

# **Avaliação da solução de clorexidina 2% e medicamentos sobre *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares**

## ***Evaluation of 2% chlorhexidine solution and medicaments on *Escherichia coli* and endotoxins in root canals***

### **Marcia Carneiro VALERA**

Professora Adjunta – Departamento de Odontologia Restauradora – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil.

### **Lilian Eiko MAEKAWA**

Aluna de Doutorado – Departamento de Odontologia Restauradora – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil.

### **Luciane Dias de OLIVEIRA**

Professora Doutora – Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil.

### **Cláudio Antonio Talge CARVALHO**

Professor Doutor – Departamento de Odontologia Restauradora – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – São José dos Campos – UNESP – SP – Brasil.

### **Cristiane Yumi KOGA-ITO**

Professora Adjunta – Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil.

### **Antonio Olavo Cardoso JORGE**

Professor Titular – Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil.

---

#### **RESUMO**

A proposta deste estudo foi avaliar a efetividade da solução de clorexidina 2% e medicações intracanaís sobre *Escherichia coli* e endotoxina em canais radiculares. Os canais radiculares de 48 dentes unirradiculados foram contaminados com *E. coli* por 14 dias, instrumentados com solução de clorexidina 2% e divididos em 3 grupos de acordo com a medicação intracanal (MIC) utilizada: pasta de Ca(OH)<sub>2</sub>, polimixina B, Ca(OH)<sub>2</sub> + clorexidina gel 2% (CLX). No grupo controle foi utilizada somente solução fisiológica. Foram realizadas coletas do conteúdo do canal radicular imediatamente após a instrumentação (S1), após 7 dias da instrumentação (S2), imediatamente após 14 dias da ação da MIC (S3) e 7 dias após remoção da MIC (S4). Para todas as coletas foram realizados os seguintes testes: a) análise microbiológica; b) quantificação de endotoxina pelo teste cromogênico do lisado de amebócitos do *Limulus*. Os resultados foram analisados pelo teste de ANOVA e Dunn (5%). Na amostra S2 a sol. CLX 2% apresentou melhores resultados em relação à solução fisiológica. Na amostra S3 houve diferença estatística do Ca(OH)<sub>2</sub> + CLX em relação ao Ca(OH)<sub>2</sub> e polimixina B. Na amostra S4 não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos. Conclui-se que somente as medicações intracanaís são capazes de diminuir significativamente a quantidade de endotoxinas.

#### **UNITERMOS**

Endotoxinas; hidróxido de cálcio; clorexidina; polimixina.

---

## INTRODUÇÃO

A endotoxina presente na parede celular de bactérias Gram-negativas<sup>26</sup> é capaz de se difundir pelos túbulos dentinários em direção ao cimento em 24 horas<sup>17</sup>. Estas endotoxinas, bem como os microrganismos estão presentes nos canais radiculares com necrose pulpar causando reabsorção óssea e periapical e sintomatologia dolorosa. As endotoxinas têm potente ação citotóxica, liberadas durante sua multiplicação ou morte celular, causando uma série de efeitos biológicos que levam a uma reação inflamatória, imunológica e reabsorção óssea periapical<sup>28</sup>.

Durante o preparo biomecânico, várias substâncias químicas têm sido utilizadas como soluções irrigadoras. Devido a uma série de propriedades, como capacidade de dissolver matéria orgânica, ação lubrificante e neutralização de conteúdo tóxico, o hipoclorito de sódio é atualmente a substância mais utilizada durante a instrumentação e irrigação de canais radiculares<sup>6,14,27</sup>. Entretanto, a utilização de altas concentrações do hipoclorito de sódio pode causar irritação aos tecidos periapicais<sup>20</sup>. Por este motivo, soluções alternativas têm sido propostas visando a associação de efetividade antimicrobiana e biocompatibilidade. A clorexidina, em função de seus efeitos antimicrobianos, substantividade e biocompatibilidade tem sido proposta como alternativa durante o preparo biomecânico<sup>1,3,5,7,11,14</sup>. Entretanto, essas soluções irrigadoras comumente utilizadas na prática endodôntica, não demonstram efetividade sobre a endotoxina, sendo necessária a utilização da medicação intracanal<sup>18,25</sup>.

O hidróxido de cálcio tem sido amplamente utilizado como medicação intracanal e tem demonstrado efetiva ação sobre LPS<sup>16,19,23</sup>, pois promove hidrólise da porção lipídica da endotoxina, neutralizando seus efeitos biológicos<sup>22</sup>. A associação hidróxido de cálcio e clorexidina a 2% promove aumento da ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio e mantém a atividade indutora de reparação, além da efetividade sobre endotoxinas presentes no canal radicular<sup>24</sup>.

Na área médica, tem-se verificado que a polimixina B, antibiótico polipeptídico catiônico, bloqueia efeitos biológicos causados pelas endotoxinas<sup>15</sup>, sendo utilizada no tratamento de pacientes com sepsis por microrganismos Gram-negativos<sup>9</sup>.

A proposta deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e endotóxica da solução de clorexidina 2% e de medicações intracanaís: pasta de hidróxido de cálcio, polimixina B e associação hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2%.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparação e contaminação dos espécimes

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP (protocolo 067/2005). Foram utilizados 48 dentes humanos unirradiculados que tiveram suas coroas seccionadas padronizando o comprimento dos espécimes em  $16 \pm 0,5$ mm.

A instrumentação inicial dos canais radiculares foi realizada em toda a sua extensão, desde seu diâmetro anatômico até a lima K 30. Em seguida, foi feito vedamento da região apical dos dentes com resina composta fotopolimerizável Z-100 (3M, São Paulo, SP, Brasil) e as raízes impermeabilizadas externamente com duas camadas de adesivo epóxi, exceto a região da abertura cervical. Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em placas de cultura celular de 24 poços. Estas placas e todos os materiais utilizados foram esterilizados por radiação gama (EMBRARAD, Cotia, São Paulo, Brasil).

Os canais radiculares foram contaminados com uma suspensão ( $10^6$  céls/ml) contendo *Escherichia coli*. Os espécimes foram mantidos em estufa a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , em umidade relativa, por 14 dias, sendo que a cada 3 dias, foi adicionado meio de cultura (caldo BHI) no interior dos canais radiculares.

### Grupos experimentais

Após a confirmação da contaminação (coleta inicial – S1), todos os canais foram instrumentados até a lima K 50 e escalonados até a lima K 80, utilizando-se 3 ml da solução de clorexidina 2% (CLX sol. 2%) (Byofórmula – Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP, Brasil) a cada troca de instrumento. Após o preparo biomecânico (PBM), foi realizada a primeira coleta (S1). Os canais foram preenchidos com solução salina apirogênica e estes permaneceram em estufa durante 7 dias. Após, foi realizada a segunda coleta (S2). Os espécimes foram divididos em 3 grupos (n=12), de acordo com a medicação intracanal utilizada:

- pasta de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) (Pasta Calen, SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- solução de polimixina B (PB) (Oftalmos Fórmulas Oficiais, São Paulo, SP, Brasil);

- associação do hidróxido de cálcio (PA) (Biodinâmica Química e Farmacêutica, Ibiporã, PR, Brasil) com clorexidina gel 2% ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + CLX gel 2%), (Byofórmula – Farmácia de Manipulação, São José dos Campos, SP, Brasil), proporção 1:1;

No grupo controle (n=12) foi utilizada solução fisiológica aprotéica como solução irrigadora e como medicação intracanal (SFA).

Após o preenchimento dos canais radiculares com a medicação de demora, estes permaneceram em estufa a 37°C por catorze dias. Após este período foi realizada a terceira coleta (S3). Os canais foram preenchidos com solução salina aprotéica, permanecendo em estufa por 7 dias. Após, foi realizada a quarta coleta (S4).

Todas as coletas dos canais radiculares (si, S1, S2, S3 e S4) foram realizadas da mesma forma: os canais foram preenchidos com água aprotéica e foi coletado o conteúdo do canal radicular até a quantidade de 100 µl para realização da análise microbiológica e quantificação de endotoxinas.

Para determinar a atividade antimicrobiana foram realizadas diluições seriadas das amostras coletadas do canal radicular e semeadura, em duplicata, em placas contendo ágar BHI. Após, foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas, e em seguida realizadas

contagens de unidades formadoras de colônia (UFC/ml) de *E. coli*.

Para quantificação de endotoxinas foi utilizado o teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus*. Os resultados foram submetidos à análise estatística pela análise de variância ANOVA, com nível de significância de 5%, e pelo teste de Dunn.

## RESULTADOS

Na avaliação microbiológica verificou-se que a solução de clorexidina 2% foi capaz de eliminar completamente *E. coli* nos canais radiculares de todos os espécimes, sendo assim, não houve necessidade de aplicação de teste estatístico.

Em relação à solução fisiológica (grupo controle), verificou-se que houve uma redução do número de microrganismo após o PBM, entretanto houve um aumento após o período final do experimento (S4) (Tabela 1).

Na avaliação da quantificação de endotoxina houve diferença estatística entre o grupo da clorexidina e o grupo controle na primeira e a segunda coleta. Na terceira coleta, o grupo controle foi diferente estatisticamente do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ; PB foi semelhante ao  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + CLX gel 2% (Tabela 2). Na quarta coleta  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , PB e  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + CLX gel 2% foram diferentes estatisticamente do grupo controle e semelhantes entre si (Tabela 3).

**Tabela 1 – Média de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/ml).**

Solução irrigadora	Si UFC/ml	S1 UFC/ml	S2 UFC/ml	MIC UFC/ml	S3 UFC/ml	S4 UFC/ml
CLX sol. 2%	433025000	0,0	0,0	Ca(OH) <sub>2</sub>	0,0	0,0
				PB	0,0	0,0
				Ca(OH) <sub>2</sub> +CLX	0,0	0,0
SFA	331000000	60733	4242167	SFA	55817	206213

CLX sol. 2% – solução de clorexidina 2%; SFA – solução fisiológica aprotéica;  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  – pasta de hidróxido de cálcio; PB – solução de polimixina B;  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +CLX – associação do hidróxido de cálcio (PA) com clorexidina gel 2%.

**Tabela 2 – Estatística descritiva dos valores da mediana e grupos homogêneos da quantidade de endotoxina de *E. coli* (em EU/ml) nas amostras S1 e S2.**

Sol. irrigadora	S1		S2	
	Mediana	Grupos homogêneos*	Mediana	Grupos homogêneos*
CLX sol. 2%	166	A	195	A
SFA	534	B	4524	B

\* letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (p<0,05). CLX sol. 2% – solução de clorexidina 2%; SFA – solução fisiológica aprotéica.

**Tabela 3 – Estatística descritiva dos valores da mediana e grupos homogêneos da quantidade de endotoxina de *E. coli* (em EU/ml) na amostras S3 e S4.**

Solução irrigadora	MIC	S3		S4	
		Mediana EU/ml	Grupos homogêneos*	Mediana EU/ml	Grupos homogêneos*
	Ca(OH) <sub>2</sub>	8,17	BC	10,37	B
CLX Sol. 2%	PB	6,99	C	10,65	B
	Ca(OH) <sub>2</sub> +CLX	38,3	AB	15,9	B
SFA	SFA	2160	A	2790	A

\* letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ). CLX sol. 2% – solução de clorexidina 2%; SFA – solução fisiológica apirogênica; Ca(OH)<sub>2</sub> – pasta de hidróxido de cálcio; PB – solução de polimixina B; Ca(OH)<sub>2</sub>+CLX – associação do hidróxido de cálcio (PA) com clorexidina gel 2%.

## DISCUSSÃO

A análise microbiológica referente à coleta de confirmação mostrou que todos os espécimes foram contaminados com *Escherichia coli*. Entretanto, a irrigação dos canais radiculares com solução de clorexidina 2% durante a instrumentação resultou em coletas microbiológicas negativas, indicando que a solução de clorexidina 2% conseguiu eliminar a *Escherichia coli*, bactéria capaz de induzir lesão periapical pela liberação de endotoxina em canais radiculares. Estes resultados concordam com os observados por outros autores<sup>1,7,10,11,12,14</sup> que demonstraram que todas as cepas microbianas tiveram seus crescimentos inibidos pela solução de clorexidina 2%.

A atividade antimicrobiana da clorexidina se deve a sua natureza catiônica que promove aderência ao composto aniônico da superfície microbiana, capaz de alterar a integridade de sua membrana plasmática, modificando sua permeabilidade, promovendo a precipitação das proteínas citoplasmáticas e alterando o balanço osmótico, além de modificar o metabolismo, crescimento e divisão da célula<sup>8,10,12</sup>. Essa aderência ocorre através dos grupos fosfato dos ácidos teicóicos presente nas bactérias Gram-positivas, e por meio dos grupos fosfato do lipopolissacarídeo das bactérias Gram-negativas.

Em função de suas propriedades catiônicas, essa bisbiguanida também se liga, eletrostaticamente, à hidroxiapatita, à película adquirida, ao biofilme dental, à mucosa oral e às proteínas salivares. À medida que sua concentração no meio é diminuída, ela vai sendo liberada. Tal qualidade, denominada substantividade, faz com que seu efeito se torne mais duradouro<sup>8,13</sup>. Em concentrações entre 0,2% a 2% possui largo

espectro. Além disto, baixa toxicidade, alto poder de limpeza com menor quantidade de *smear layer* do que o hipoclorito de sódio, capacidade de difusão através dos túbulos dentinários e biocompatibilidade, o que a torna um agente indicado para uso na terapia endodôntica<sup>8,12,24</sup>.

A irrigação com solução de clorexidina 2% se mostrou eficiente na neutralização de endotoxinas em relação à solução fisiológica. Entretanto, verificou-se que a quantidade de EU/ml na primeira e segunda amostra não apresentou valores tão pequenos. Após a aplicação das medicações intracanaís houve redução de endotoxinas, sendo que a pasta de hidróxido de cálcio e a Polimixina B apresentaram valores próximos e mostraram-se mais eficientes que a associação Ca(OH)<sub>2</sub> + CLX gel 2%. Entretanto, na quarta coleta os valores de endotoxina encontrados nos três grupos não diferiram estatisticamente.

O hidróxido de cálcio é capaz de inativar a endotoxina (LPS) pela hidrólise do lípide A, resultando em elevada liberação de ácidos graxos livres. Além disto, o hidróxido de cálcio é capaz de eliminar a ação do LPS na produção de TNF- $\alpha$  em monócitos periféricos do sangue<sup>2</sup>. A associação Ca(OH)<sub>2</sub> + CLX reúne as propriedades benéficas, como neutralização de LPS, do hidróxido de cálcio com a ação antimicrobiana da clorexidina, portanto era esperado melhores resultados com esta associação. Entretanto, deve-se ressaltar que esta associação foi semelhante aos outros dois grupos (pasta de hidróxido de cálcio e polimixina B), após a quarta coleta. Outros autores<sup>4,24,25</sup> também comprovaram a efetividade da pasta de hidróxido de cálcio, da polimixina B e da associação do Ca(OH)<sub>2</sub> + CLX.

A efetividade da polimixina B sobre endotoxinas foi comprovada neste estudo e por outros autores<sup>18,19</sup>.

Rifkind e Palmer<sup>21</sup>, sugerem que alguns antibióticos polipeptídeos catiônicos, como a polimixina B, são capazes de neutralizar as endotoxinas pela combinação direta à carga eletronegativa do lipídeo A da molécula de endotoxina. Entretanto, Morrison e Jacobs<sup>15</sup>, verificaram que a polimixina tem alta afinidade e liga-se a porção do lipídeo A, alterando assim, a conformação tridimensional da molécula de LPS.

Os resultados obtidos permitem dizer que a eliminação da *Escherichia coli* é possível após o pre-

paro biomecânico, entretanto, somente a medicação intracanal leva a redução significativa de endotoxina.

## CONCLUSÃO

Concluiu-se que neste estudo a clorexidina não foi capaz de neutralizar as endotoxinas do canal radicular; somente as medicações intracanaís foram capazes de diminuir significativamente a quantidade de endotoxinas.

---

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of the 2% chlorhexidine solution and medications on *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. The root canals of 48 single-rooted teeth were contaminated with *E. coli* for 14 days, instrumented with 2% chlorhexidine solution and divided into 3 groups according to the intracanal medication (ICM) used: Ca(OH)<sub>2</sub> paste, polymyxin B (PB), Ca(OH)<sub>2</sub> + 2% chlorhexidine gel (CLX). The control group it was only used physiological solution. Samples of the root canal content were collected immediately after PBM (S1), at 7 days after PBM (S2), immediately after 14 days of ICM activity (S3), and 7 days after removal of ICM (S4). The following aspects were evaluated for all collections: a) antimicrobial activity; b) quantification of endotoxin by the *Limulus ameobocyte lysate* Test. The results were analyzed by ANOVA and Dunn (5%) statistical tests. In the S2 sample the 2% CLX presented better resulted in relation to the physiological solution. In the S3 sample the Ca(OH)<sub>2</sub> was *statistically different* from Ca(OH)<sub>2</sub> and polymyxin B. In the S4 sample it did not have significant statistical differences between the groups. It was conclude that only the intracanal medications are capable to reduce the amount of endotoxins significantly.

## UNITERMS

Endotoxins; calcium hydroxide; chlorhexidine; polymyxin.

---

## REFERÊNCIAS

- Ballal V, Kundabala M, Acharya S, Ballal M. Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. *Aust Dent J*. 2007;52(3):257.
- Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF- $\alpha$  release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod J*. 1997;30(3):155-9.
- Buck RA, Eleazer PD, Staat RH, Scheetz JP. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. *J Endod*. 2001;27(3):206-8.
- Craig WA, Turner JH, Kunin CM. Prevention of the generalized Shwartzman reaction and endotoxin lethality by polymyxin B localized in tissues. *Infect Immun*. 1974;10(2):287-92.
- Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gul K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *J Endod*. 2004;30(2):84-7.
- Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J*. 2002;13(2):113-7.
- Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CRA, Pécora JD, Sousa Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J*. 2003;14(1):58-62.
- Estrela CRA, Estrela C, Reis C, Bammann LL, Pécora JD. Control of microorganisms *in vitro* by endodontic irrigants. *Braz Dent J*. 2003;14:187-92.
- Evans ME, Feola DJ, Rapp RP. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother*. 1999;33(9):960-7.
- Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod*. 2001;27:452-55.
- Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2001;34:424-8.
- Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz, CCR, Teixeira, FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. *Int Endod J*. 2003;36:267-75.
- Medici MC, Fröner IC. A scanning electron microscopic evaluation of different root canal irrigation regimens. *Braz Oral Res*. 2006;20:235-40.
- Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo CHR, Mancini MNG. *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J*. 2004;37(5):311-9.
- Morrison DC, Jacobs DM. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharide. *Immunochemistry*. 1976;13(10):813-8.

16. Nelson Filho P, Leonardo MR, Silva LAB, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod.* 2002;28(10):694-6.
17. Oliveira LD, Carvalho CAT, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. *Braz Oral Res.* 2005;19(1):5-10.
18. Oliveira LD, Carvalho CAT, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. *In vitro* effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104(1):135-42.
19. Oliveira LD, Leão MVP, Carvalho CAT, Camargo CHR, Valera MC, Jorge AOC. et al. *In vitro* effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. *J Dent.* 2005;33(2):107-14.
20. Onçag O, Hosgor M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J.* 2003;36(6):423-32.
21. Rifkind D, Palmer JD. Neutralization of endotoxin toxicity in chick embryos by antibiotics. *J Bacteriol.* 1966;92(4):815-9.
22. Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod.* 1994;20(3):127-9.
23. Silva LAB, Nelson Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin *in vivo*. *J Endod.* 2002;28(2):94-8.
24. Soares JA, Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Ito IY. Elimination of intracanal infection in dog's teeth with induced periapical lesions after rotary instrumentation: influence of different calcium hydroxide pastes. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(3):172-7.
25. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LAB. Effect of different irrigation solutions. *Int Endod J.* 2003;36(11):733-9.
26. Vafaie NM, Dobeck JM, Warbington ML, Dibart S, Harris M, Skobe Z. DNA analyses of bacteria in symptomatic endodontically treated teeth [abstract OR 32] *J Endod.* 1999;25(4):290.
27. Valera MC, Rego JM, Jorge AOC. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. *J Endod.* 2001;27(6):401-8.
28. Wang CY, Stashenko P. The role of interleukin-1 $\alpha$  in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. *Oral Microbiol Immunol.* 1993;8(1):50-6.

Recebido em 08/07/2009

Aprovado em 12/11/2009

Correspondência

Marcia Carneiro Valera

Endereço: Av. Engenheiro Francisco José Longo, 777

Jd. São Dimas

CEP 12245-000 São José dos Campos – SP

e-mail: marcia@fosjc.unesp.br