB) e contagem de unidades de colônias formadas (CFU). Bactérias mortas e viáveis foram identificadas em todas as amostras de dentina radicular. Na análise de PVB, os valores obtidos das amostras de dentina radicular foram inferiores que os da suspensão bacteriana. No grupo controle não houve diferença entre os métodos nos períodos de quatro e oito semanas. No grupo testado, *Streptococcus sanguinis* viáveis, mas sem capacidade para cultura, foram detectadas mesmo com o tratamento de Hidróxido de Cálcio. A viabilidade do *E.faecalis* não foi afetada pelo Hidróxido de Cálcio. Os autores concluíram que o método de análise microbiológica por PVB deu informações adicionais de estado de vitalidade bacteriana comparado com o método de CFU, principalmente de bactérias nos túbulos dentinários e na presença de medicação intracanal.

Portenier et al. (2002) pesquisaram a atividade antibacteriana do Digluconato de Clorexidina (CHX) e do Iodo Iodeto de Potássio (IKI) sobre o

E.faecalis A197A na presença da dentina, matrix dentinária, dentina pré-tratada por EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e ácido cítrico, colágeno, e células mortas por aquecimento de *E.faecalis* e *Candida albicans*. Amostras foram coletadas e incubadas após 1 e 24h para a realização da análise microbiológica através da contagem de colônias formadas. A matriz dentinária e células microbianas mortas por aquecimento foram as inativadoras das medicações mais efetivas contra o *E.faecalis*, enquanto que a dentina pré-tratada por EDTA e ácido cítrico mostrou apenas uma leve inativação. Dentina e colágeno da pele mostraram inativação em 1h, mas não em 24h. O IKI foi efetivamente inativado pela dentina, matriz dentinária e células microbianas mortas por aquecimento. Colágeno da pele e dentina pré-tratada por EDTA ou ácido cítrico mostrou pouco ou nenhum efeito de inibição sobre o IKI. Concluíram que diferentes componentes da dentina foram responsáveis por padrões diferentes de inibição da atividade antibacteriana do CHX e IKI. Tratamento químico da dentina antes da colocação da medicação intracanal pode alterar o efeito antibacteriano da medicação.

Gomes et al. (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana do gel de Clorexidina a 2%, Hidróxido de Cálcio e Hidróxido de Cálcio mais Clorexidina gel a 2% contra o *E.faecalis* em tempos experimentais diferentes como 1, 2, 7, 15 e 30 dias, utilizando dentes bovinos e colocando em meio de cultura. Para a avaliação, os autores realizaram a leitura da turbidez do meio de cultura nestes tempos experimentais, em que verificaram que: a Clorexidina foi efetiva até 15º dia, o Hidróxido de Cálcio permitiu crescimento bacteriano em todos os tempos e o Hidróxido de Cálcio mais a Clorexidina gel a 2% foram efetivos nos dois primeiros dias, diminuindo a atividade bacteriana após 7 e 15 dias. Concluíram que a Clorexidina gel a 2% é mais eficaz contra o *E.faecalis* que o Hidróxido de Cálcio e

que a atividade bacteriana depende do tempo de permanência da medicação dentro do canal radicular.

Menezes et al. (2004) avaliaram *in vitro* a efetividade de irrigantes e medicamentos intracanal (Hidróxido de Cálcio, Paramonoclorofenol Canforado, Tricresol formalina, pasta de Hidróxido de Cálcio com Paramonoclorofenol Canforado, Paramonoclorofenol mais Furacin, Hipoclorito de Sódio a 2,5% e Clorexidina a 2%) contra o *E.faecalis* e a *Candida albicans*, incubados por sete dias de onde se retiraram amostras antes da colocação dos agentes antimicrobianos e após este período para a contagem de formação de colônias. Concluíram que a pasta de Hidróxido de Cálcio mais Paramonoclorofenol Canforado foi o mais efetivo contra os dois microorganismos e que a solução de Clorexidina a 2% foi mais efetiva que o Hipoclorito de Sódio a 2,5% contra o *E.faecalis*.

Portenier et al. (2005) compararam a susceptibilidade das células de *E.faecalis* (cepas VP3-80 e A197A) durante as fases de crescimento, estacionárias e declínio a três medicamentos endodônticos (solução saturada de Hidróxido de Cálcio, Digluconato de Clorexidina a 0,05% e Hipoclorito de Sódio a 0,00001%). Os autores realizaram testes antimicrobianos, de SDS-Page e análise morfológica utilizando a microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Células na fase exponencial de crescimento mostraram ser mais sensíveis sendo eliminadas entre 3s a 10 min. Na fase estacionária, foram mais resistentes apresentando viabilidade celular após 10 min. Entretanto, na fase de declínio, foram as mais resistentes não sendo totalmente eliminadas durante o tempo de exposição de 10 min ao medicamento, aumentando o número de células sobreviventes em culturas bacterianas.

Castillo et al. (2006) realizaram um estudo comparativo da atividade antimicrobiana de um detergente à base de arginina - $C_3(CA)_2$, e da clorexidina dihidroclorada (CHX) contra o *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* através da MIC (Concentração Máxima Inibitória), citometria de fluxo e microscopia eletrônica de transmissão. Ambos os desinfetantes causaram ruptura da membrana celular das bactérias alvos por causar infiltração de potássio e danificação morfológica. O efeito do $C_3(CA)_2$ sobre a *E.coli* depende da concentração, causando perda do potencial e da integridade da membrana levando a morte celular, enquanto que o CHX não teve este efeito sobre o *E.coli*. O efeito do $C_3(CA)_2$ sobre o *S.aureus* foi de formação de vesículas e zonas claras no interior do citoplasma, mas a perda do potencial da membrana e de sua integridade foi levemente mais baixa que o CHX. Os autores concluíram que o $C_3(CA)_2$ age contra bactéria Gram negativa em direção à superfície de lipopolissacarídeo e, subsequencialmente, para dentro da membrana celular causando danos à estrutura seguida de morte celular.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como propósito avaliar a ação antimicrobiana do Hidróxido de Cálcio e do Iodofórmio sobre o *Enterococcus faecalis* em diferentes períodos experimentais tendo como referência experimental o método da diluição em caldo e a visão direta das possíveis alterações na morfologia celular com auxílio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o presente estudo, foi utilizado os seguintes materiais e equipamentos:

4.1 Materiais

- 1 L de água destilada estéril, fornecida pelo Laboratório Alerta da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - São Paulo – Brasil;
- 1 pacote de alça descartável estéril com 100 unidades.(Pleion, Barueri –São Paulo –Brasil);
- 2 Becker de 100ml graduado autoclavável transparente. (Nalgene, Rochester - New York - EUA);
- 1 caixa com 200 unidades de microtubes MCT-150-C 1,5ml clear. (Axygen Scientific, Califórnia - EUA);
- 1 caixa de Filtros para seringas autoclavável. 195-2520.(Nalgene , Rochester - New York - EUA);
- 1 caixa de Placa de Petri lisa ecológica 150x50mm.Ref.1149.A-19.(Pleion, Barueri –São Paulo –Brasil);
- 1 caixa de Placa de Petri lisa ecológica 90x15mm.Ref. 70409/1-2.(Pleion, Barueri –São Paulo –Brasil);
- 1 caixa de Ponteiras sem filtro Universal - 20µl.Finetips. (Axygen Scientific, Califórnia - EUA);

- 1 caixa de Ponteiros sem filtro Universal –1000µl.Finetips. (Axygen Scientific, Califórnia - EUA);
- 1 caixa de Ponteiros sem filtro Universal - 5ml.Finetips.(Axygen Scientific, Califórnia - EUA);
- 1 caixa de tubo tipo Falcon de 50ml.(Pleion, Barueri –São Paulo –Brasil);
- 1 caixa de tubo tipo Falcon de 15ml.(Pleion, Barueri –São Paulo –Brasil);
- Cepas de *Enterococcus faecalis* da ATCC (American Type Culture Collection) 29212 oriundas do banco de microorganismos do LEMC (Laboratório Especial de Microbiologia Clínica) - Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - São Paulo;
- Frasco de Hidróxido de cálcio P.a. (Pró-análise), 7 g.(Fórmula e Ação Ltda ME. São Paulo-Brasil);
- Frasco de Iodofórmio 10g. (Fórmula e Ação Ltda ME. São Paulo-Brasil);
- 1 Nutrient Agar: CM003 500g.(Oxoid Ltda. Hampshire - Inglaterra);
- 5 Seringas Descartáveis Estéreis. Unijet 20ml. (Plascalp Feira de Santana, Bahia - Brasil);
- Software Estatístico GMC 2002 - Prof. Dr. Geraldo Maia Campos (Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil).
(<http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.html>) e pelo <http://www.graphpad.com/quickcalcs.cfm>;
- 1 Suporte para microtubos de 1,5ml. (Pleion, Barueri –São Paulo –Brasil);
- 1 Suporte para tubos Falcon de 50ml. (Pleion, Barueri –São Paulo –Brasil);
- 1Tryptic Soy Broth 500g. Casein-peptone soy meal-peptone broth for microbiology. (Merck. KGaA - Alemanha);

- 5 Tubos de ensaio reforçado com tampa rosqueável 13x10mm. (Vidrolabor. São Paulo, Brasil).

4.2 Equipamentos

- a) agitador de tubos - modelo AP56. (Phoenix. Araraquara - São Paulo - Brasil);
- b) aparelho para Banho-Maria - modelo PC 620.(Corning - Laboratory Stirrer - EUA);
- c) balança Analítica Digital - modelo AX 200 (Shimadzu - Filipinas);
- d) centrífuga 5415R. (Eppendorf, Hamburgo - Alemanha);
- e) computador - modelo SATELITE A 70. (Toshiba - China);
- f) congelador 260 L .(Bosch,Campinas - São Paulo - Brasil);
- g) contador de Colônias Manual - modelo CP 608 (Phoenix, Araraquara - São Paulo - Brasil);
- h) estufa de Cultura, modelo TE 39211. (Tecnal, Piracicaba - São Paulo - Brasil);
- i) fluxo Laminar Horizontal, modelo PA100. (Pachane, Piracicaba - São Paulo - Brasil);
- j) micropipetas automáticas calibradas de 20, 1000 e 5000 μ l (Eppendorf - Alemanha);
- k) microscópio Eletrônico de Transmissão - Modelo JEOL 1200 EXII (80 kV), Japão do Laboratório CEME (Centro de Microscopia Eletrônica) da UNIFESP , São Paulo-Brasil;
- l) refrigerador double DC 440.(Eletrolux ,Curitiba - Paraná - Brasil);

m) turbidímetro MicroScan Turbidity Meter® (Dade Behring Inc., Sacramento - Califórnia - EUA).

4.3 Métodos

Desta forma para a realização do experimento foram realizados os seguintes ensaios: Teste Antibacteriano e a investigação pela Microscopia Eletrônica de Transmissão, sendo assim este ensaio experimental seguiu a seguinte seqüência:

4.3.1 Teste Antibacteriano

Para este Teste de Diluição em Caldo baseado nas Normas CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute - USA*), foram utilizadas cepas bacterianas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) armazenadas no banco de microorganismos do LEMC (Laboratório Especial de Microbiologia Clínica - Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - São Paulo - Brasil).

A inoculação da ATCC 29212 foi em placa de Agar nutriente de Miller-Hinton incubada por 18 à 24h, entre 35°C e 37°C (figura 1). Após esta etapa, prepararam-se as medicações intracanáis testadas: o Hidróxido de Cálcio - Ca(OH)_2 e o Iodofórmio - CHI_3 (figura 2). Estas foram diluídas e calculadas numa elevada concentração para o Teste de Sensibilidade, 64mg mL^{-1} , baseado no trabalho de Pallotta et al. (2007), uma vez que estas drogas rotineiramente são utilizadas na Endodontia numa proporção de 5:1 (cinco porções de pó de hidróxido de cálcio ou iodofórmio para uma de polietilenoglicol; Machado, 2007). As substâncias foram

diluídas em glicerina estéril (10 ml) de acordo com Pallotta (2001) e colocadas em recipientes apropriados (Tubo do tipo Falcon).



Figura 1 - Placa de Ágar nutriente contendo cepas de *E. faecalis* (ATCC 29212).



Figura 2 - Frascos contendo 10g das medicações de hidróxido de cálcio e iodofórmio utilizados neste trabalho.

Após este passo, tubos de ensaio plásticos (do tipo Falcon de 50ml) foram identificados e inseridos 18 ml de caldo de cultura de BHI (Brain Heart Infusion) mais 2ml dos fármacos diluídos em cada um dos frascos que em seguida foram passados no vórtex para a homogeneização das substâncias (figura 3). Logo em seguida,

foram adicionadas colônias de bactérias até se obter uma suspensão bacteriana a 0.5 da escala de McFarland ($1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$ ou 7 a 8,3 Log) sendo verificado em Turbidímetro (figura 4).

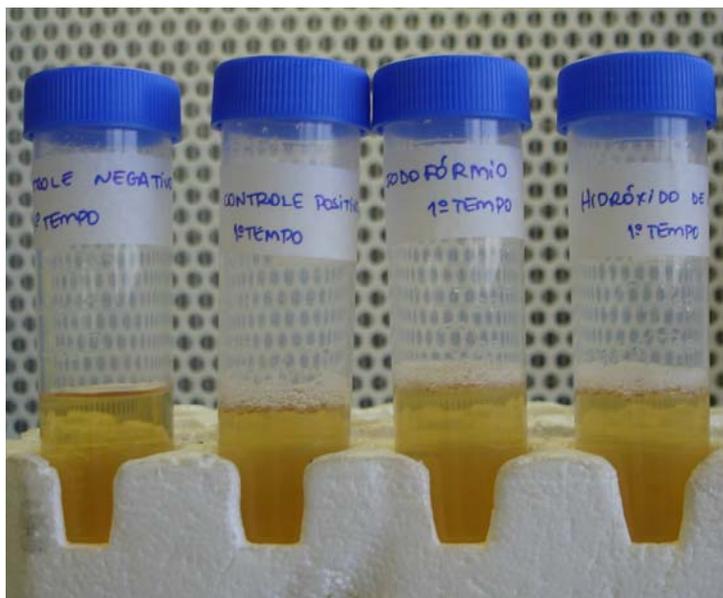


Figura 3 - Suporte contendo Tubos Plásticos do tipo Falcon (50 mL) identificados para cada amostra com caldo de cultura e medicação diluída.

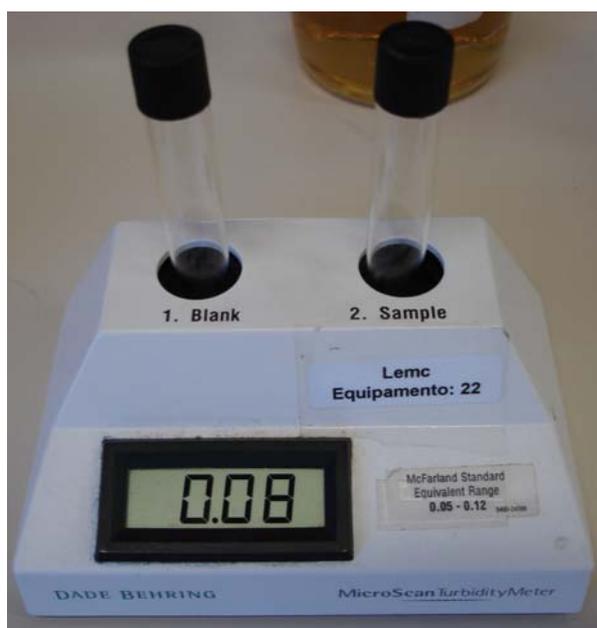


Figura 4 - Verificação no Turbidímetro de uma amostra com meio de cultura mais o medicamento diluído mostrando o valor na escala que corresponde a 0.5 na escala de McFarland.

Seguidamente, foram colhidos 100 μ l de cada amostra dos tubos identificados e diluídos em 900 μ l de água destilada em um recipiente Eppendorf de 1,5ml sendo misturado em vórtex. Novamente, se retirava 100 μ l da amostra diluída, repetindo os mesmos passos até a sexta diluição em frasco de Eppendorf (figura 5). Quando desta última diluição, com uma micropipeta Eppendorf calibrada em 20 μ l, três amostras de todos os frascos foram retiradas e gotejadas em placas de Agar nutriente identificadas (figura 6).



Figura 5 - Figura demonstrando uma Micropipeta Eppendorf (1000 μ l) , suporte com frascos Eppendorf de 1,5 ml contendo água destilada para a realização da Contagem de colônias formadas por mL.

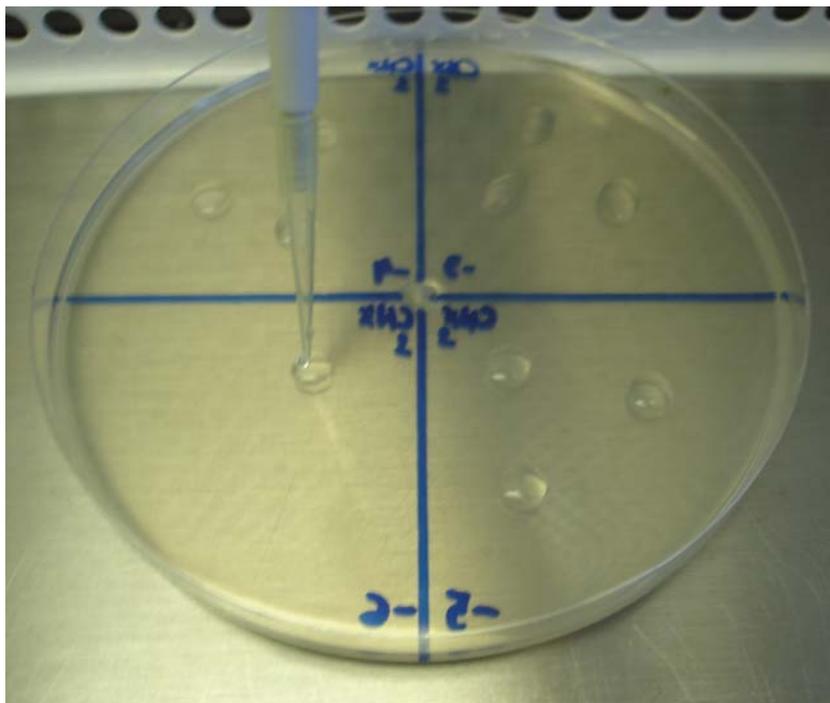


Figura 6 - Gotejamento de 20 μ l da amostra diluída do grupo do iodofórmio em placa de Petri com ágar nutriente.

Todo procedimento foi realizado em Fluxo Laminar para não haver contaminação das amostras (figura 7) que após terem suas gotas secas, as placas foram mantidas em estufa microbiológica (figura 8) a 37°C de 18 às 24h, quando realizado a leitura da quantidade de colônias formadas (figura 9) em um contador de colônias manual.



Figura 7 - Equipamento de Fluxo laminar, onde foi realizado o experimento.



Figura 8 - Estufa Microbiológica utilizada durante o experimento.

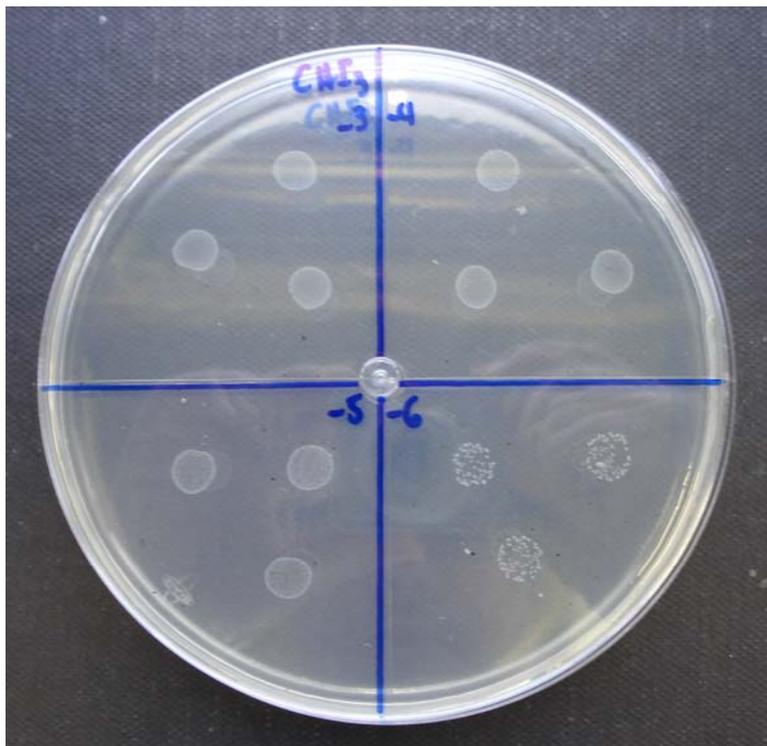


Figura 9 - Figura mostrando as colônias de *E. faecalis* formadas em placa de ágar nutriente após 18h em estufa microbiológica.

Este procedimento foi repetido nos seguintes intervalos: de 7, 14 e 21 dias, sendo submetidas a uma quantificação de colônias formadoras. O processo de contagem das colônias formadas foi realizado em um contador de colônias manual, através de uma lupa de aumento (1,5X), sendo contado as colônias formadas que cresceram das três gotas de 20µl de cada amostra do experimento. O número total de colônias formadas nas placas de Petri foi obtido através da seguinte maneira:

1. Calculou-se a média de colônia das três gotas.
2. O valor da média foi multiplicado por 50 (fator de equivalência da amostra diluída) e 10^6 - N° total = média x 50 x 10^6 .

Este teste antimicrobiano foi realizado em três tempos distintos para se confirmar e validar os dados obtidos (teste de reprodutibilidade). Ao término da terceira etapa do teste antibacteriano, os dados obtidos foram transformados em

números logarítmicos, inseridos numa tabela e colocados em gráficos para a análise interpretativa dos resultados. Os valores foram submetidos à análise estatística ao Teste Exato de Fisher (GMC 2002) e <http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>, fazendo comparações entre os dados e os tempos experimentais.

4.3.2 *Microscopia Eletrônica de Transmissão*

Quando o segundo tempo deste teste foi realizado, amostras foram removidas para análises ultra-estruturais pela microscopia eletrônica de transmissão, onde foram retiradas amostras de 5ml dos tubos identificados a serem fixadas de acordo com a técnica empregada no CEME (Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP) - São Paulo - Brasil. Para a realização desta etapa investigativa, foram colhidos 5mL de cada amostra (Grupo Controle Positivo, Hidróxido de Cálcio e Iodofórmio) da segunda repetição do teste de sensibilidade e colocada num tubo de 10mL, juntamente com o material fixador. As amostras foram preparadas da seguinte maneira:

Fixação do material decantado ou precipitado em uma solução de glutaraldeído a 2,5% e formaldeído a 2% em tampão cacodilatado de sódio 0,1mol (pH 7,2) por 2 horas à temperatura ambiente (25°C) e agitação constante. Em seguida, as amostras foram lavadas 3 vezes em tampão cacodilatado de sódio 0,1mol (pH 7,2) (2 vezes por 20 min e 1 vez durante a noite) e pós-fixadas com uma solução de tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio 1,25% em tampão cacodilatado de sódio 0,1mol (pH 7,2) por 15 min. Logo após, foram lavadas novamente duas vezes por 10 min em tampão cacodilatado de sódio 0,1mol (pH 7,2). Os espécimes foram desidratados gradualmente em etanol 70% e 90% uma vez por 20 min e 100% duas vezes por 15 min cada, e passados em óxido de propileno duas

vezes por 15 min cada. Após, infiltrados na resina, através da passagem por óxido de propileno/resina Epon 1:2 por 2 horas, seguido de óxido de propileno/resina Epon 1:3 durante a noite (tampa aberta). Colocados em resina pura 2 vezes por 2 horas, seguido de mais 2h em uma câmara de vácuo. Polimerizados por 48 h à 60°C. Coletados em lâmina os cortes semi-finos com espessura de 300 a 500nm e corados em solução aquosa de azul de toluidina à 1%.

Os cortes ultrafinos, com espessura de 70 a 90 nm, foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila saturada e citrato de chumbo.

As tomadas eletromicrográficas foram realizadas através de um Microscópio Eletrônico de Transmissão à 80kV (figura 10). De posse das fotos micrografias, as imagens foram analisadas morfológicamente, observando-se o efeito das medicações sobre as bactérias comparando-se com o grupo controle e se baseando no trabalho de Castillo et al. (2006).



Figura 10 - Microscópio Eletrônico de Transmissão do Laboratório CEME (Centro de Microscopia Eletrônica) da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo-Brasil.

5 RESULTADOS

Para uma melhor compreensão, os resultados deste trabalho foram posicionados em relação as suas respectivas metodologias, assim sendo:

5.1 Teste Antibacteriano

Os valores individuais dos três tempos distintos (Teste de reprodutibilidade) referente ao crescimento de culturas nos meios utilizados se encontram expressas nas tabelas do Anexo A. Isto posto, para uma melhor compreensão os valores sofreram o seguinte tratamento: cada valor individual foi transformado em número logaritmo (Anexo B), e os valores médios com seus respectivos desvios padrão foram obtidos e inseridos na tabela 1 e gráfico1.

Tabela 1 - Valores médios em número logaritmo com desvio padrão dos grupos em função dos tempos experimentais. (* Log 0 = 1).

	IODOFÓRMIO	CA(OH) ₂	CONTROLE POSITIVO	CONTROLE NEGATIVO
INICIAL	9.88 ±0.19	9.69 ±0.53	9.76 ±0.13	-
7 DIAS	8.99 ±1.43	9.19 ±0.46	9.65 ±0.15	-
14 DIAS	1* ±0	1* ±0	8.58 ±0.08	-
21 DIAS	1* ±0	1* ±0	7.37 ±0.11	-

Pode-se notar uma diminuição do número de colônias formadas de *E. faecalis* em função dos tempos experimentais, principalmente havendo uma queda brusca da formação de colônias bacterianas entre 7 e 14 dias para os grupos das medicações empregadas de Iodofórmio e Hidróxido de Cálcio. Quanto ao Grupo Controle Negativo, nenhuma amostra de meio de cultura se apresentou contaminada durante a realização deste experimento.

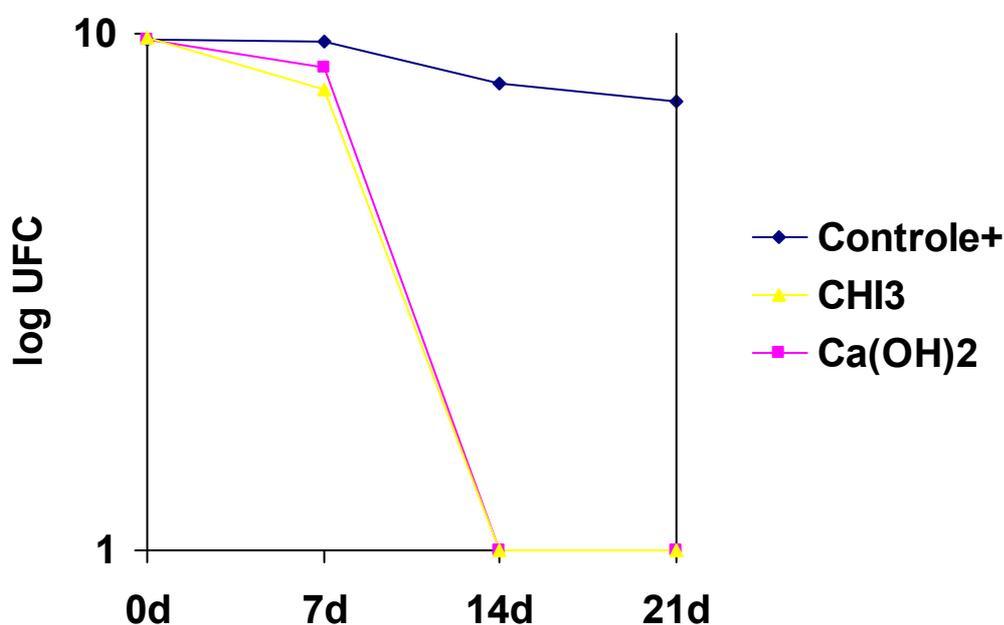


Gráfico 1 - A ação das medicações sobre o *E. faecalis* em relação aos tempos experimentais.

Para uma melhor interpretação dos resultados foi realizado o tratamento estatístico, neste particular os cálculos que compõem as diferentes fases deste procedimento estão contidos no Anexo F. Quando concluído o procedimento matemático, pode-se posicionar seus valores constituindo assim a tabela 2.

Tabela 2 - Resultado do Teste Exato de Fisher, associando-se os grupos de Hidróxido de Cálcio e Iodofórmio com o controle positivo e entre si, nos diferentes tempos experimentais

	CHI ₃ /C+	CA(OH) ₂ /C+	CHI ₃ / CA(OH) ₂
7 DIAS	p=1	p=1	p=1
14 DIAS	p=0,0976*	p=0,0976*	p=1
21 DIAS	p=1	p=1	p=1

Da sua interpretação pode-se dizer que o Hidróxido de Cálcio e o Iodofórmio eliminaram o *E.faecalis* entre 7 e 14 dias (p=0, 0976, * $\alpha = 0.05$), não havendo diferença estatística significativa entre as medicações e em todos os tempos experimentais (p=1).

5.2 Análise pela Microscopia Eletrônica de Transmissão

De posse das imagens das amostras, foi realizada a análise morfológica em relação ao grupo controle. Para melhorar entendimento, foi montado um gabarito mostrando as estruturas morfológicas normais (Grupo Controle) de um *E.faecalis*, para ser comparado com as alterações das estruturas morfológicas que as medicações causam nesta bactéria (Grupo Hidróxido de Cálcio e Iodofórmio).

Grupo Controle Positivo: Fotomicroscopia Eletrônica de Transmissão.

Barras de 0,2 μm . Observa-se uma célula bacteriana de *Enterococcus faecalis*, após 7 dias de incubação em meio de cultura BHI, apresentando parede celular bacteriana

íntegra, delimitada e espessa contendo em seu interior material protéico citoplasmático distribuído de maneira uniforme e organizado (figura 11).

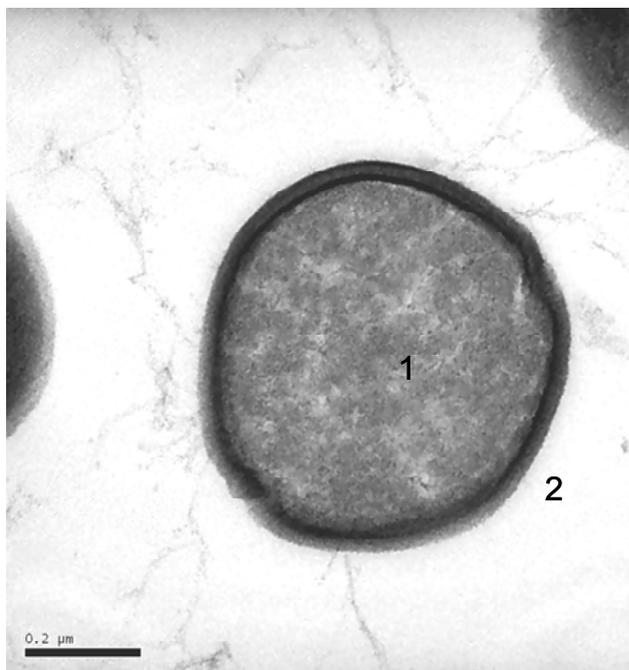


Figura 11 - *E. faecalis* após 7 dias de Incubação (Grupo Controle), onde se destaca a organização e uniformidade do material citoplasmático (1) assim como a integridade da parede celular (2).

Grupo CHI₃ (Iodofórmio): Fotomicroscopia Eletrônica de Transmissão.

Barras de 0,5µm e 0,2 µm. Observa-se uma célula bacteriana de *Enterococcus faecalis*, após 7 dias de incubação em meio de cultura BHI mais Iodofórmio. As células bacterianas demonstraram-se com seu material citoplasmático desorganizado e irregular, contendo a formação de vesículas em seu interior e quando aderidas à parede celular extracelularmente, há uma alteração da integridade da parede (figura 12). Em algumas células, nota-se a exteriorização do material intracitoplasmático através de vesículas e rompimento da membrana celular (figura 13).

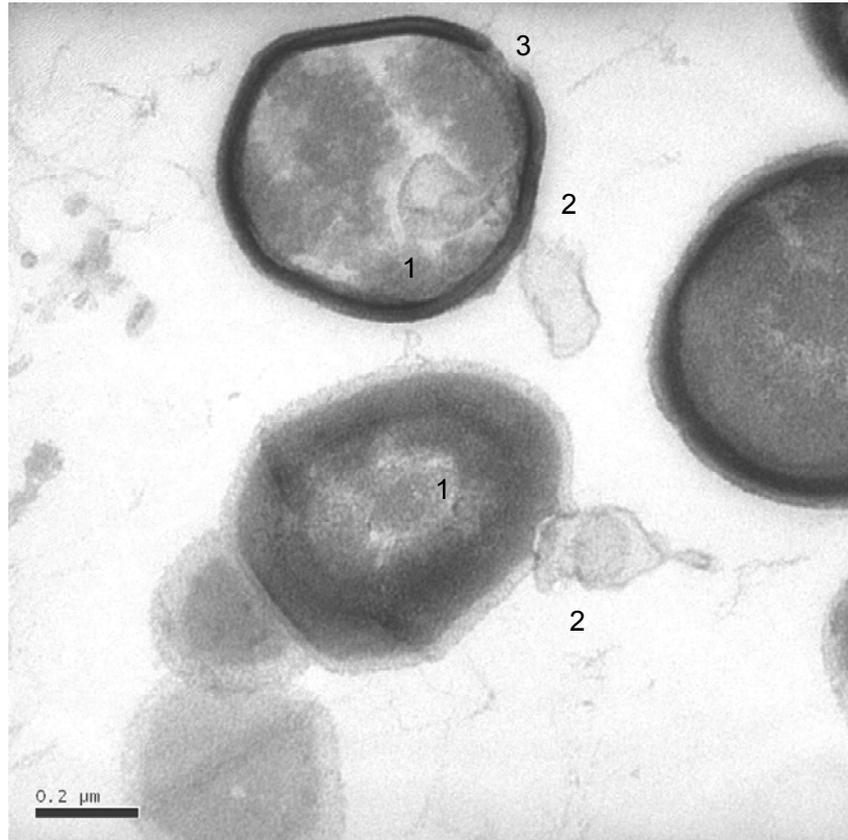


Figura 12 - Imagens mostrando as formações vesiculares, intracelular com desorganização do material citoplasmático (1) e extracelular (2) e alteração da parede celular (3).

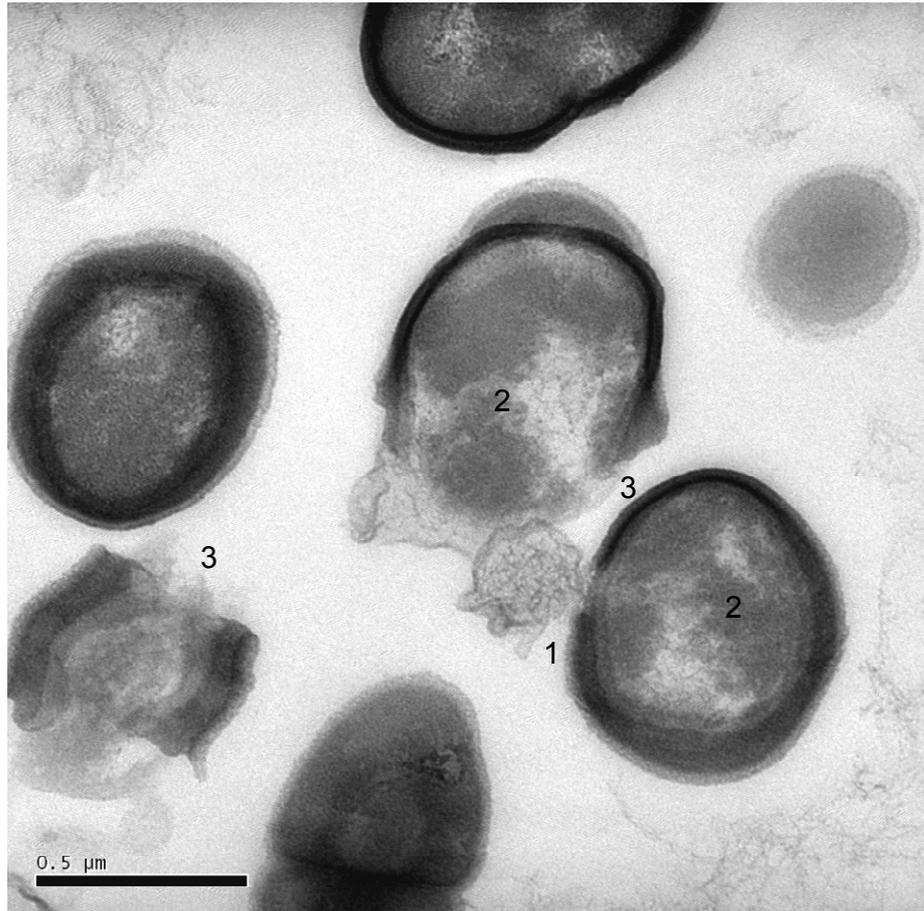


Figura 13 - Imagem mostrando a exteriorização do material intracitoplasmático através de vesículas (1), desorganização citoplasmática (2) e rompimento da membrana celular (3).

Grupo Ca(OH)_2 (Hidróxido de Cálcio): Fotomicroscopia Eletrônica de Transmissão. Barras de 0,5µm, 0,2 µm e 1 µm. Observa-se uma célula bacteriana de *Enterococcus faecalis*, após 7 dias de incubação em meio de cultura BHI mais Hidróxido de Cálcio P.a. Neste grupo, observam-se alterações citoplasmáticas com áreas mais densas e formações de vesículas bem nítidas, formações de vesículas externas contendo material citoplasmático e exteriorização deste material (figura 14). Essas vesículas extracelulares apresentam-se com comunicação à parede bacteriana havendo uma alteração desta região e exteriorização de material

citoplasmático (figura 15). Algumas células bacterianas apresentaram-se em processo de bacteriólise (figura 16).

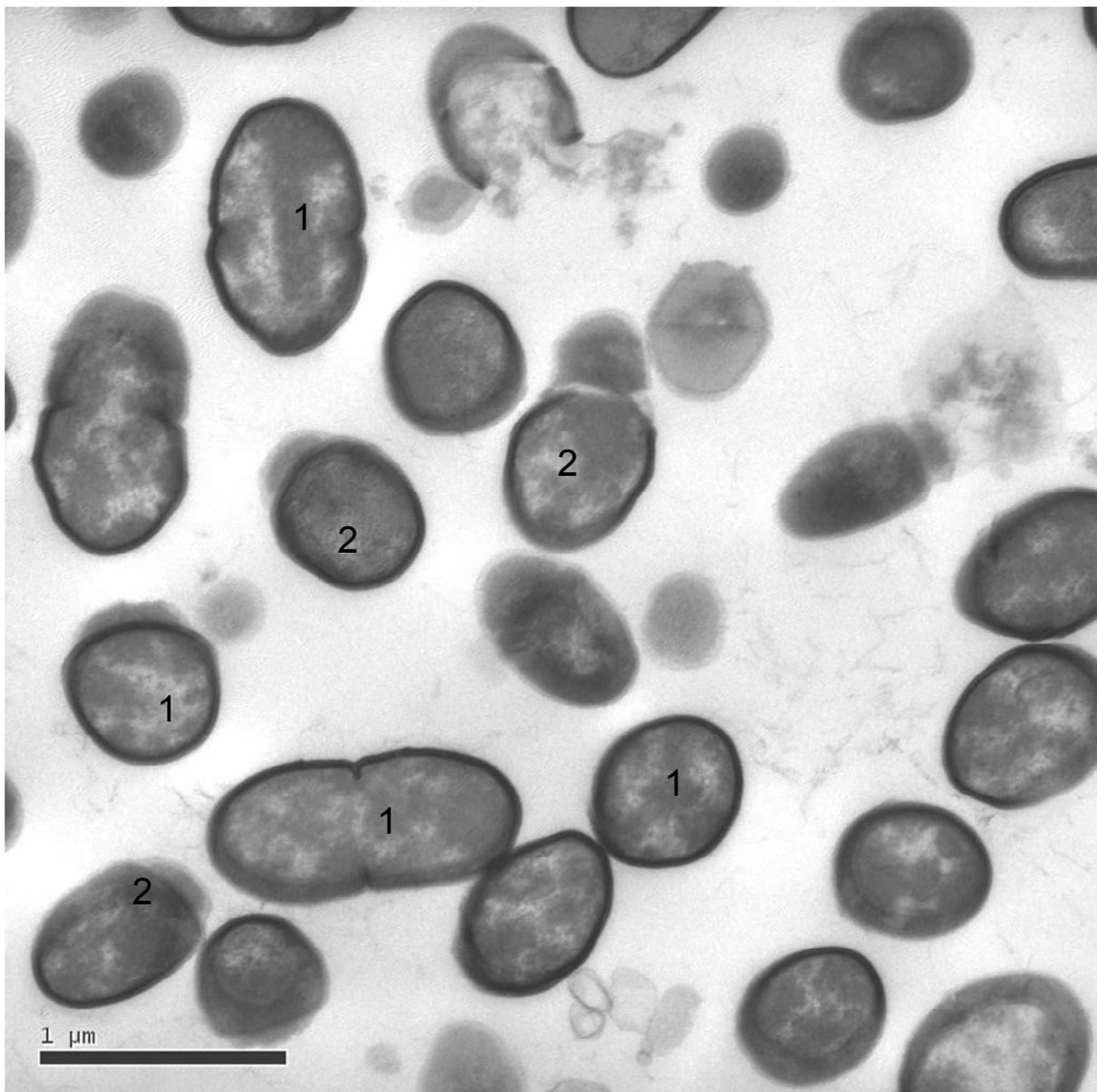


Figura 14 - *E. faecalis* após 7 dias de contato com $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Observar células com alterações citoplasmáticas (1) e áreas densas (2) nas suas diversas fases fisiológicas.

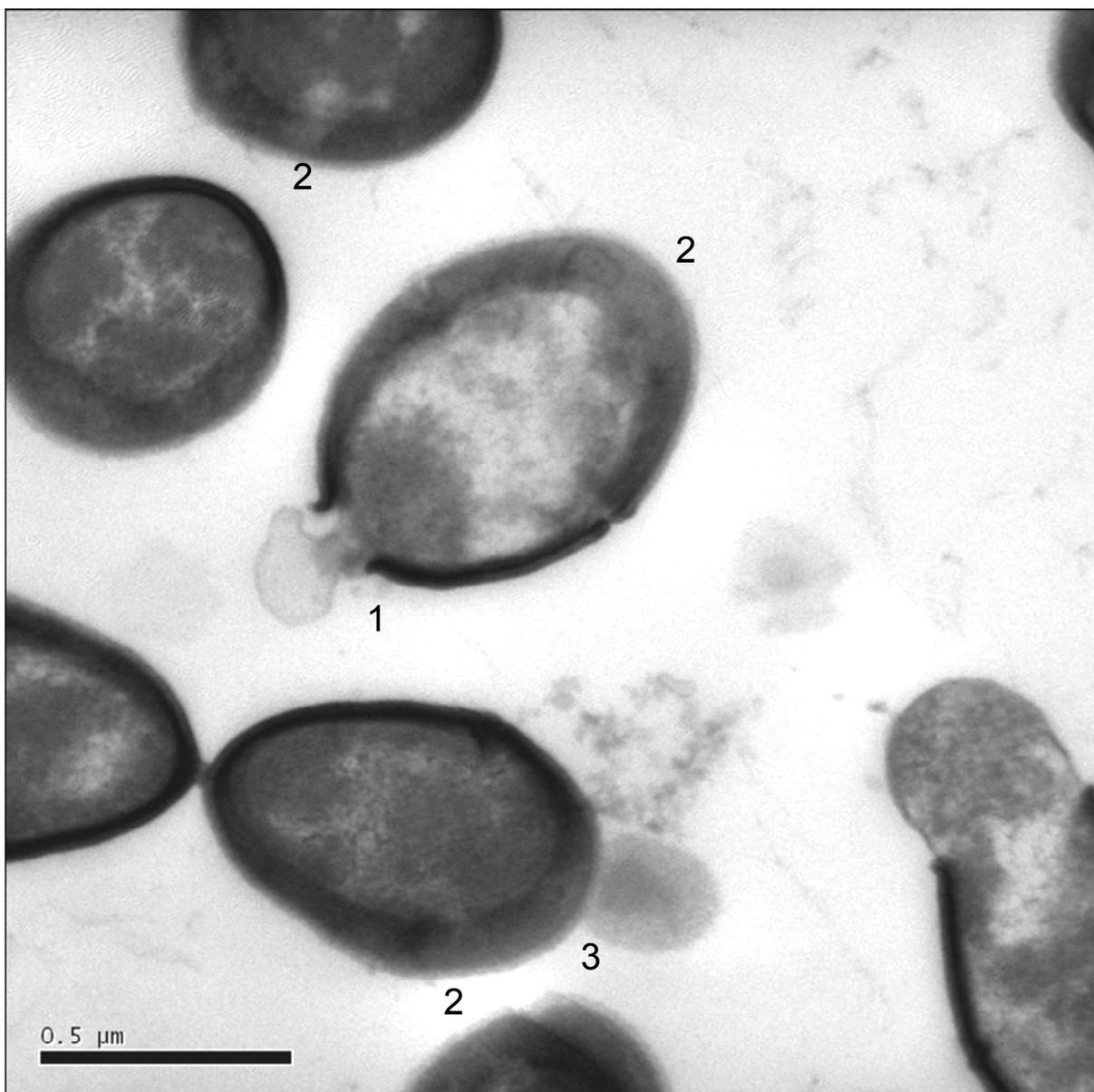


Figura 15 - Imagem mostrando a exteriorização de material citoplasmático (1), alteração na densidade da parede bacteriana (2) e formação de vesículas extracelulares.

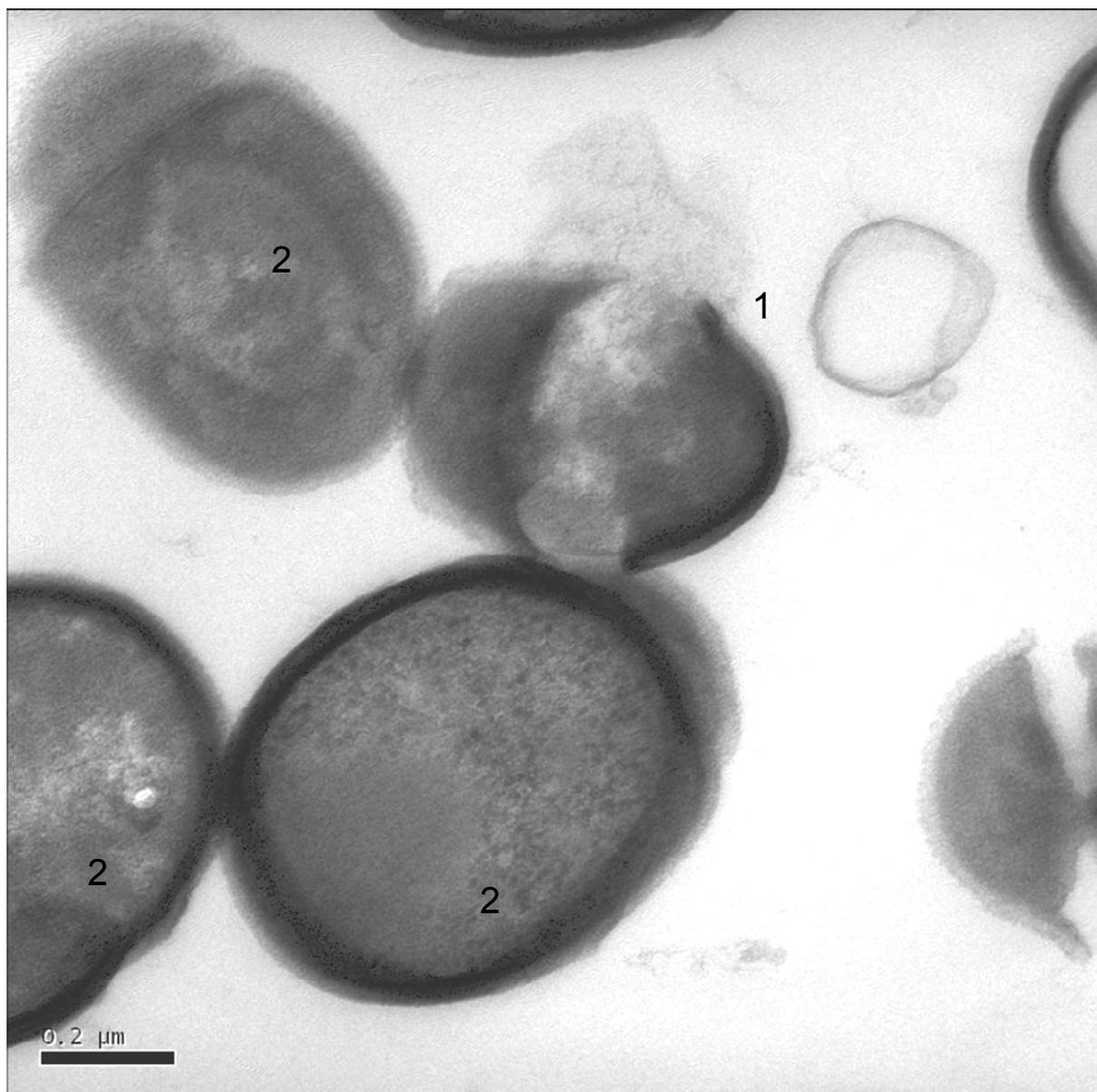


Figura 16 - Imagem mostrando o *E. faecalis* em processo de bacteriólise (1) e alteração citoplasmática com regiões densas (2).

6 DISCUSSÃO

A utilização de medicações de uso intracanal tornou-se indispensável na terapia endodôntica por complementar a ação desinfetante do preparo químico cirúrgico do sistema de canais radiculares que com uma característica anatômica peculiar, pode se tornar um fator importante para a sobrevivência de microorganismos, uma vez que os instrumentos endodônticos e as substâncias químicas não atingiram determinadas regiões para eliminar esses agentes patógenos, resultando deste modo num processo infeccioso, cuja persistência irá permitir a manutenção de um evento inflamatório crônico. Quando o hospedeiro por algum motivo apresentar uma queda no seu quadro imunológico, essas infecções podem se expandir e em alguns casos até reagudizar. Por este motivo, numa reintervenção endodôntica deve-se utilizar medicações cuja permanência promoverá uma difusibilidade dos fármacos atuando nos túbulos dentinários alcançando até a superfície radicular externa, atuando em alguns casos no biofilme apical (Machado, 2007).

Os microorganismos são agentes agressores graças não só aos seus componentes morfológicos como também quando da liberação de seus subprodutos. Sua localização está vinculada, em endodontia, ao sistema de canais radiculares em um ecossistema equilibrado entre as diferentes espécies (Nair, 1987; Fukushima et al., 1990; Sundqvist, 1992). Esta harmonia simbiótica faz com que se mantenha a diversidade da microflora numa cadeia interdependente (Sundqvist, 1992).

Um dos microorganismos que estão mais presentes em lesões periapicais crônicas persistentes é o *Enterococcus faecalis* (Fukushima et al., 1990; Gomes et al., 1994; Molander et al., 1998; Peciulienė et al., 2001; Sunde et al., 2002; Pinheiro

et al., 2003; Rôças et al., 2004) cuja virulência e afinidade ao tecido colágeno, o habilita a resistir e sobreviver em meios diferentes (Jett et al., 1994), favorecendo a união ao tecido colágeno com pH elevados (Kayaoglu et al., 2005) e sobreviver por quatro semanas até 12 meses em canais radiculares obturados e sem fatores nutricionais (Sedgley et al., 2005). Por estas razões, que este microorganismo vem sendo utilizado em várias pesquisas (Siqueira Júnior et al., 1998; Haapasalo et al., 2000; Pallotta, 2001; Han et al., 2001; Portenier et al., 2001; Behnen et al., 2001; Sukawat et al., 2002; Almyroudi et al., 2002; Gomes et al., 2002; Evans et al., 2002; Portenier et al., 2002; Distel et al., 2002; Gomes et al., 2002; Weiger et al., 2002; Gomes et al., 2003; Lynne et al., 2003; Haenni et al., 2003; McHugh et al., 2004; Menezes et al., 2004; Sirén et al., 2004; Baker et al., 2004; Pinheiro et al., 2004; Cwikla et al., 2005; Schäfer et al., 2005; Kayaoglu et al., 2005; Vivacqua-Gomes et al., 2005; Sedgley et al., 2005; Portenier et al., 2005; Zarella et al., 2005; Gomes et al., 2006; Pallotta et al., 2007) e foi eleito para este trabalho a fim de esclarecer a ação do Hidróxido de Cálcio e do Iodofórmio sobre ele.

Dentre as medicações intracanaís utilizadas em Endodontia como curativo de demora, o Hidróxido de Cálcio tem sido empregado em função de suas propriedades de acordo com a literatura. Entre elas podemos citar: a ação antimicrobiana (Stuart et al., 1991; Sjögren et al., 1991; Han et al., 2001; Behnen et al., 2001; Gomes et al., 2002; Haenni et al., 2003; Lynne et al., 2003; Cwikla et al., 2005; Sathorn et al., 2007), pH alcalino (Siqueira, Lopes, 1999; Han et al., 2001; Behnen et al., 2001; Sukawat, Srisuwan, 2002; Evans et al., 2002; Gomes et al., 2002; Haenni et al., 2003; Cwikla et al., 2005), poder de difusão pela dentina (Robert et al., 2005) e detoxificador de LPS bacteriano (Safavi, Nichols, 1994). Mas por outro lado, ela apresenta algumas desvantagens quando em contato tecidual podendo

retardar o processo cicatricial (Pallotta, 2003) e ser inativada pelos componentes orgânicos e inorgânicos da dentina (Haapasalo et al., 2000; Portenier et al., 2001; Portenier et al., 2002). Desta maneira, devemos lançar mãos da utilização de uma medicação intracanal que possua uma ação antimicrobiana mais efetiva como é o caso do Iodofórmio.

Todavia, o emprego do Iodofórmio vem crescendo à medida que novos trabalhos têm sido realizados a fim de esclarecer seu sucesso clínico que por muito tempo obteve êxito em seus resultados e que depois, foi deixado de lado devido ao seu uso empírico (Aydos, Milano, 1984). O Iodofórmio é um composto com 95,87% de Iodo que é liberado em meios ácidos, escuros, fechados e úmidos de maneira gradativa exercendo suas vantajosas propriedades na Endodontia como: antimicrobianas segundo (Pallotta, 2001; Ferreira et al., 2002; Breder, 2003; Pallotta et al., 2007), modulador do processo de reparação tecidual (Daniel, 2001; Gomes, 2003; Pallotta, 2003) e possui difusibilidade pelos túbulos dentinários (Franco, 2005; Gentil, 2007). Quanto a sua alta citotoxicidade (Daniel, 1998) pode ser aceitável por causar uma migração macrofágica estimulando o processo de reparo mais rápido que o Hidróxido de Cálcio (Pallotta, 2003). Perante as propriedades de ambos os fármacos expostos e pela ação antibacteriana, justifica-se desta maneira a utilização destas medicações neste experimento, principalmente no que tange aos danos que estas medicações causam nas estruturas morfológicas do *E.faecalis*, comprovados pela Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Quanto à metodologia aplicada nesta pesquisa, o Teste Antimicrobiano do Método de Diluição em Caldo foi eleito para se observar à ação bactericida destas medicações sobre o *E.faecalis* estando de acordo com os seguintes autores: Pallotta (2001); Cwikla et al. (2005); Trabulsi & Alterthum (2005) e as Normas do CLSI

(*Clinical and Laboratory Standards Institute - USA*). Dentro da metodologia utilizada na pesquisa, alguns aspectos se tornam de importância significativa como: o não adicionamento de novo meio de cultura a cada 48 h, a utilização de um grupo controle positivo para averiguar o comportamento da viabilidade bacteriana num mesmo meio de cultura até o último tempo experimental utilizado e de um grupo controle negativo para confirmar a utilização de um meio de cultura que não estivesse contaminado. O não adicionamento do novo meio de cultura, deve-se ao fato da manutenção da concentração e diluição das medicações testadas até o último tempo experimental. Pode-se ressaltar que para a realização deste procedimento, realizou-se um teste piloto com meio de culturas diferentes utilizando cepas de *E.faecalis* (ATCC 29212) num período de 28 dias, e tendo a sua viabilidade confirmada em todos os meios de cultura testados, não ocorrendo morte bacteriana por falta de nutrientes. Em testes antimicrobianos e de acordo com as normas da CLSI, o período experimental para os métodos de macro e micro diluição em caldo, não ultrapassa à 48hs.

Em relação à diluição das medicações, estas foram diluídas em glicerina estéril numa elevada concentração para o Teste de Sensibilidade - 64 mg mL^{-1} e baseado no achados de Pallotta et al. (2007), cuja MIC para eliminar o *E.faecalis* foi de 32 mg mL^{-1} para o Iodofórmio e de 16 mg mL^{-1} para o Hidróxido de Cálcio, pois como estas drogas são utilizadas na Endodontia numa proporção de 5:1 (cinco porções de pó de Hidróxido de Cálcio ou Iodofórmio para uma de polietilenoglicol) numa consistência de pasta (Machado, 2007), optou-se por uma concentração mais elevada, já que clinicamente não se realiza uma diluição quando do emprego clínico do Iodofórmio, obtendo desta maneira um sucesso significativo.

Para a análise quantitativa em plaqueamento, utilizou-se a contagem de

unidades formadoras de colônias (UFC) como nos experimentos realizados por Stuart et al. (1991); Sjögren et al. (1991); Haapasalo et al. (2000); Portenier et al., (2001); Behnen et al. (2001); Portenier et al. (2002); Almyroudi et al. (2002); Lynne et al. (2003); Cwikla et al. (2005); Schafer et al. (2005) e pelas normas do CLSI.

Este experimento foi repetido por mais duas vezes em momentos distintos, pois desta maneira pôde-se verificar o comportamento idêntico das medicações sobre as bactérias nestes três tempos distintos, e como confirmados pela análise estatística (Anexos C, D e E). A transformação dos resultados em valores logaritmos é um procedimento matemático padrão para permitir o tratamento estatístico, bem como a interpretação de valores existentes nas unidades individuais e nos grupos comparados.

Para a análise estatística, foi utilizado o Teste Exato de Fisher, a fim de compararem dados amostrais de dois grupos distintos formando uma tabela de contingência de 2X2. Por este motivo e de acordo com a filosofia do teste, que se justifica seu emprego como no estudo de Wendt et al. (1998). Este cálculo de probabilidades resulta no valor de P (variando de 0 a 1), pois a hipótese experimental será verdadeira quando o valor de P for próximo ou igual à zero, caso contrário à hipótese nula será verdadeira por apresentar um valor de P próximo ou igual a 1.

Em relação ao tempo experimental, este foi desenvolvido de acordo com o emprego clínico das medicações, pois medicações a base de iodofórmio precisam de um período maior que os testes antimicrobianos são realizados (48 h) para que ocorra a liberação e a ação do iodo sobre os microorganismos. Deste modo explica-se o insucesso do iodofórmio sobre microorganismos como no trabalho de Siqueira Júnior et al. (1997). Já que clinicamente seu sucesso é demonstrado por Machado

(2007) e demais trabalhos (Pallotta, 2001; Ferreira et al., 2002; Breder, 2003; Gomes, 2004; Pallotta et al., 2007).

Neste experimento, as medicações testadas diminuíram a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) em função dos tempos experimentais, evidenciando a queda brusca entre 7 e 14 dias, pela ação dos fármacos causando danos às estruturas bacterianas, não havendo viabilidade a partir deste e comprovada sua ação bactericida no 21º dia. Quanto ao grupo controle positivo, nota-se um decréscimo em função dos tempos experimentais. Todo este decréscimo pode ser analisado e comparado com o grupo controle positivo, no gráfico 1. Este resultado tem dados semelhantes com os trabalhos de (Sjögren et al., 1991; Siqueira Júnior, Uzeda, 1996; Han et al., 2001; Sukawat, Srisuwan, 2002; Almyroudi et al., 2002; Gomes et al., 2003; Menezes et al., 2004; Síren et al., 2004; Zarella et al., 2005; Cwikla et al., 2005) por mostrarem uma ação bactericida entre 7 e 14 dias. Pode-se notar uma semelhança com estudos in vivo de Sathorn et al. (2007) quando empregado hidróxido de cálcio de 7 a 30 dias, tempo este em que mostrou a redução de microorganismos do sistema de canais radiculares. Por outro lado, trabalhos como os de Stuart et al. (1991); Siqueira Júnior et al. (1997); Gomes et al. (2002); Lynne et al. (2003); Baker et al. (2004); Schäfer et al. (2005) e Gomes et al. (2006) apresentaram uma ação antimicrobiana reduzida da pasta de Hidróxido de Cálcio sobre diversos microorganismos por terem sido realizado em tempos experimentais bem menores (de 10 min a 48 h) devido à metodologia empregada. Desse modo, pode-se dizer a atividade antibacteriana conseguida através do tempo experimental deste trabalho teve o mesmo comportamento que aquelas obtidas em estudos clínicos e observadas clinicamente quando se usa um curativo de demora entre 7 a 14 dias.

Outro fator observado na literatura em função do tempo experimental em trabalhos realizados *in vitro* foi à influência do tipo de veículos sobre a ação antimicrobiana das pastas (Siqueira Júnior, Uzeda, 1998; Safavi, Nakayama, 2000; Behnen et al., 2001; Gomes et al., 2002). Pois veículos aquosos como soro fisiológico, água destilada e solução anestésica promovem uma ação antimicrobiana das medicações de uma maneira mais rápida devida sua capacidade de absorção e baixa tensão superficial, enquanto que em veículos oleosos como polietileno glicol, glicerina, carbowax e óleo de silicone, a ação torna-se mais lenta pelo alto peso molecular e tensão superficial.

Em relação à metodologia pela Microscopia Eletrônica de Transmissão, para que esta análise fosse realizada, houve a necessidade de ser realizado um teste piloto com meios de cultura e corantes cujos melhores resultados foram obtidos com o meio de cultura BHI e o corante a base de cianeto de ferro. Esta análise somente foi realizada no período de sete dias pelos seguintes motivos: no início (primeiro tempo experimental) não seria possível notar alterações estruturais no *E. faecalis* por não haver tempo suficiente de a droga reagir com a bactéria, este fato foi ocorrido e visto aos sete dias quando se notou alterações morfológicas. Desta maneira, as bactérias cresceram no meio de cultura juntamente com o fármaco diluído, podendo observar estes microorganismos alterados em diferentes fases fisiológicas. Nos tempos experimentais de 14 e 21 dias, estas não foram analisadas por não haver viabilidade.

A Microscopia Eletrônica de Transmissão é um método que gera imagens de alta precisão, utilizado nas ciências biológicas para estudos morfológicos celulares, entretanto seu emprego pode se estender à investigação clínica de certas patologias, demonstrarem a ocorrência de certos fenômenos e entender certos

mecanismos celulares quando associado aos outros métodos. Os resultados da Microscopia Eletrônica de Transmissão foram realizados com base entre comparações das alterações estruturais causadas pelas medicações testadas com as estruturas das bactérias do grupo controle positivo e descrições baseadas nos trabalhos de Dorn et al. (2002) e Castillo et al., (2006).

Devemos ressaltar ainda que a ação antibacteriana do Hidróxido de Cálcio e do Iodofórmio foi confirmada neste experimento de acordo com a metodologia empregada e com outros trabalhos (Sjögren et al., 1991; Siqueira Jr & Uzeda, 1996; Han et al., 2001; Sukawat & Srisuwan, 2002; Almyroudi et al., 2002; Gomes et al., 2003; Menezes et al., 2004; Sirén et al., 2004; Zarella et al., 2005; Cwikla et al., 2005; Sathorn et al., 2007), pois alguns trabalhos (Haapasalo et al., 2000; Portenier et al., 2001; Portenier et al., 2002) mostram a inativação de determinados medicamentos na presença de componentes dentinários. Entretanto, resultados opostos de trabalhos realizados *in vitro* e *in vivo* (já descritos acima), comprovaram a ação antimicrobiana quando realizados em dentina. Deste modo, este trabalho comprova a ação antibacteriana dos medicamentos testados sobre o *E.faecalis*, tornando-se uma justificativa fundamentada para o uso clínico de ambas as medicações intracanaís.

Assim sendo, o universo metodológico permite a realização de novos experimentos a fim de elucidar estas divergências existentes na comunidade científica, eliminando tabus e o empirismo clínico.

7 CONCLUSÃO

Sob a metodologia empregada e frente aos resultados obtidos, é lícito concluir que:

O Hidróxido de Cálcio e Iodofórmio eliminam o *E.faecalis* num período entre 7 a 14 dias, não havendo viabilidade celular entre 14 a 21 dias, e causam alterações morfológicas irreversíveis levando a bacteriólise do *E.faecalis* quando em contato com as mesmas, sendo observadas no sétimo dia.

REFERÊNCIAS¹

- Almyroudi A, Mackenzie D, McHugh S, Saunders WP. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an in vitro study. *J Endod.* 2002 Mar;28(3):163-7.
- Aydos JH, Milano NF. Revisão bibliográfica sobre o uso do iodofórmio em endodontia. *Rev Fac Odontol Porto Alegre.* 1984;26:43-51.
- Baker NE, Liewehr FR, Buxton TB, Joyce AP. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide, iodine potassium iodide, betadine, and betadine scrub with and without surfactant against *E faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Sept;98(3):359-64.
- Behnen MJ, West LA, Liewehr FR, Buxton TB, McPherson JC. Antimicrobial activity of several calcium hydroxide preparations in root canal dentin. *J Endod.* 2001 Dec;27(12):765-7.
- Breder CMB. Atividade antibacteriana do iodofórmio e do hidróxido de cálcio, associados à dentina: estudo "in vitro" [dissertação]. Campinas: Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic; 2003.
- Castillo JA, Clapés P, Infante MR, Comas J, Manresa A. Comparative study of the antimicrobial activity of bis (N^α -caproyl-L-arginine)-1,3-propanediamine dihydrochloride and chlorhexidine dihydrochloride against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Apr;57(4):691-98.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI - NCCLS). Pennsylvania. M7-A6: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Pennsylvania; 2003.
- Cwikla SJ, Bélanger M, Giguère S, Progulske-Fox A, Vertucci FJ. Dentinal tubule disinfection using three calcium hydroxide formulations. *J Endod.* 2005 Jan;31(1):50-52.
- Daniel RLDP, Jaeger MMM, Machado MEL. Emprego do iodofórmio em Endodontia - revisão da literatura. *RPG Rev Pós Grad.* 1999 abr-jun;6(2):175-9.
- Daniel RLDP, Jaeger MMM, Machado MEL. Estudo do comportamento biológico do iodofórmio em culturas de fibroblastos. In: IV Reunião de Pesquisa da FOUASP, 1996 Out; São Paulo: RPG Rev Pós-Grad. 1996 out-dez;3(4):291.
- Daniel RLDP. Análise comparativa da citotoxicidade in vitro do iodofórmio e do hidróxido de cálcio empregando-se dois veículos diferentes [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1998.
- Daniel RLDP. Análises radiográfica e microscópica do processo de reparo de lesões periapicais após o emprego de medicação intracanal em dentes de rato [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2001.

¹ De acordo com o Manual de Normalização para Dissertações e Teses do Centro de Pós-Graduação CPO São Leopoldo Mandic, baseado no estilo Vancouver de 2007, e abreviatura dos títulos de periódicos em conformidade com o Index Medicus.

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002 Oct; 28(10):689-93.

Dorn BR, Harris LJ, Wujick CT, Vertucci FJ, Progulsk-Fox A. Invasion of vascular cells in vitro by *Porphyromonas endodontalis*. *Int Endod J.* 2002 Apr;35(4):366-71.

Duarte ELB, Souza AS, Murgel CEF, Machado MEL. Avaliação do pós-operatório de lesões periapicais tratadas com extravasamento de iodofórmio. *RGO.* 2003 out;51(4):225-8.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002 Mar;35(3):221-8.

Fernandes KPS. Avaliação da interação entre a endotoxina bacteriana e o iodofórmio [dissertação]. São Paulo: Universidade Camilo Castelo Branco; 1997.

Ferreira R, Dotto SR, Ritzel B, Losekan M, Martins MHW, Cunha RS. Avaliação da ação antimicrobiana de medicamentos intracanaís. *Pesqui Odontol Bras.* 2002; 16(Suppl):223.

Franco ABG. Avaliação qualitativa da difusibilidade do iodofórmio através da dentina e cimento: estudo "in vitro" [dissertação]. Campinas: Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic; 2005.

Fukushima H, Yamamoto K, Hirohata K, Sagawa H, Leung KP, Walker CB. Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. *J Endod.* 1990 Nov;16(11):534-8.

Gentil SN. Análise quantitativa da exteriorização do iodofórmio aplicado intracanal após a realização dos procedimentos básicos periodontais: estudo "in vitro" [dissertação]. Campinas: Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic; 2007.

Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1994 Nov;27(6):291-8.

Gomes BPFA, Ferraz CCR, Garrido FD, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB et al. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *J Endod.* 2002 Nov;28(11):758-61.

Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J.* 2003 Apr;36(4):267-75.

Gomes BPFA, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA; Ferraz CC, Souza Filho FJ. In Vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Oct;102(4):544-50.

Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB et al. In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. *Braz Dent J.* 2002;13(3):155-61.

- Gomes CC. Avaliação histológica do reparo tecidual em dentes de cães submetidos a tratamento endodôntico em sessão única ou empregando dois diferentes curativos de demora [dissertação]. Campinas: Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic; 2003.
- Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TMT, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J*. 2000 Mar;33(2):126-31.
- Haenni S, Schmidlin PR, Mueller B, Sener B, Zehnder M. Chemical and antimicrobial properties of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Int Endod J*. 2003 Feb;36(2):100-5.
- Han GY, Park SH, Yoon TC. Antimicrobial activity of Ca(OH)₂ containing pastes with *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod*. 2001 May;27(5):328-32.
- Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of Enterococci. *Clin Microbiol Rev*. 1994 Oct;7(4):462-78.
- Kayaoglu G, Erten H, Ørstavik D. Growth at high pH increases *Enterococcus faecalis* adhesion to collagen. *Int Endod J*. 2005 June;38(6):389-96.
- Lynne RE, Liewehr FR, West LA, Patton WR, Buxton TB, McPherson JC. In vitro antimicrobial activity of various medication preparations on *E. faecalis* in root canal dentine. *J Endod*. 2003 Mar;29(3):187-90.
- Machado MEL. Endodontia - da biologia à técnica. São Paulo: Santos; 2007.
- McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH Required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod*. 2004 Apr;30(4):218-9.
- Menezes MM, Valera MC, Jorge AO, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MN. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J*. 2004 May;37(5):311-9.
- Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1998 Jan;31(1):1-7.
- Nair R. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod*. 1987 Jan;13(1):29-39.
- Pallotta RC, Ribeiro MS, Lima Machado ME. Determination of the minimum inhibitory concentration of four medicaments used as intracanal medication. *Aust Endod J*. 2007 Dec;33(3):107-11.
- Pallotta RC. Análise qualitativa e quantitativa da resposta inflamatória frente a diferentes medicações de uso endodôntico - iodofórmio e hidróxido de cálcio-, quando aplicadas em tecido subcutâneo do dorso do rato [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2003.
- Pallotta RC. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de quatro medicações de uso endodôntico, pelo método da diluição em caldo [dissertação]. Campinas: Universidade Camilo Castelo Branco; 2001.
- Peciulienė V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J*. 2001 Sept;34(6):429-34.

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Drucker DB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ . Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2004 Nov;37(4):756-63.

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003 Jan;36(1):1-11.

Portenier I, Haapasalo H, Ørstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. *J Endod*. 2002 Sept;28(9):634-7.

Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J*. 2001 Apr;34(3):184-8.

Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. The susceptibility of starved, stationary phase and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. *J Endod*. 2005 May;31(5):380-6.

Robert GH, Liewehr FR, Buxton TB, McPherson JC. Apical diffusion of calcium hydroxide in an in vitro model. *J Endod*. 2005 Jan;31(1):57-60.

Rôças IN, Siqueira Júnior JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*. 2004 May;30(5):315-20.

Safavi KE, Nakayama TA. Influence of mixing vehicle on dissociation of calcium hydroxide in solution. *J Endod*. 2000 Nov;26(11):649-51.

Safavi KE, Nichols FC. Alteration of Biological properties of bacterial lipopolysaccharide by Calcium Hydroxide Treatment. *J Endod*. 1994 Mar;20(3):127-29.

Sathorn C, Parashos P, Messer H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J*. 2007 Jan;40(1):2-10.

Schäfer E, Bössmann K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2005 Jan;31(1):53-6.

Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J*. 2005 Oct;38(10):735-42.

Silver GK, Simon JHS. Charcot-Leyden Crystals within a Periapical Lesion. *J Endod*. 2000 Nov;26(11):679-8.

Siqueira Júnior JF, Lopes HP, Magalhães FAC, Uzeda M. Atividade antibacteriana da pasta de hidróxido de cálcio/paramonoclorofenol canforado/glicerina contendo diferentes proporções de iodofórmio sobre bactérias anaeróbias estritas e facultativas. *Rev Paul Odontol*. 1997 Fev;19(2):17-21.

Siqueira Júnior JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*. 1999 Sept;32(5):361-9.

- Siqueira Júnior JF, Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996 Dec;22(12):674-6.
- Siqueira Júnior JF, Uzeda M. Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *J Endod.* 1996 Oct;24(10):663-5.
- Sirén EK, Haapasalo MPP, Waltimo TMT, Ørstavik D. In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci.* 2004 Aug;112(4):326-31.
- Sjögren U, Figdor D, Spånberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J.* 1991 May;24(3):119-25.
- Stuart KG, Miller CH, Brown CE, Newton CW. The comparative antimicrobial effect of calcium hydroxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1991 July;72(1):101-4.
- Sukawat C, Srisuwan T. A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2002 Feb;28(2):102-4.
- Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of the periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod.* 2002 Apr;28(4):304-10.
- Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 1992 Sept;18(9):427-30.
- Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 4a ed. rev. Atual.; São Paulo: Atheneu; 2005. p. 3-97, 213-17.
- Vivacqua-Gomes N, Gurgel Filho ED, Gomes BP; Ferraz CC; Zaia AA; Souza-Filho FJ. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth ex vivo. *Int Endod J.* 2005 Oct;38(10):697-704.
- Weiger R, Lucena J, Decker HE, Löst C. Vitality status of microorganisms in infected human root dentine. *Int Endod J.* 2002 Feb;35(2):166-71.
- Wendt C, Wiesenthal B, Dietz E, Rüden H. Survival of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci on dry surfaces. *J Clin Microbiol.* 1998 Dec;36(12):3734-36.
- Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *E.faecalis* by real-time PCR(qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod.* 2006 Aug;32(8):715-21.
- Zerella JA, Fouad AF, Spångberg LSW. Effectiveness of a calcium hydroxide and chlorhexidine digluconato mixture as disinfectant during retreatment of failed endodontic case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Dec;100(6):756-61.

ANEXO A – Resultados do Teste Antimicrobiano

Tabelas com os valores expressos em Unidades Formadoras de Colônias por ml (UFC/ml) dos três tempos experimentais realizado neste estudo.

1º TEMPO	IODOFÓRMIO	Ca(OH) ₂	CONTROLE POSITIVO	CONTROLE NEGATIVO
INICIAL	9.1X10 ⁹	5.4X10 ⁹	6.3X10 ⁹	-
7 DIAS	7.8X10 ⁹	2.5X10 ⁹	6.8X10 ⁹	-
14 DIAS	-	-	4.7X10 ⁸	-
21 DIAS	-	-	2X10 ⁷	-

2º TEMPO	IODOFÓRMIO	Ca(OH) ₂	CONTROLE POSITIVO	CONTROLE NEGATIVO
INICIAL	1.1X10 ¹⁰	1.4X10 ⁹	4.1X10 ⁹	-
7 DIAS	5.9X10 ⁹	3.7X10 ⁹	3.8X10 ⁹	-
14 DIAS	-	-	3.2X10 ⁸	-
21 DIAS	-	-	3.2X10 ⁷	-

3º TEMPO	IODOFÓRMIO	Ca(OH) ₂	CONTROLE POSITIVO	CONTROLE NEGATIVO
INICIAL	4.6X10 ⁹	1.6X10 ¹⁰	7.7X10 ⁹	-
7 DIAS	2.2X10 ⁷	4.7X10 ⁸	3.6X10 ⁹	-
14 DIAS	-	-	3.8X10 ⁸	-
21 DIAS	-	-	2.1X10 ⁷	-

ANEXO B - Valores em Log do Teste Antimicrobiano

Tabelas com a transformação dos dados dos três tempos experimentais em escala logarítmica - Log UFC.

1º TEMPO	IODOFÓRMIO	Ca(OH) ₂	CONTROLE POSITIVO	CONTROLE NEGATIVO
INICIAL	9.95	9.73	9.79	-
7 DIAS	9.89	9.35	9.83	-
14 DIAS	1*	1*	8.67	-
21 DIAS	1*	1*	7.30	-

2º TEMPO	IODOFÓRMIO	Ca(OH) ₂	CONTROLE POSITIVO	CONTROLE NEGATIVO
INICIAL	10.04	9.14	9.61	-
7 DIAS	9.77	9.56	9.57	-
14 DIAS	1*	1*	8.51	-
21 DIAS	1*	1*	7.51	-

3º TEMPO	IODOFÓRMIO	Ca(OH) ₂	CONTROLE POSITIVO	CONTROLE NEGATIVO
INICIAL	9.66	10.20	9.88	-
7 DIAS	7.34	8.67	9.55	-
14 DIAS	1*	1*	8.58	-
21 DIAS	1*	1*	7.32	-

OBS.: * O valor correspondente seria 0, porém Log 0=1. Quanto ao grupo controle negativo, somente foi verificado se havia contaminação ou não. Não havendo contaminação em nenhuma amostra.

ANEXO C - Resultado do Teste Estatístico para o Grupo Controle Positivo

Tabela e quadros mostrando o resultado do Grupo Controle Positivo realizado pelo Teste Exato de Fisher para a verificação semelhante dos três tempos experimentais através do Graphpad Software (2005).

	1T/2T	2T/3T	1T/3T
7 DIAS	p=1	p=1	p=1
14 DIAS	p=1	p=1	p=1
21 DIAS	p=1	p=1	p=1

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - C+ 2T/3T 7D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	10	20
Grupo 2	10	10	20
Total	20	20	40

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - C+ 2T/3T 7D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	10	20
Grupo 2	10	10	20
Total	20	20	40

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - C+1T/3T 7D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	10	20
Grupo 2	10	10	20
Total	20	20	40

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - C+1T/2T 14D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	9	19
Grupo 2	10	9	19
Total	20	18	38

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - C+2T/3T 14D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	9	19
Grupo 2	10	9	19
Total	20	18	38

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - C+1T/3T 14D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	9	19
Grupo 2	10	9	19
Total	20	18	38

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - C+1T/2T 21D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	9	7	16
Grupo 2	9	7	16
Total	18	14	32

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - C+2T/3T 21D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	9	7	16
Grupo 2	9	7	16
Total	18	14	32

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - C+1T/3T 21D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	9	7	16
Grupo 2	9	7	16
Total	18	14	32

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANEXO D - Resultado do Teste estatístico para o Grupo do Iodofórmio

Tabela e quadros mostrando o resultado do Grupo Iodofórmio (CHI_3) realizado pelo Teste Exato de Fisher para a verificação semelhante dos três tempos experimentais através do Graphpad Software (2005).

	1T/2T	2T/3T	1T/3T
7 DIAS	p=1	p=0.74	p=0.74
14 DIAS	p=1	p=1	p=1
21 DIAS	p=1	p=1	p=1

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CHI_3 1T/2T 7D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	10	20
Grupo 2	10	10	20
Total	20	20	40

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CHI3 2T/3T 7D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	10	20
Grupo 2	10	7	17
Total	20	17	37

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 0.7433
 A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados)
 é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CHI3 1T/3T 7D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	10	20
Grupo 2	10	7	17
Total	20	17	37

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 0.7433
 A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados)
 é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CHI3 1T/2T 14D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	1	11
Grupo 2	10	1	11
Total	20	2	22

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000
 A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados)
 é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CHI3 2T/3T 14D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	1	11
Grupo 2	7	1	8
Total	17	2	19

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CHI3 1T/3T 14D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	1	11
Grupo 2	7	1	8
Total	17	2	19

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CHI3 1T/3T 21D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	1	1	2
Grupo 2	1	1	2
Total	2	2	4

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CHI3 2T/3T 21 D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	1	1	2
Grupo 2	1	1	2
Total	2	2	4

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CHI3 1T/3T 21D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	1	1	2
Grupo 2	1	1	2
Total	2	2	4

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANEXO E Resultado do Teste Estatístico para o Grupo do Hidróxido de Cálcio

Tabela e quadros mostrando o resultado do Grupo Hidróxido de Cálcio - Ca(OH)_2 realizado pelo Teste Exato de Fisher para a verificação semelhante dos três tempos experimentais através do Graphpad Software (2005).

	1T/2T	2T/3T	1T/3T
7 DIAS	p=1	p=1	p=1
14 DIAS	p=1	p=1	p=1
21 DIAS	p=1	p=1	p=1

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - Ca(OH)_2 1T/2T 7D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	9	19
Grupo 2	9	10	19
Total	19	19	38

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significante.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CA(OH)₂ 2T/3T 7D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	9	10	19
Grupo 2	10	9	19
Total	19	19	38

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CA(OH)₂ 1T/3T 7D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	9	19
Grupo 2	10	9	19
Total	20	18	38

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CA(OH)₂ 1T/2T 14D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	9	1	10
Grupo 2	10	1	11
Total	19	2	21

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CA(OH)₂ 2T/3T 14D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	1	11
Grupo 2	9	1	10
Total	19	2	21

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CA(OH)₂ 1T/3T 14D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	9	1	10
Grupo 2	9	1	10
Total	18	2	20

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CA(OH)₂ 1T/3T 21D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	1	1	2
Grupo 2	1	1	2
Total	2	2	4

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CA(OH)₂ 2T/3T 21 D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	1	1	2
Grupo 2	1	1	2
Total	2	2	4

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000
 A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados)
 é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CA(OH)₂ 1T/3T 21D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	1	1	2
Grupo 2	1	1	2
Total	2	2	4

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000
 A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados)
 é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANEXO F - Resultado do Teste Estatístico entre os Grupos investigados

Tabela demonstrando os valores médios de cada grupo transformados em número logaritmo e arredondados para ser realizado o Teste Exato de Fisher.

	IODOFÓRMIO	Ca(OH) ₂	CONTROLE POSITIVO
INICIAL	10	10	10
7 DIAS	9	9	10
14 DIAS	1	1	9
21 DIAS	1	1	7

Quadros dos resultados do teste estatístico, quando comparado os grupos entre si.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CHI3XC+ 7D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	9	19
Grupo 2	10	10	20
Total	20	19	39

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000
A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados)
é considerada a não ser estatisticamente significante.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CHI3XC+ 14D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	9	1	10
Grupo 2	10	9	19
Total	19	10	29

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 0.0976

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a ser estatisticamente significativa.

CHI3 X C+ - 14d			
Tabela de contingência dos dados amostrais:			
	9	1	10
	10	9	19
	19	10	29

Resultados do Teste Exato de Fisher - CHI3XC+ 14d	
Probabilidade parcial (0) :	0.3334 %
Probabilidade parcial (1) :	3.0010 %
Probabilidade total (de H0) :	3.3344 %
Significante ao nível de 5 % ($\alpha = 0,05$)	

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CHI3XC+ 21D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	1	1	2
Grupo 2	9	7	16
Total	10	8	18

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000

A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados) é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CA(OH)₂XC+ 7D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	9	19
Grupo 2	10	10	20
Total	20	19	39

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000
 A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados)
 é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CA(OH)₂XC+ 14D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	9	1	10
Grupo 2	10	9	19
Total	19	10	29

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 0.0976
 A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados)
 é considerada a ser estatisticamente significativa.

Ca(OH) ₂ X C+ - 14d			
Tabela de contingência dos dados amostrais:			
	9	1	10
	10	9	19
	19	10	29

Resultados do Teste Exato de Fisher -Ca(OH) ₂ XC+14d	
Probabilidade parcial (0) :	0.3334 %
Probabilidade parcial (1) :	3.0010 %
Probabilidade total (de H0) :	3.3344 %
Significante ao nível de 5 % (α = 0,05)	

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CA(OH)₂X⁺C⁺ 21D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	1	1	2
Grupo 2	9	7	16
Total	10	8	18

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000
 A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados)
 é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CHI₃ X CA(OH)₂ 7D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	10	9	19
Grupo 2	10	9	19
Total	20	18	38

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000
 A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados)
 é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CHI₃ X CA(OH)₂ 14D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	9	1	10
Grupo 2	9	1	10
Total	18	2	20

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000
 A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados)
 é considerada a não ser estatisticamente significativa.

ANÁLISE DE UMA TABELA DE CONTINGÊNCIA 2X2 - CHI₃ X CA(OH)₂ 21D

	Resultado 1	Resultado 2	Total
Grupo 1	1	1	2
Grupo 2	1	1	2
Total	2	2	4

Teste Exato de Fisher

Os dois valores de P são iguais a 1.0000
 A associação entre linhas (grupos) e colunas (resultados)
 é considerada a não ser estatisticamente significativa.