UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

THAIS CRISTINA PEREIRA

Descontaminação intra-tubular de dentes bovinos por pastas de hidróxido de cálcio associadas a diferentes veículos.

BAURU
2015

THAIS CRISTINA PEREIRA

Descontaminação intra-tubular de dentes bovinos por pastas de hidróxido de cálcio associadas a diferentes veículos

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Endodontia.

Orientador: Prof^a. Dr^a Flaviana Bombarda de Andrade.

Versão Corrigida

BAURU
2015

P414d Pereira, Thais Cristina
Descontaminação intra-tubular de dentes
bovinos por pastas de hidróxido de cálcio
associadas a diferentes veículos/ Thais Cristina
Pereira – Bauru, 2015.

p. :114 il. ; 31cm.

Dissertação (Doutorado/Mestrado) –
Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade
de São Paulo

Orientador: Prof^a. Dr^a. Flaviana Bombarda de
Andrade

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo dom da vida, que é a maior viagem de todas, obrigada por guiar minha trajetória e iluminar meu caminho, e sempre estar do meu lado!

Aos meus pais, Silvia e Arlindo, sem os quais eu não seria capaz de fazer e conquistar nada em minha vida. Obrigada por sempre apoiarem meus sonhos e planos, pela compreensão, paciência e reconhecimento das minhas vitórias. Por me mostrarem o valor do estudo e do trabalho desde sempre. Vocês revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação. Abriram a porta do meu futuro, trabalharam dobrado, sacrificaram seus sonhos em favor dos meus, não foram apenas pais, mas amigos e companheiros, mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis e o estudo um fardo pesado demais. Obrigada por tudo! Amo vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A toda minha família , meus pais **Silvia e Arlindo**, minhas avós **Alice e Célia**, meus irmãos **Isadora, Ana Beatriz e João Pedro**, e a todos os meus tios, muito obrigada por tudo que sempre fizeram e fazem por mim, por todo o apoio, carinho e compreensão! Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora e amiga, **Prof^a Dr^a Flaviana Bombarda de Andrade**, por ter me acolhido sem hesitar, e me orientado desde a minha especialização, quando eu ainda não tinha vínculo com o departamento, e depois quando eu entrei no mestrado, sempre com muita boa vontade, me dando idéias, mas também ouvindo as minhas, apoiando e incentivando meus planos e projetos, e me ajudando no que era preciso. Sua amizade, conselhos, conhecimentos divididos comigo foram essenciais na minha formação. Você pode ter certeza que fez a diferença no meu futuro, tanto na parte profissional quanto na parte humana. Serei sempre agradecida por isso! OBRIGADA POR TUDO!

Ao **Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte**, por sempre ter me acolhido, aconselhado e dado boas idéias aos projetos a serem realizados, desde a graduação e até agora, com sua inteligência brilhante! Muito obrigada!

Aos outros professores do departamento de Endodontia da FOB, **Prof. Dr. Clóvis Monteiro Bramante, Prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes, Prof. Dr. Norberti Bernardineli, Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia, Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan**, por todo o conhecimento e aprendizado que obtive com cada um de vocês! É uma honra conviver e trabalhar com pessoas tão brilhantes! Muito obrigada!

A **Layla Regina Silva Munhoz de Vasconcelos**, minha companheira de mestrado, que se tornou uma grande amiga, sem a qual eu com certeza não teria finalizado esta etapa! Que sempre me ajudou em tudo! Você pode sempre contar comigo! Obrigada por ter sido uma grande amiga!

Ao **Sávio Brandelero Júnior**, por todo o apoio profissional e emocional, pela sua amizade, conselhos, por sempre estar disposto a me ajudar desde a especialização e até agora, por ser essa ótima pessoa! Obrigada por tudo!

Aos meus amigos do mestrado **Murilo e Samuel**, por terem me ajudado antes e durante o mestrado, pela amizade, risadas e aprendizado. Obrigada!

A todos os alunos da pós graduação da Endodontia da FOB por toda a ajuda que sempre deram, pelo bom convívio e momentos de descontração, principalmente a **Amanda, Bruno Cavenago e Raquel** que sempre me ajudaram de maneira excepcional e me ensinaram muito. Obrigada por tudo!

Aos funcionários do departamento de Endodontia da FOB, **Andressa, Edimauro e Suely** por todo suporte e ajuda que dão aos alunos, pela gentileza e simpatia. Muito obrigada!

A **Márcia Graeff**, por fazer seu trabalho com amor e paciência, sempre de bom humor e também preocupada com os resultados e com as pesquisas ali realizadas. Muito Obrigada!

A minha família de Bauru, minhas amigas pra toda hora **Angie, Estefania, Luara e Melody**. Muito obrigada pela nossa amizade, pela companhia, pelas comemorações, pelos desabafos, pelos almoços e jantas, por me aguentarem nas alegrias e nas decepções, enfim, nesses dois anos vocês me ensinaram muito, sobre tudo, só tenho a agradecer e dizer que vou sentir muita falta de nós todas juntas! Muito Obrigada por tudo! Amo vocês!

Aos meus amigos irmãos que estão comigo desde que eu cheguei em Bauru, **Fabiana, Ygor e Patrícia**, que fizeram parte da minha graduação e agora são parte da minha vida! Vocês sempre me apoiaram e me aconselharam em tudo e estarão pra sempre no meu coração. Amo vocês!

A todos os outros amigos que Bauru me trouxe, principalmente **Raquel e Renan**, obrigada pela amizade e apoio sempre! Obrigada por tudo! Amo vocês!

Aos meus amigos de Promissão **Raissa, Larissa, Juliana, Victor, Ivana, Natália e Lilian**, muito obrigada pela amizade, apoio, por serem essas pessoas maravilhosas, e por sempre sermos amigos do mesmo jeito perto ou longe! Amo vocês!

A Faculdade de Odontologia de Bauru, que se tornou um segundo lar pra mim, obrigada por proporcionar estrutura para formar e transformar alunos em profissionais da melhor qualidade.

Ao CNPQ e a FAPESP, pelo apoio financeiro fundamental para a execução das pesquisas.

*“O cientista não é o homem que
fornece as verdadeiras respostas; é
quem faz as verdadeiras perguntas”.*

(Claude Lévi-Strauss)

RESUMO

Descontaminação intra-tubular de dentes bovinos por pastas de Hidróxido de Cálcio associadas a diferentes veículos

O preparo biomecânico acompanhado pela irrigação no tratamento endodôntico de canais infectados tem se mostrado efetivo, porém alguns micro-organismos ainda sobrevivem. A espécie bacteriana mais frequentemente encontrada em casos de fracasso endodôntico é *Enterococcus faecalis*. Para combatê-lo diferentes medicações intra-canal são utilizadas, principalmente as pastas a base de hidróxido de cálcio e outras substâncias vem sendo associadas a estas para potencializar seu efeito antimicrobiano. Desta forma, é pertinente comparar *in vitro* a capacidade antimicrobiana do hidróxido de cálcio com diferentes veículos e aditivos, sobre *Enterococcus faecalis*, através de cultura microbiológica e microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). Para isso, tubos de dentina bovina padronizados foram previamente esterilizados e em seguida contaminados durante 5 dias com a bactéria. Os espécimes receberam a medicação por 15 dias e foram divididos em cinco grupos-teste: pasta de hidróxido de cálcio veiculado em água destilada(G1), pasta veiculada em propilenoglicol(G2), pasta de hidróxido de cálcio veiculado em propilenoglicol com os aditivos extrato etanólico de própolis (G3), clorexidina (G4) e paramonoclorofenol canforado - PMCC (G5). Após o período da medicação, a coleta bacteriana dos fragmentos de dentina foi realizada com brocas de Largo em dispositivo esterilizado, para contagem dos micro-organismos ainda viáveis em unidades formadoras de colônias. A MCVL analisou as bactérias viáveis (verde) e mortas (vermelho) no interior dos túbulos dentinários, com o auxílio do corante Live and Dead®. Houve ação antimicrobiana intra-tubular dentinária sobre *Enterococcus faecalis* por todas as pastas de hidróxido de cálcio testadas. A partir deste trabalho foi possível observar a melhor ação antimicrobiana contra *E. faecalis* pela pasta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol e PMCC nas regiões superficial e profunda da massa dentinária.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*, hidróxido de cálcio, microscopia.

ABSTRACT

Intra-tubular disinfection of bovine teeth contaminated with calcium hydroxide pastes associated with different vehicles.

Biomechanical preparation followed by irrigation in endodontic treatment of infected root canals has been shown, however, some micro-organisms still survive. The most frequently founded bacterial specie in endodontic treatment fail is *Enterococcus faecalis*. To combat it, different intra-canal medications are used, mainly the calcium hydroxide pastes and other substances have been associated to calcium hydroxide to leverage its antimicrobial effect. Thus, it's relevant to compare *in vitro* the antimicrobial ability of calcium hydroxide with different vehicles and additives, against *Enterococcus faecalis*, through microbiological culture and confocal laser scanning microscopy (CLSM). For this, standard dentine tubes were sterilized and then infected with the bacteria for 5 days and were divided in five test-groups, submitted to medication for 15 days with calcium hydroxide paste in distilled water (G1), in propylene glycol (G2), besides calcium hydroxide in propylene glycol with ethanol extract of propolis (G3), chlorhexidine (G4) and CPMC (G5). After the medication period, the bacterial collection of the dentine's fragments was done with Largo's drill in a sterilized device, to count micro-organisms still viable in colony forming units. The CLSM evaluated the viable (green) and dead (red) bacteria inside the dentinal tubules with the aid of the Live and Dead® dye. There was dentinal intra-tubular antimicrobial action against *Enterococcus faecalis* for all the tested calcium hydroxide pastes. From this work was possible to observe a better antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* by the calcium hydroxide paste in propylene glycol and CPMC in superficial and deep areas of the dentine.

Key words: *Enterococcus faecalis*, calcium hydroxide, microscopy, propolis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 – Imagem do incisivo bovino a ser cortado, do espécime em forma de tubo, e já preparados para a esterilização..... 47
- Figura 2 - Imagem por MCVL da dentina contaminada de um espécime do estudo piloto..... 53
- Figura 3 – Imagens por MCVL da dentina contaminada de um espécime após as medicações dos grupos G1, G2 e G3 na região superficial e na região profunda..... 65
- Figura 4 - Imagens por MCVL da dentina contaminada de um espécime após as medicações dos grupos G4 e G5 e de um controle positivo na região superficial e na região profunda..... 67
- Figura 5 - Imagem do gráfico obtido pela análise das imagens do MCVL pelo programa Bioimager de um espécime utilizado como controle positivo..... 69
- Figura 6 - Imagens da penetrabilidade das medicações intra-canal do corte do espécime a 3mm do ápice (coluna esquerda) e a 5mm do ápice(coluna direita) dos grupos G1, G2 e G3..... 75
- Figura 7 - Imagens da penetrabilidade das medicações intra-canal do corte do espécime a 3mm do ápice (coluna esquerda) e a 5mm do ápice(coluna direita) dos grupos G4 e G5..... 77

- GRÁFICOS

Gráfico 1 – Mediana da porcentagem de bactérias vivas por μm^3 , após medicação intracanal durante 15 dias através de microscopia confocal de varredura à laser	61
Gráfico 2 – Mediana da porcentagem de bactérias vivas por μm^3 no terço cervical, após medicação intracanal dos diferentes grupos durante 15 dias.....	62
Gráfico 3 – Mediana da porcentagem de bactérias vivas por μm^3 no terço médio, após medicação intracanal dos diferentes grupos durante 15 dias.....	62
Gráfico 4- Mediana da porcentagem de bactérias vivas por μm^3 nas região superficial do terço cervical do canal radicular, após medicação intracanal durante 15 dias.....	63
Gráfico 5 - Mediana da Porcentagem de bactérias vivas por μm^3 nas região profunda do terço cervical do canal radicular, após medicação intracanal durante 15 dias.....	64
Gráfico 6 - Mediana da porcentagem de bactérias vivas por μm^3 na região superficial do terço médio do canal radicular, após medicação intracanal durante 15 dias.....	64
Gráfico 7 - Mediana da porcentagem de bactérias vivas por μm^3 na região profunda do terço médio do canal radicular, após medicação intracanal durante 15 dias.....	65
Gráfico 8 - Quantidade de UFC/mL entre cada grupo, após medicação intracanal durante 15 dias.....	71

Gráfico 9 -	Quantidade de UFC/mL entre cada grupo na região superficial da dentina, após medicação intracanal durante 15 dias.....	72
Gráfico 10	Quantidade de UFC/mL entre cada grupo na região profunda da dentina, após medicação intracanal durante 15 dias.....	73
-		
Gráfico 11-	Mediana da penetrabilidade das diferentes medicações intracana.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade de UFC/mL entre cada grupo, após medicação intracanal durante 15 dias.	71
Tabela 2 – Quantidade de UFC/mL entre cada grupo da região superficial, após medicação intracanal durante 15 dias.....	72
Tabela 3 – Quantidade de UFC/mL entre cada grupo da região profunda, após medicação intracanal durante 15 dias	72
Tabela 4 - Mediana da porcentagem de penetração das diferentes medicações intra-canal.....	73

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	porcentagem
mm	milímetros
µm	micrômetros
mL	mililitros
p	Significância
°C	Graus Célsius
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
EEP	Extrato Etanólico de Própolis
EDTA	Ácido etilediamino tetra-ácetico
PMC	Paramonoclorofenol
PMCC	Paramonoclorofenol Canforado
MCVL	Microscópio Confocal de Varredura a Laser
UFC	Unidade formadora de colônia
FDA	Diacetato de Fluoresceína
PI	Iodeto de Propídio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
3	PROPOSIÇÃO	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	MICRO-ORGANISMOS	45
4.2	ANTIMICROBIANOS	45
4.2.1	Hidróxido de Cálcio P.A.	46
4.2.2	Extrato Etanólico de Própolis a 10% (EEP)	46
4.2.3	Clorexidina	46
4.2.4	Paramonoclorofenol Canforado	46
4.3	TUBOS DE DENTINA	47
4.4	PROTOCOLO DE CONTAMINAÇÃO	48
4.5	MEDICAÇÃO INTRA-CANAL	49
4.6	ANÁLISE NO MICROSCÓPIO CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (MCVL)	55
4.7	CULTURA MICROBIOLÓGICA	55
4.8	AVALIAÇÃO DA PENETRABILIDADE DAS PASTAS POR MCVL	56
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
5	RESULTADOS	59
5.1	AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (MCVL)	61
5.2	AVALIAÇÃO POR CULTURA MICROBIOLÓGICA	71
5.3	AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO INTRA-TUBULAR DAS PASTAS	73
6	DISCUSSÃO	79
6.1	DA METODOLOGIA	81
6.2	DOS RESULTADOS	84
7	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	95

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento dos canais radiculares depende do preparo biomecânico, irrigação, controle microbiano e completa obturação do sistema de canais radiculares (VAHDATY, PITT FORD e WILSON, 1993; EL KARIM, KENNEDY e HUSSEY, 2007). A realização de todas essas etapas no tratamento endodôntico de canais infectados tem se mostrado efetivo, promovendo redução significativa dos micro-organismos presentes no interior dos canais. Porém, alguns micro-organismos ainda sobrevivem (BYSTRÖM e SUNDQVIST, 1993).

Os micro-organismos podem sobreviver aos procedimentos endodônticos devido às complexidades anatômicas e consequente acesso limitado dos instrumentos e irrigantes, ou podem também infiltrar através de um selamento temporário inadequado ou insuficiente (FRIEDMAN, 2000; EL KARIM, ZERELLA, FOUAD e SPÅNGBERG, 2005; KENNEDY e HUSSEY, 2007).

As bactérias associadas a infecções endodônticas primárias são predominantemente Gram-negativas anaeróbias, enquanto que as bactérias associadas a infecções secundárias compreendem uma ou poucas espécies, das quais a mais importante é *Enterococcus faecalis*, um coco Gram-positivo facultativo, frequentemente presente em casos de fracasso endodôntico. Por isso, meios complementares ao tratamento endodôntico para combatê-lo vêm sendo estudados, como o uso de diferentes medicações intra-canal entre sessões, eliminando bactérias remanescentes no interior do canal, para proporcionar a redução da inflamação periapical (SAFAVI, SPANGBERG e LANGELAND, 1990; SUNDQVIST, 1994).

As medicações intracanal de escolha são geralmente as pastas a base de hidróxido de cálcio devido a sua atividade anti-microbiana contra infecções do sistema de canais radiculares. O hidróxido de cálcio apresenta excelente compatibilidade biológica; ação antibacteriana, através da inibição enzimática e alterações na parede celular; ação anti-exsudativa e ainda é responsável pela ativação da enzima tecidual fosfatase alcalina, indutora da formação de tecido ósseo mineralizado e, por conseguinte, contribui para o processo de reparo, características

altamente desejadas em um tratamento endodôntico, no qual a grande dificuldade é a presença de contaminação por micro-organismos (ESTRELA et al., 1999).

Apesar de ser a medicação mais comumente usada, o hidróxido de cálcio não é tão efetivo contra alguns micro-organismos como *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. Além disso, sua eficácia em reduzir o número de células bacterianas entre sessões é questionável. Por isso, outras substâncias foram associadas ao hidróxido de cálcio para melhorar sua ação antimicrobiana (PETERS et al, 2002).

O veículo empregado na pasta de hidróxido de cálcio também influencia seu efeito antimicrobiano, uma vez que a difusão através da dentina pode ser facilitada, deixando o ambiente mais alcalino, o que dificulta a multiplicação microbiana (CAMÕES et al, 2004).

Os veículos apresentam-se como hidrossolúveis: aquosos (soro fisiológico, água destilada e solução anestésica) e viscosos (polietilenoglicol, propilenoglicol, metilcelulose e a glicerina) e os não hidrossolúveis (oleosos), como o paramonoclorofenol canforado, óleo de oliva e lipiodol (ESTRELA; PESCE, 1996).

O veículo mais utilizado com o hidróxido de cálcio no Brasil é o propilenoglicol, um líquido incolor, com baixa toxicidade e pouca ação acumulativa. Possui efeito antimicrobiano (BHAT e WALLEVAR, 1975; THOMAS, BHAT e KOTIAN; 1980) e é uma substância higroscópica (permite absorção de água), benéfico para o uso em endodontia, já que permite a permanência de medicações intracanal por um período maior (CRUZ et al., 2002). et al

O uso de fitoterápicos para diferentes propósitos tem sido alvo de diversos estudos. Na odontologia, o extrato de própolis mostra-se uma substância promissora para tratamento de ulcerações, gengivite e periodontite. Seu potencial anti-inflamatório e antimicrobiano faz com que este extrato possa ser utilizado em endodontia, como medicação intracanal (SILVA; ALMEIDA; SOUSA, 2004, FERREIRA et al., 2007). O extrato de própolis mostra atividade anti-inflamatória, anestésica, antimicrobiana e baixa citotoxicidade. Estudos já demonstraram a eficácia dessa substância contra várias bactérias como *Streptococcus mutans*, reduzindo seu crescimento e a produção de ácido por esta no biofilme dental, além

de afetar o crescimento de micro-organismos anaeróbios (GRANGE e DAVEY, 1990; DUARTE et al, 2003, 2006, FERREIRA et al., 2007).

A clorexidina é um agente antimicrobiano de amplo espectro de ação que tem sido usado durante o preparo dos canais radiculares e também como medicação intracanal entre sessões, por ser mais efetivo contra *Enterococcus faecalis* que o hidróxido de cálcio. Além disso, depois de um contato prolongado com o canal radicular dentinário, mostra substantividade. (FERRAZ et al, 2001; BASRANI et al, 2002; GOMES et al, 2006, TERVIT et al, 2009). A utilização da clorexidina como medicação intra-canal surgiu devido a sua ação antimicrobiana persistente quando aderida aos substratos aniônicos. Porém, estudos recentes mostram que a clorexidina associada ao hidróxido de cálcio pode reduzir sua eficiência antimicrobiana devido ao pH alcalino da pasta (ZERELLA, FOUAD e SPANGBERG, 2005). Um estudo mostrou que já em 7 dias, a clorexidina é completamente degradada quando esta associação é feita (BARBIN et al., 2008). A estrutura da molécula de clorexidina, adicionado a altos valores de pH, causados pela presença do hidróxido de cálcio, se decompõe em subprodutos reativos como a para-cloroanilina (USUI et al., 2006; HAVLÍKOVÁ et al., 2007), classificada pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer como possivelmente carcinogênica em humanos (World Health Organization), além de poder liberar também espécies reativas de oxigênio com o passar do tempo e em função do ambiente alcalino e de calor (BARBIN et al., 2008; BASRANI et al., 2007; YEUNG et al., 2007).

A combinação do hidróxido de cálcio com o paramonoclorofenol canforado (PMCC) é utilizada já a algum tempo para aumentar o espectro antimicrobiano do hidróxido de cálcio, principalmente contra algumas bactérias anaeróbias ou facultativas (SIQUEIRA e UZEDA, 1996;1997; SIREN ET AL., 2004). Apesar de ser altamente tóxico quando usado isoladamente (GRECCA et al., 2001; SILVEIRA et al., 2007), quando o PMCC é usado em pequenas quantidades misturado na pasta de hidróxido de cálcio ele tem essa toxicidade significativamente diminuída; isso porque nessas condições produz um sal fraco, o para-clorofenolato, que se junta ao íon hidrogênio e volta a ser para-clorofenol, gerando um excesso de íons OH, que tende a manter o pH alto (ANTHONY, GORDON e DEL RIO CE, 1982).

Os compostos fenólicos têm uma potente atividade antimicrobiana, e evidências científicas sugerem que a associação Hidróxido de Cálcio e PMCC tem espectro de ação mais amplo e elimina bactérias mais rapidamente do que o hidróxido de cálcio com veículos inertes. Assim, o PMCC não deve ser considerado como um veículo para o hidróxido de cálcio, mas sim como uma medicação adicional (SIQUEIRA JR e LOPES, 1999).

A microscopia confocal de varredura a laser é um método que permite a visualização em profundidade, possibilitando a análise no interior dos túbulos dentinários e que vem sendo utilizada com êxito para estudos de potencial antimicrobiano (MA et al., 2011; ANDRADE et al., 2015) e de dissolução de biofilme (DEL CARPIO PEROCHENA et al., 2015), com potencial promissor. Através do MCVL, pode-se confirmar a capacidade de penetração em profundidade dos micro-organismos no interior dos túbulos dentinários, o que é possível pela fluorescência emitida por estes micro-organismos remanescentes ao tratamento após serem corados por 10 a 20 minutos com o corante Live/Dead® BacLight™ Kit (Molecular Probes, Burlington, ON, Canada). Este é um kit composto de dois fluorocromos de afinidade pelos ácidos nucleicos, o SYTO-9 e o Iodeto de propídeo.

Através da coloração atribuída por esses fluorocromos, é possível determinar a viabilidade microbiana, tendo como parâmetro a integridade da membrana intratubular de algumas bactérias.

Desta forma, é pertinente comparar *in vitro* a capacidade antimicrobiana intradentinária do hidróxido de cálcio com os veículos – água destilada e propilenoglicol, além dos aditivos extrato etanólico de propólis (EEP), clorexidina e paramonoclorofenol canforado (PMCC). Assim, é possível verificar se a utilização de aditivos a uma substância já bastante utilizada como o hidróxido de cálcio pode potencializar sua ação antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis*. Para isso, foi utilizado um novo protocolo de contaminação já avaliado comprovadamente eficaz na contaminação em grandes profundidades da massa dentinária (ANDRADE et al., 2015). A análise do efeito antimicrobiano das pastas foi realizada através de cultura microbiológica e microscopia confocal de varredura a laser (MCVL), possibilitando uma adequada escolha da medicação para o uso clínico.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

As bactérias e reações inflamatórias induzidas por seus produtos metabólicos, enzimas e toxinas são a principal causa das doenças endodônticas (KAKEHASHI, STANLEY, e FITZGERALD, 1965). Assim, canais radiculares infectados alojam uma variedade de bactérias que vão gerar reações periapicais (BERGENHOLTZ 1974, SUNDQVIST e EHRNST 1976).

Nos exames microbiológicos de dentes com inflamação periapical, bactérias viáveis são frequentemente encontradas dentro dos canais radiculares infectados e nos túbulos dentinários adjacentes (RATHKE et al., 2012), atestando que a principal patologia associada ao fracasso do tratamento endodôntico é a periodontite apical, decorrente do estímulo destas bactérias (SKUCAITE et al., 2010).

Os biofilmes bacterianos dentro do canal radicular e sua relação com a etiologia da periodontite apical crônica e o insucesso do tratamento endodôntico tem sido motivo de diversos estudos nos últimos anos (LEONARDO et al., 2002 e FIGDOR, SUNDQVIST, 2007; RICUCCI, SIQUEIRA, 2010).

O tratamento dos canais radiculares tem como objetivo eliminar os elementos infecciosos dentro do sistema de canais radiculares, levando a cura da periodontite apical. Tal tratamento geralmente inclui a instrumentação mecânica associada ao uso de antissépticos/desinfetantes como soluções irrigadoras e medicações intracanal entre sessões (BYSTROM, 1985).

Ainda, a complexidade anatômica dos dentes humanos deve ser um fator considerado no planejamento do tratamento endodôntico, envolvendo a seleção dos instrumentos e técnica de instrumentação, solução irrigadora e medicação intracanal. Os atuais estudos de anatomia interna revelam com maior clareza a grande complexidade dos sistemas de canais radiculares e, com isso, a dificuldade para tratá-los (VILLAS BÔAS et al., 2011), principalmente quando se tratam de dentes com polpas necrosadas, altamente colonizados por micro-organismos.

Existe uma preocupação quanto a atividade dos micro-organismos remanescentes no canal após o preparo biomecânico. Tem sido mostrado que, se o

canal não é obturado ou preenchido com um antisséptico/desinfetante entre duas sessões, as bactérias podem se multiplicar rapidamente dentro de dias, e voltar a um número próximo ao seu original (BYSTRÖM e SUNDQVIST, 1981).

Acredita-se que o número de bactérias remanescentes pode ser controlado por confinamento com uma medicação intra-canal como pasta de hidróxido de cálcio colocada dentro do canal (BYSTRÖM et al. 1985).

A necessidade de uma medicação intra-canal entre sessões aumenta nos casos em que a infecção resiste aos tratamentos regulares e a terapia não pode ser completada com sucesso devido à presença de dor ou exsudato constante (FERREIRA et al, 2004).

As bactérias residuais na parte apical do canal radicular tem sido responsáveis por falhas no tratamento, até mesmo quando não haviam sido detectadas após o uso de medicação intra-canal antes da obturação (SJÖGREN et al. 1990, NAIR et al. 1990).

In vivo a redução da carga microbiana e também de endotoxinas após o preparo biomecânico foi demonstrado em estudos recentes, evidenciando a importância do conjunto de ações que constituem o tratamento endodôntico (VIANNA et al., 2007) e envolvem não só a instrumentação, como também o uso de substâncias químicas e medicação intracanal. A grande redução na quantidade de micro-organismos após o preparo químico-mecânico foi investigada com resultados significativos, ratificando a importância desta etapa (MARTINHO et al., 2010).

O uso desse preenchimento do canal, com o medicamento entre sessões é importante para a obtenção e manutenção do canal desinfetado após a instrumentação mecânica e antes da obturação (CHONG e FORD, 1992; BASRANI et al, 2003; EL KARIM et al, 2007).

Durante anos, uma variedade de substâncias tem sido preconizadas para o uso no tratamento dos canais radiculares. As origens históricas dos medicamentos remontam a tempos bastante antigos. Scribonius em 1045 a.c. escreveu sobre o uso de óleos e de vinho na boca de pacientes com dor. Durante a idade média, há referências sobre a utilização de óleo de cravo e de madeira de faia como

medicamentos (FOREMAN e BARNES, 1990). Infelizmente, a maioria desses medicamentos eram não-específicos e causavam desconforto para os pacientes. E foi devido a esta situação que o Hidróxido de Cálcio emergiu como um potente medicamento para ser usado intra-canal (WALTON, 1984). Desde sua introdução por Hermann no começo do século 20, ele tem sido usado em muitas situações na endodontia (FOREMAN e BARNES, 1990) como no tratamento de reabsorção radicular, como componente de cimentos obturadores do canal radicular e como medicação intracanal (GEORGE et al, 2009).

Para ser uma medicação intracanal efetiva, a substância de escolha deve ter um amplo espectro de ação, um tempo de ação razoável e deve estar em contato com as bactérias residuais em uma concentração suficiente (CHONG e FORD, 1992).

Assim, a medicação intracanal de escolha nos tratamentos endodônticos de polpas necrosadas, com ou sem lesão periapical evidente radiograficamente, é o hidróxido de cálcio. É um pó branco inodoro com baixa solubilidade em água, insolúvel em álcool (MOHAMMADI e DUMMER, 2011). Atua por dissociação iônica, culminando na liberação de íons cálcio e hidroxila. A liberação dos íons promove uma alcalinização do meio, sendo responsável pela desnaturação proteica e agressão à membrana plasmática dos micro-organismos. Desta forma, a dissociação iônica e a capacidade de difusão destes íons pelos túbulos dentinários são imprescindíveis à ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio. Para isso, é necessário um espaço de tempo para a ação e de proximidade do medicamento com o local de ação (LEONARDO et al., 2002). Supõe-se que o cálcio é importante para o reparo de reabsorção radicular externa, já que ativa a trifosfato de adenosina, a qual está envolvida na migração celular, diferenciação e mineralização (CALT et al., 1999). Ainda, estudos sugerem que o cálcio liberado reage com gás carbônico para formar carbonato de cálcio, sendo prejudicial a micro-organismos anaeróbios e favorecendo a mineralização. (JAVELET, TORABINEJAD e BAKLAND, 1985; KONTAKIOTIS, NAKOU e GEORGOPOULOS, 1995).

A complexidade anatômica dos canais radiculares, o local de ação do hidróxido de cálcio mostra-se como uma característica desfavorável para esta medicação, em decorrência da dificuldade de alcançar áreas de difícil acesso e que

permanecem intocadas pelo preparo biomecânico. Outra dificuldade é a resistência de alguns micro-organismos frente às medicações utilizadas, como ocorre com *Enterococcus faecalis*, que possuem mecanismos de sobrevivência ao pH alcalino (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987; EVANS et al., 2002).

As propriedades físico-químicas do hidróxido de cálcio (pH, liberação de cálcio, solubilidade) têm sido extensivamente estudadas por serem importantes no mecanismo de ação desses medicamentos (SIQUEIRA e UZEDA, 1996; LEONARDO et al, 2000; BASRANI, GHANEM e TJÄDERHANE, 2004).

Bactérias anaeróbias Gram-positivas anaeróbias facultativas, como *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* parecem ser capazes de sobreviver ao tratamento endodôntico mais facilmente do que espécies anaeróbias estritas da microbiota original (CHÁVEZ DE PAZ et al. 2003).

Recentemente, tem sido alvo de estudos a capacidade de certos micro-organismos, especialmente *Enterococcus faecalis*, de resistir a mudanças de pH extremas produzidas pela liberação de íons hidroxila de medicações intra-canal a base de hidróxido de cálcio (BYSTROM, CLAEISSON e SUNDQVIST 1985, SUKAWAT e SRISUWAN 2002). Sabe-se que *E. faecalis* pode sobreviver a um pH de até aproximadamente 11 (EVANS et al., 2002; APPELBE e SEDGLEY, 2007) e é capaz de penetrar nas camadas mais profundas dos túbulos dentinários (HAAPASALO et al., 2007). Estes micro-organismos resistentes são capazes de superar mudanças no ambiente causadas pela terapia endodôntica, como redução do suprimento de nutrientes, alterações no potencial redox dessas bactérias e influências de antimicrobianos (SUNDQVIST e FIGDOR, 2003). Porém, o conhecimento dos mecanismos que permitem aos micro-organismos permanecerem viáveis em ambientes alcalinos é escasso (SAITO e KOBAYASHI, 2003).

A presença de bactérias alcali-tolerantes na microbiota, prevalecendo mesmo após a medicação com hidróxido de cálcio, sugere que os mecanismos de sobrevivência ao estresse alcalino são parte de uma resposta adaptativa de sobrevivência. Isto pode incluir a ativação de sistemas de transporte de íons para equilibrar os níveis de pH intra-celulares e externos. De fato, tem sido observado

que a força motriz protônica é ativada em *E. faecalis* em resposta a um pH alto. (BOOTH e KROLL 1983, BOOTH 1985, EVANS et al. 2002).

A frequente descoberta de *E. faecalis* em canais radiculares associados a infecções persistentes provocou um intenso interesse em pesquisar esta bactéria. Este se tornou um organismo ideal para testar diferentes irrigantes, medicamentos e soluções antissépticas de uso endodôntico, com resultados que mostraram sua inata capacidade de sobrevivência (DAHLÉN et al., 2000; EDDY et al., 2005; PORTENIER et al., 2005). Esse grande interesse em *E. faecalis*, veio talvez devido a sua habilidade em crescer sob qualquer condição laboratorial (SIREN et al., 2004).

As bactérias da espécie *E. faecalis* foram as mais predominantemente encontradas em dentes com canal obturado e lesões periapicais em casos de fracasso endodôntico (MOLANDER et al., 1998; SUNDQVIST et al., 1998; HANCOCK et al., 2001; RÔÇAS et al., 2004; SCHIRRMESTER et al., 2009). Vários estudos demonstraram ser esse o agente infeccioso mais frequentemente associado a infecções endodônticas secundárias (SCHIRRMESTER et al., 2009) e compõe uma pequena proporção das infecções primárias (SUNDQVIST, 1992).

DISTEL, HATTON, GILLESPIE, em 2002, avaliaram se o *E. faecalis* tem capacidade de colonizar canais medicados com hidróxido de cálcio. Quarenta e seis dentes com medicação intracanal foram extraídos e observados com o microscópio eletrônico de varredura (MEV) e o microscópio confocal de varredura a laser (MCVL). Por meio de MEV observou-se colonização bacteriana em canais medicados com pastas de Ca(OH)_2 após 2 dias. Em um período de 77 dias observou-se biofilmes em canais medicados com pasta de Ca(OH)_2 . Na análise com MCVL observou-se colônias bacterianas viáveis em 2 canais medicados com pasta de Ca(OH)_2 por 86 dias, enquanto que, em 160 dias foi observado um biofilme em forma de cogumelo. Concluíram que o *E. faecalis* possui potencial para formar biofilmes em canais medicados.

Estudos anteriores com *E. faecalis* mostraram a pouca efetividade do hidróxido de cálcio contra este micro-organismo, quando se utilizou uma contaminação dentinária por 14 dias, segundo o protocolo clássico de Haapasalo; Orstavik (1987). Este protocolo de contaminação vem sendo utilizado para estudos

de substâncias com potencial antimicrobiano, como medicação intracanal e solução irrigadora (MOHAMMADI et al., 2011).

Quando usado como medicação intracanal, o hidróxido de cálcio tem sido combinado com diferentes veículos para ficar em consistência de pasta (PACIOS et al., 2004; YUCEL et al., 2007).

O hidróxido de Cálcio quando misturado com diferentes veículos tem mostrado liberar íons cálcio e hidroxila através do cimento, prevenindo assim a colonização de bactérias nas áreas apical e perirradicular (SIQUEIRA e LOPES, 1999). O veículo exerce uma importante função no processo em geral. Ele determina a velocidade de dissociação iônica, fazendo com que a pasta de hidróxido de cálcio possa ser solubilizada e reabsorvida em várias partes do canal radicular assim como nos tecidos periapicais. E isso tem uma relação direta com a concentração e atividade antibacteriana. Assim, um veículo ideal deve permitir uma liberação lenta e gradual de íons cálcio e hidroxila (FAVA e SAUNDERS, 1999).

Os veículos hidrossolúveis propiciam ao hidróxido de cálcio uma dissociação iônica rápida, permitindo maior difusão e diluição da pasta no interior do canal radicular. O tempo de permanência de 14 a 21 dias é recomendado, para os veículos viscosos, já que juntamente com os aquosos permitem dissociação mais rápida dos íons hidroxila e cálcio do que os oleosos (FERREIRA et al., 2004). Contudo, a pasta de hidróxido de cálcio veiculada a uma substância viscosa pode permanecer dentro do canal radicular por um período de 2 a 4 meses e as propriedades alcalinas do hidróxido de cálcio só vão se esgotar depois de muito tempo (FAVA, 1991). Teoricamente, o pH pode ser mantido na área durante esse período e haverá uma lenta liberação iônica (ESTRELA et al., 1995).

Vários estudos tem provado que o hidróxido de cálcio tem alta solubilidade e alcalinidade em soluções aquosas como soro fisiológico, solução de Ringer e soluções anestésicas (ESBERARD, CARNES e DEL RIO, 1996; GOMES et al., 1996).

Quando o hidróxido de cálcio é misturado com água destilada, os íons cálcio e hidroxila são rapidamente liberados. Existe um alto grau de solubilidade quando a pasta permanece em contato direto com os fluidos teciduais. Esta propriedade de

rápida liberação é desejável em situações clínicas que requerem uma desinfecção entre sessões a curto prazo (GROVER e SHETTY, 2014).

O propilenoglicol tem demonstrado ação antibacteriana, sua natureza higroscópica junto com seu alto peso molecular faz desta substância um veículo ideal para preparos farmacêuticos (FAVA e SUNDER, 1999) e quando usado em concentrações acima de 20%, tem demonstrado forte ação antibacteriana contra micro-organismos comumente encontrados nos canais radiculares (SAFAVI e NAKAYAMA, 2000). Outra vantagem é a consistência do propilenoglicol, a qual facilita a manipulação da pasta (SIMON et al., 1995). SIMON et al. (1995), recomendaram o propilenoglicol como o melhor veículo para o preparo da pasta de hidróxido de cálcio, pois induz uma liberação de íons cálcio e hidroxila mais favorável em comparação com outros veículos. O propilenoglicol ainda não tem efeito irritante sobre os tecidos (BHAT e WALVEKAR, 1975; BYSTROM, CLAEISSON e SUNDQVIST, 1985; FAVA e SUNDER, 1999; BEHNEN et al., 2001; GOMES et al., 2001).

CRUZ et al. (2002) compararam propilenoglicol e água destilada como veículos para pasta de hidróxido de cálcio e observaram que com o propilenoglicol, a pasta passou através do canal radicular principal e através do forame apical com relativa facilidade, enquanto que com água destilada a passagem através do forame apical foi lenta, ou mesmo falhou. Dessa maneira, existe possivelmente uma maior facilidade de penetração nos túbulos dentinários, quando utilizado propilenoglicol como veículo, provavelmente devido a sua menor tensão superficial, permitindo maior penetração de íons. A água destilada também é um veículo comumente utilizado em medicamentos intracanal e consiste em uma substância com viscosidade e tensão superficial elevada.

Porém, deve-se ressaltar que as pastas de hidróxido de cálcio, tanto com água destilada como em propilenoglicol, favorecem extremamente pHs extremamente alcalinos quando colocados diretamente em solução. O mesmo fato não ocorre quando elas são colocadas dentro do canal radicular (WANG e HUME, 1988; NERWICH, FIGDOR e MESSER, 1993).

Também com o objetivo de potencializar a ação do hidróxido de cálcio, algumas substâncias tem sendo acrescentadas e estudadas, dentre elas a clorexidina (GOMES et al., 2006), a própolis (MATTIGATTI et al., 2012, MONCLA et al., 2012) e outras (KANDASWAMY et al., 2010) com potencial anti-inflamatório e antimicrobiano.

A própolis é uma resina extraída e processada pelas abelhas de diferentes espécies de plantas para proteção da colméia contra fungos, bactérias e insetos e sua composição depende não só da planta da qual foi extraída, mas também do clima da região (IKENO, IKENO e MIYAZAWA, 1991; PARK et al., 1998; KOO et al., 1999; 2002).

Esse fitoterápico tem sido usado na medicina popular por milhares de anos por ser considerado um dos mais naturais e efetivos produtos descobertos até agora. Na odontologia, tem sido usada para controlar a microbiota oral, por exemplo, em dentifrícios (GHISALBERT, 1979). É uma substância escura, lipofílica, dura e quebradiça quando resfriada, mas macia, plástica e adesiva quando aquecida e que possui um aroma agradável e cor variável, de acordo com sua origem. É composta por 50% de resinas, 40% de cera e até 10% de substâncias voláteis, sendo a porção resinosa composta principalmente por substâncias fenólicas, tais como flavonóides, ácidos e ésteres e ainda outras substâncias como ácido benzóico, álcool benzil, ácido sórbico e vanilina, e na parte volátil, eugenol, esteróides e outros. No entanto, a presença de aldeídos em sua composição (benzaldeído, vanilina) não está relacionado a potencial mutagênico, já que estudos comprovam o efeito citostático dos seus extratos sobre células tumorais, tanto em cultura quanto em animais (MARCUCCI, 1995).

As propriedades anti-inflamatórias da própolis já foram registradas agindo contra infecções, reumatismos, torções musculares e doenças das articulações, além de outros tipos de inflamações (MARCUCCI, 1995; BRETZ et al., 1998). Além disso, sua ação antibacteriana e anti-inflamatória promove uma reorganização nos tecidos (MARCUCCI, 1995) e é efetivo contra patógenos endodônticos (BRETZ et al., 1998; FERREIRA et al., 2007; KAYAOGLU et al., 2011; MADHUBALA, SRINIVASAN e AHAMED, 2011).

Sua ação decorre da composição rica em ésteres bioativos e derivados do ácido cinâmico. É um extrato rico em enzimas inibidoras da fosfolipase A2 e quando veiculada em álcool, promove inibição da enzima hialuronizante, que são responsáveis por diversas reações inflamatórias. No entanto, em estudo para comparar o extrato de própolis com o Otosporin, os resultados demonstraram que a própolis tem excelente ação para controlar a fase aguda do processo inflamatório, já que seu pico de ação ocorre após três horas, diminuindo gradualmente com o tempo, e da ação anti-exsudativa após uma hora, demonstrando que é pouco efetiva sobre as prostaglandinas, mediadores da fase tardia da inflamação e responsáveis por muitas reações teciduais (SILVA; ALMEIDA; SOUSA, 2004).

A composição química da própolis é ricamente variada: mais de 200 substâncias tem sido identificadas nas diferentes variedades de própolis de diferentes regiões geográficas, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides, ésteres, aldeídos aromáticos, alcoóis, amino-acidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais (GONSALES et al., 2006). Deve-se enfatizar a presença dos flavonóides e ácidos fenólicos que são os grandes responsáveis pela atividade biológica da própolis (GONSALES et al., 2006; MORI et al., 2010). Devido às propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias da própolis, tem sido sugerida sua associação com o hidróxido de cálcio como medicação intra-canal (DE REZENDE et al., 2008).

MONTERO e MORI (2012) concluíram que a pasta de hidróxido de cálcio com própolis foi capaz de se difundir através dos túbulos dentinários e atingir a superfície radicular externa. E que a consistência viscosa da própolis provavelmente favoreceu esse nível de difusão. Também, que os componentes da solução com própolis não prejudicaram ou impediram a dissociação iônica do hidróxido de cálcio.

O digluconato de Clorexidina pode ser usado na endodontia como irrigante ou como medicação intra-canal devido a sua biocompatibilidade e amplo espectro de ação antimicrobiana (ESTRELA et al., 2003; EVANOV et al., 2004). A propriedade antimicrobiana da clorexidina é atribuída a sua molécula catiônica, que é absorvida para as células do interior da membrana da parede celular do micro-organismo carregadas negativamente, resultando no escoamento dos componentes intracelulares deste. É um agente efetivo contra bactérias Gram-positivas e Gram-

negativas (JEANSONNE e WHITE, 1994), e também a micro-organismos resistentes ao hidróxido de cálcio (SIQUEIRA et al., 1998).

A substantividade da clorexidina é sua propriedade mais desejável. Como se conecta a hidroxiapatita da dentina possui efeito antibacteriano a longo prazo (MCKENNA e DAVIES, 1988).

Em baixas concentrações, a clorexidina tem efeito bacteriostático, e em altas concentrações, efeito bactericida devido a precipitação e/ou coagulação dos constituintes intra-celulares. Tem ótima atividade antimicrobiana em pH de 5,5 a 7,0 (RUSSELL e DAY, 1993).

A associação da clorexidina com o hidróxido de cálcio pode melhorar a atividade antimicrobiana desta substância, sem interferir nas propriedades biológicas do hidróxido de cálcio (FERRAZ et al, 2001; BASRANI et al, 2002; GOMES et al, 2003, 2006, TERVIT et al, 2009). Esta associação tem sido pesquisada como medicação intracanal, mostrando ação antimicrobiana, reparo e atividade efetiva nas endotoxinas presentes nos canais radiculares (GOMES et al, 2003; SOARES et al, 2006). Contudo, outros estudos tem falhado em mostrar algum benefício nesta associação (ALMYROUDI et al., 2002; SUKAWAT e SRISUWAN, 2002; LYNNE et al., 2003; SCHAFER e BOSSMANN, 2005). Parece que a utilidade em misturar Hidróxido de Cálcio e Clorexidina ainda é um assunto pouco claro e controverso (METZGER et al., 2011).

Quando usada como medicação intracanal, a clorexidina é mais eficaz que o hidróxido de cálcio em túbulos dentinários contaminados com *E. faecalis* (ALMYROUD et al., 2002; BASRANI et al., 2003; GOMES et al., 2009). De fato, a atividade antimicrobiana da clorexidina é reduzida quando combinada com outras substâncias, incluindo hidróxido de cálcio e hidróxido de cálcio com óxido de zinco, entre outros (CURY et al., 2000; GOMES et al., 2003; GOMES et al., 2009; DE SOUZA-FILHO et al., 2008). Para uso endodôntico, a clorexidina pode ser usada nas formas líquida ou em gel (FERRAZ et al., 2001; FERRAZ et al., 2007).

Outra maneira bastante utilizada para aumentar o espectro de ação antimicrobiano da pasta de Hidróxido de Cálcio, deixando-a, assim, eficaz contra espécies resistentes, é a sua combinação com o paramonoclorofenol canforado

(SIQUEIRA e UZEDA, 1996; SIQUEIRA e UZEDA, 1997; SIREN et al., 2004). A associação de hidróxido de cálcio com PMCC foi sugerida por Kaiser (1964) e usada por Frank (1966) e mostrou manter um alto pH, sendo assim tóxico para bactérias e ainda favorecer a mineralização tecidual devido a ativação da enzima hidrolítica fosfatase alcalina (BHAT e WALVEKAR, 1975; BYSTROM, CLAEISSON e SUNDQVIST 1985; GOMES et al., 2001; BEHNEN et al., 2001).

A toxicidade do fenol, fenol canforado e monoclórofenol canforado foi avaliada por Soekanto et al. (1996), que confirmou a citotoxicidade desses antissépticos. Eles são, portanto, irritantes para os tecidos periapicais (SOEKANTO et al., 1996), quando usados isoladamente, mas tem sido observados resultados de biocompatibilidade satisfatórios da associação do paramonoclórofenol canforado com o hidróxido de cálcio (GRECCA et al., 2001; SILVEIRA et al., 2007). Essa biocompatibilidade provavelmente se deve a lenta liberação de paramonoclórofenol (PMC) da pasta, ao efeito desnaturante do hidróxido de cálcio nos tecidos circundantes, que pode prevenir penetrações mais profundas do PMC nesses tecidos, reduzindo sua toxicidade. E ainda, devido ao efeito antimicrobiano da pasta, permite um reparo natural sem que ocorra uma irritação infecciosa persistente (RÔÇAS et al., 2006).

A pasta de hidróxido de cálcio com PMCC tem ação antimicrobiana em maior raio, eliminando micro-organismos localizados em regiões mais distantes da região ao redor de onde a pasta foi aplicada, e mata bactérias mais rapidamente do que as misturas de hidróxido de cálcio com veículos inertes como água destilada, soro fisiológico e glicerina (SIQUEIRA e UZEDA, 1996; SIQUEIRA e UZEDA, 1998; SUKAWAT e SRISUWAN, 2002).

Embora a associação do hidróxido de cálcio com veículos inertes possa matar bactérias rapidamente quando em contato direto, esse efeito não é expressado no ambiente do canal radicular, no qual o contato direto com as bactérias não seja sempre alcançado ou, devido a baixa solubilidade do hidróxido de cálcio, a concentração de íons hidroxila não alcance níveis suficientemente altos para matar bactérias no biofilme, túbulos dentinários, irregularidades ou outras variações anatômicas, ou em paredes do canal que não foram atingidas em nenhum momento durante a terapia endodôntica (RÔÇAS et al., 2006). Essas limitações

físico-químicas e os registros de resistência de alguns micro-organismos (BYSTROM et al., 1985; SIQUEIRA e UZEDA, 1996) tem estimulado o uso da associação do hidróxido de cálcio com outros antissépticos/desinfetantes, como o PMCC (RÔÇAS et al., 2006).

Em um estudo realizado por Siqueira et al. (2008) foi investigado o resultado a longo prazo do tratamento endodôntico com um protocolo antimicrobiano definido, em dentes com lesão periapical. Quando a efetividade antimicrobiana do protocolo foi testada em um experimento clínico, em 54,5% dos casos resultaram em culturas positivas após o preparo químico-mecânico, mas esse número abaixou para 9% após 1 semana em que os dentes ficaram com a pasta de Hidróxido de Cálcio e PMCC como medicação intracanal.

Para avaliar os efeitos antimicrobianos e outras propriedades de diferentes medicações entre sessões e outros antissépticos no interior do canal radicular, alguns métodos já foram estabelecidos na literatura.

Haapasalo; Orstavik estabeleceram em 1987 um método que permitia a contaminação intratubular, possibilitando o estudo de atividade antimicrobiana com maior realismo. Para isso, utilizaram dentes incisivos bovinos padronizados em tubos de 4mm de extensão, com 6mm de diâmetro externo e 2,3 mm de diâmetro interno. A contaminação foi realizada com *E. faecalis* por período de 21 dias e comprovada pela microscopia eletrônica de varredura.

Para avaliar o efeito antibacteriano residual de três diferentes soluções irrigadoras Mohammadi et al.(2012) contaminaram por 14 dias, tubos de dentina bovina, com *Enterococcus faecalis*. Após a contaminação e ação dos agentes irrigantes, eram obtidas raspas de dentina através de brocas esféricas e essas caíam em um caldo de soja tríptico e após a cultura, as unidades formadoras de colônia (UFC) eram contadas.

Utilizando 23 blocos de dentes humanos, Dianat et al. (2015) avaliaram o efeito antimicrobiano de nanopartículas de hidróxido de cálcio e do hidróxido de cálcio sobre *Enterococcus faecalis*. Realizaram tal avaliação por meio da concentração mínima inibitória dos medicamentos e o teste de difusão em ágar.

Eddy et al. (2005), avaliaram a habilidade de 4 agentes irrigantes em eliminar *Enterococcus faecalis* dos tubulos dentinários de incisivos bovinos. Foram feitos a partir destes dentes bovinos, discos padronizados que foram preenchidos com Brain Heart Infusion (BHI) contendo *E. faecalis* (1.0×10^6 UFC/mL). Após a descontaminação com os irrigantes a serem testados, os discos eram semeados em placas de BHI e as unidades formadoras de colônia (UFC) eram contadas.

Com o intuito de prevenir infecção e recolonização bacteriana no canal radicular e túbulos dentinarios, Assouline et al. (2001) avaliaram dois adesivos dentinários em espécimes radiculares cilíndricos obtidos a partir de dentes bovinos. Após serem tratados com os adesivos testados, os espécimes foram contaminados com *E. faecalis* e incubados em Brain Heart Infusion por 21 dias. Foram obtidas raspas de dentina das amostras com brocas, estas raspas foram inoculadas em placas de ágar e a presença de bactérias vivas foi analisada contando as unidades formadoras de colônia.

Utilizando um protocolo de centrifugação para amostras contendo inóculo de *E. faecalis* na concentração de 3×10^6 UFC/mL, Ma et al. (2011) utilizaram apenas 24h para induzir biofilme na superfície das amostras e promover a contaminação intratubular. As amostras confeccionadas a partir de dentes humanos unirradiculados foram padronizadas em 4 mm de comprimento e 1,5mm de diâmetro interno (Gates Glidden 6) e seccionadas para possibilitar a formação de biofilme na superfície interna da dentina. Os resultados analisados por microscopia confocal de varredura a laser demonstraram bom padrão de contaminação. Uma restrição do modelo experimental utilizado foi a pouca fidelidade à infecção endodôntica real (ambiente oral), já que o modelo adotado foi seccionado, facilitando a penetração do micro-organismo no interior dos túbulos dentinários interna e externamente (Ma et al., 2011).

A viabilidade das bactérias é convencionalmente definida como sendo a capacidade das células de realizarem as funções celulares necessárias para sobreviver sob determinadas condições (BREEUWER e ABEE, 2000). O método mais simples comumente utilizado para determinar tal viabilidade é o método de

contagem em placa, onde o número de células viáveis se aproxima do número de unidades formadoras de colônia (CHÁVEZ et al., 2006).

Zapata et al., em 2008, avaliaram o potencial da microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) para a identificação, *in situ*, de biofilmes de *E. faecalis* viáveis e não viáveis em dentina infectada. Oito blocos de dentina bovina foram contaminados com *E. faecalis* em BHI por 21 dias. Após o período experimental, os espécimes foram corados com Diacetato de Fluoresceína (FDA), iodeto de propídio e Laranja de Acridina (0,01%) e analisados com MCVL. Dois espécimes não infectados foram usados como controles negativos. As amostras coradas com FDA/PI e analisadas com o MCVL mostraram uma discriminação entre as bactérias viáveis e não viáveis nos túbulos dentinários contaminados. A laranja de acridina mostrou a atividade metabólica das células de *E. faecalis* dentro dos túbulos dentinários, identificados por sua fluorescência vermelha.

O kit LIVE/DEAD testa a integridade da membrana celular bacteriana pela aplicação de dois corantes de ácido nucleico, SYTO-9 e iodeto de propídio, que podem simultaneamente detectar células intactas (verde fluorescente pelo corante SYTO-9) e células mortas/danificadas (vermelho fluorescente pelo corante iodeto de propídio). E com a análise em um microscópio confocal de varredura a laser se obtém a imagem das células coradas e fluorescentes proporcionando uma correlação direta entre as partículas fluorescentes e as unidades formadoras de colônia (BOULOS et al., 1999; LEUKO ET AL., 2004). Essa sonda fluorescente tem sido usada para avaliar *ex vivo* a viabilidade de cepas do canal radicular (CHÁVEZ et al., 2006) e determinar a auto-agregação e co-agregação de bactérias isoladas de dentes com infecções endodônticas agudas (KHEMALEELAKUL et al., 2006). Desta forma, é possível não só visualizar como também quantificar a viabilidade bacteriana.

Andrade et al. (2015) desenvolveram um protocolo de contaminação intratubular com *Enterococcus faecalis*, adaptado da metodologia de Ma et al., (2011) que proporciona resultados mais confiáveis. Este protocolo é realizado em 5 dias de contaminação e demonstrou contaminar com o micro-organismo traçador até mesmo os túbulos dentinários mais profundos. O protocolo desenvolvido foi realizado a partir da repetição de metodologias anteriores (HAAPASALO;

ORSTAVIK, 1987; MA et al., 2011), que geraram resultados insatisfatórios para o modelo experimental e formas de análise adotadas. O protocolo desenvolvido para este trabalho mostrou um padrão de contaminação superior, avaliado por microscopia confocal de varredura a laser e o kit LIVE/DEAD.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Verificar a possível potencialização da ação antimicrobiana intra-dentinária do hidróxido de cálcio quando associado aos veículos propilenoglicol e água destilada, e os aditivos extrato etanólico de própolis (EEP), clorexidina e paramonoclorofenol canforado (PMCC) em tubos de dentina contaminados com *Enterococcus faecalis*, por meio de cultura microbiológica e microscopia confocal de varredura a laser (MCVL).

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Foram obtidas cepas bacterianas de referência de *Enterococcus faecalis* catalogada com o número de registro da American Type Culture Collection (ATCC) 29212. Foi realizada verificação da morfologia colonial em placas de Petri e coloração de Gram, para confirmar a pureza das cepas.

Os micro-organismos foram cultivados em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Detroit, Michigan, EUA), os quais passaram por crescimentos sucessivos. Foram feitas diluições baseadas no valor de absorbância, obtido pela turvação medida no espectrofotômetro SF325NM (Bel Photonics do Brasil Ltda, Osasco, São Paulo, Brasil) e relacionada com a escala de MacFarland até atingir a concentração adequada.

4.2 Antimicrobianos

Foram utilizados como antimicrobianos o hidróxido de cálcio veiculado em água destilada e propilenoglicol, e também adicionado de extrato etanólico de própolis, clorexidina e paramonoclorofenol canforado.

Foram utilizados 21 dentes para cada grupo, sendo 10 submetidos à avaliação por cultura microbiológica, 6 por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) para avaliar a ação antimicrobiana das pastas e 5 para avaliar a penetrabilidade das pastas. Os grupos foram distribuídos conforme as medicações como se segue:

G1- Hidróxido de Cálcio + água destilada.

G2- Hidróxido de Cálcio + propilenoglicol.

G3- Hidróxido de Cálcio + propilenoglicol + Extrato Etanólico de Própolis (EEP).

G4- Hidróxido de Cálcio + propilenoglicol + Clorexidina.

G5- Hidróxido de Cálcio + propilenoglicol + Paramonoclorofenol Canforado (PMCC).

Os controles negativos foram representados por dentes esterilizados, sem contaminação e com os respectivos medicamentos dos grupos. Os controles positivos foram dentes contaminados, sem presença de medicação. Havia dois espécimes destinados ao controle positivo, e dois ao controle negativo por grupo, tanto na avaliação por MCVL quando na avaliação por cultura microbiológica.

4.2.1 Hidróxido de Cálcio P.A.

-Hidróxido de cálcio P.A. (Biodinâmica, Londrina, PR, Brasil).

4.2.2 Extrato etanólico de própolis a 10% (EEP)

- O extrato etanólico de própolis foi obtido a partir de 50 gramas da própolis verde bruta (sólida). Esta foi acondicionada em um extrator Soxhlet, utilizando-se etanol à ebulição. O extrato foi resfriado e a cera retirada por filtração com etanol gelado. O filtrado foi concentrado, em um evaporador rotativo, obtendo-se desta forma o extrato mole, ou extrato etanólico de própolis (EEP). O procedimento de extração foi realizado na Universidade Bandeirante – UNIBAN – São Paulo, sendo gentilmente cedido pela Prof^a Dr^a Maria Cristina Marcucci Ribeiro.

Foi obtida a concentração de EEP a 10% em balão volumétrico, diluindo o mesmo em propilenoglicol. O extrato de própolis utilizado foi submetido à análise de cromatografia líquida de alta resolução, também na UNIBAN, para observação de seus constituintes.

4.2.3 Clorexidina - Clorexidina líquida a 2,0% (Biodinâmica, Londrina, PR, Brasil).

4.2.4 Paramonoclorofenol Canforado

- Paramonoclorofenol Canforado (Biodinâmica, Londrina, PR, Brasil).

4.3 Tubos de dentina

Para confecção dos tubos de dentina foi utilizada a metodologia proposta por Haapasalo; Orstavik (1987) com modificações. Os blocos de dentina foram confeccionados a partir de dentes incisivos bovinos recém-extraídos. Estes ficaram imersos por 12 horas em solução de hipoclorito de sódio a 1% para desinfecção superficial. Em seguida os dentes foram levados a máquina de corte (Isomet, Buehler, IL, EUA) com refrigeração para remoção da coroa dentária e dos 5mm apicais e foram cortados em blocos de 12 mm de altura.

Os espécimes, agora em forma de tubos, foram então instrumentados com limas endodônticas até o diâmetro 1,2mm (instrumento k#120) para padronização inicial do canal radicular. Os tubos de dentina com canal radicular de diâmetro superior a 1,2mm eram descartados, o mesmo ocorria com espécimes onde esse diâmetro não era alcançado.

Em seguida os tubos de dentina foram imersos em hipoclorito de sódio a 1% e passaram por um banho ultrassônico por 10 minutos, depois submetidos a outros dois banhos ultrassônicos de 10 minutos cada, sendo um com os espécimes imersos em EDTA e o outro banho, imersos em soro fisiológico para desinfecção e remoção de smear layer. Foi realizada então, a impermeabilização na superfície externa dos tubos por uma dupla camada de esmalte de unha vermelho (Colorama, L'OREAL BRASIL COSMÉTICOS DE COSMÉTICOS LTDA., Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil). Esses foram esterilizados em autoclave a 121°C por 24 minutos dentro de microtubos de 2 mL, mantidos hidratados com soro fisiológico esterilizado (Figuras 1).

Figura 1 – A. Incisivo bovino, do qual a coroa e os 5 mm apicais são removidos. B. Tubo de dentina já impermeabilizado. C. Espécimes nos microtubos prontos para esterilização.

4.4 Protocolo de contaminação

Os blocos de dentina esterilizados foram inseridos em meio de cultura BHI e submetidos a um banho ultrassônico durante 15 minutos para hidratar as amostras e possibilitar a penetração máxima do meio de cultura nos túbulos dentinários.

Em seguida foi realizada a contaminação com o micro-organismo traçador (cepa de referência *Enterococcus faecalis* ATCC – American Type Culture Collection (número 29212), por um período de cinco dias com trocas de forma asséptica e periódica, além de centrifugações seguindo o protocolo desenvolvido na Endodontia da FOB-USP (ANDRADE et al., 2015) adaptado de Ma et al. (2011). A pureza da cultura foi confirmada pela semeadura em placas de ágar BHI e coloração de Gram.

O procedimento se iniciou com a execução de culturas sucessivas a partir da cepa congelada, primeiramente para um tubo de ensaio com 3 mL de meio de cultura BHI. Este ficou por 24 horas em estufa bacteriológica (Estufa Modelo 502-42L, Fanem, SP, Brasil) a 37°C e após esse período um frasco com meio de cultura foi contaminado a partir do conteúdo do tubo de ensaio, e esse frasco ficou por 24 horas em estufa..

No primeiro dia de contaminação um inóculo foi padronizado a uma concentração de 3×10^8 UFC/mL baseado na absorbância do meio de cultura com proliferação microbiana no frasco contaminado 24 horas antes. Este meio de cultura foi medido em espectrofotômetro e comparado à escala de MacFarland.

Este inóculo de *Enterococcus faecalis* foi armazenado em estufa 37°C por 7 horas, com volume calculado, para que o micro-organismo estivesse na fase de crescimento exponencial durante a contaminação das amostras.

Decorridas essas 7 horas, o meio de cultura BHI utilizado para banho ultrassônico dos espécimes foi removido e descartado e 1mL do inóculo de *Enterococcus faecalis* que passou por 7 horas em estufa foi colocada sobre os espécimes no interior dos microtubos (Eppendorf, Hauppauge, NY, EUA). Os microtubos contendo os espécimes com o inóculo foram levados à centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5417R, NY, EUA), seguindo o protocolo de centrifugação proposto por Ma et al. (2011). Este protocolo prevê a centrifugação em quatro

velocidades (1400g, 2000g, 3600g, 5600g), por duas vezes em cada uma destas por 5 minutos a 25°C.

Entre cada centrifugação o inóculo era renovado. Após os 8 ciclos de centrifugações uma solução esterilizada de BHI foi colocada nos microtubos contendo as amostras que eram então mantidas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

Após 24 horas da última centrifugação, a solução turva dos microtubos foi removida. Um mL de BHI esterilizado foi dispensado nas amostras, seguida de um ciclo de centrifugação a 3600g, por 5 minutos a 25°C e novamente armazenadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

O terceiro dia iniciou-se com a confecção de um novo inóculo e após 7 horas na estufa o protocolo de contaminação e centrifugação foi realizado de maneira idêntica àquele realizado no 1º dia. Após 24 horas em estufa bacteriológica a 37°C, o meio de cultura foi trocado e as amostras foram novamente armazenadas, de modo idêntico ao 2º dia.

Após este período os blocos de dentina foram irrigados com EDTA, soro fisiológico e ficaram prontos e contaminados o suficiente para receberem a medicação intracanal.

4.5 Medicação Intracanal

Após o período de contaminação os tubos de dentina receberam a medicação intracanal de hidróxido de cálcio associado a água destilada (Grupo 1), propilenoglicol (Grupo 2), extrato etanólico de própolis (Grupo 3), clorexidina (Grupo 4) e PMCC (Grupo 5).

As pastas foram preparadas em uma proporção de 2:1 (duas partes de hidróxido de cálcio para uma de veículo), ou 3:1:1 (3 partes de hidróxido de cálcio para uma de veículo e uma de aditivo). Todos os aditivos foram veiculados na pasta com propilenoglicol e a pasta de hidróxido de cálcio com água destilada foi utilizada

como controle. As pastas foram inseridas no canal radicular com limas de diâmetro 0,9 mm (instrumento k#90), e o preenchimento do canal foi assegurado pelo extravasamento da pasta nas duas extremidades do canal.

A medicação permaneceu nos espécimes por um período de 15 dias, armazenados em estufa a 37°C.

Os tubos de dentina foram armazenados na estufa dentro de microtubos contendo 1 mL de água destilada esterilizada. Esta opção foi escolhida através de um estudo piloto, a fim de saber em que modo de armazenamento poderia haver maior viabilidade para as bactérias presentes nos espécimes, durante o longo período de 15 dias. Para o estudo piloto, dez tubos de dentina bovina foram obtidos e contaminados conforme descrito acima. E após o período de contaminação esses tubos foram então selados em suas extremidades com o cimento coltosol (Vigodent Coltene, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) e colocados em microtubos. A fim de avaliar a melhor condição de armazenamento dos tubos para manutenção das bactérias viáveis no período desejado esses dez tubos foram divididos em cinco grupos que foram:

- Grupo 1 – tubos de dentina armazenados em microtubos vazios;
- Grupo 2 – tubos de dentina armazenados em microtubos contendo água destilada esterilizada em uma quantidade que não tocasse o espécime;
- Grupo 3 – tubos de dentina armazenados em microtubos contendo água destilada esterilizada em uma quantidade que chegasse até a metade do espécime;
- Grupo 4 - tubos de dentina armazenados em microtubos contendo água destilada esterilizada em uma quantidade que chegasse até a extremidade superior do espécime;
- Grupo 5 - tubos de dentina armazenados em microtubos contendo água destilada esterilizada em uma quantidade que cobrisse totalmente o espécime.

Foram então armazenados em estufa bacteriológica a 37°C por 15 dias, e após esse período foram corados por um período de 20 minutos com 30µL de LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Este kit contém o corante verde SYTO®9 e o corante vermelho iodeto de propídio, corando assim, as bactérias vivas e mortas respectivamente.

Os espécimes foram visualizados no MCVL Leica TCS-SPE (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha) obtendo-se imagens de terço cervical e médio de modo sequencial. O escaneamento foi realizado com a objetiva de 40X, a cada 1µm de profundidade. As imagens foram adquiridas através do programa Leica Application Suite-Advanced Fluorescence (LAS AF, Leica Mannheim, Alemanha) e levadas ao software Leica LAS AF Lite para fragmentação das camadas de cada imagem. No programa bioImager v2-1 (CHÁVEZ DE PAZ, 2009) as bactérias vivas e mortas foram quantificadas, através da fluorescência verde (viva) e vermelha (morta) emitida pelas mesmas nas imagens avaliadas.

As análises demonstram que, de acordo com a viabilidade bacteriana detectada nas imagens, os espécimes totalmente imersos em água destilada esterilizada tiveram um maior número de bactérias viáveis (Figura 2).

Figura 2 – Imagem da dentina contaminada de um espécime que ficou por 15 dias totalmente imerso em água destilada.

4.6 Análise no Microscópio Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

Os outros tubos de dentina bovina contaminados (n=5), após remoção das medicações, foram seccionados longitudinalmente com o auxílio de disco diamantado de precisão (Erios, São Paulo, Brasil) em máquina de corte sob refrigeração. Em seguida, foram colocados em placa de cultura celular de 24 poços, para remoção da *smear layer* decorrente do corte longitudinal do dente, com EDTA a 17% durante 3 minutos. Posteriormente foram lavados com 500µL de soro fisiológico esterilizado. Na sequência, os espécimes foram corados por um período de 20 minutos com 30µL de LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Este kit contém o corante verde SYTO®9 e o corante vermelho iodeto de propídio, corando assim, as bactérias vivas e mortas respectivamente.

Os espécimes foram visualizados no MCVL Leica TCS-SPE (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha) obtendo-se imagens de terço cervical e médio de modo sequencial. O escaneamento foi realizado com a objetiva de 40X, a cada 1µm de profundidade. As imagens foram adquiridas através do programa Leica Application Suite-Advanced Fluorescence (LAS AF, Leica Mannheim, Alemanha) e levadas ao software Leica LAS AF Lite para fragmentação das camadas de cada imagem. No programa bioImager v2-1 (CHÁVEZ DE PAZ, 2009) as bactérias vivas e mortas foram quantificadas, através da fluorescência verde (SYTO®9) e vermelha (iodeto de propídio) respectivamente, emitida pelas mesmas nas imagens avaliadas.

4.7 Cultura Microbiológica

Em dez tubos de dentina de cada grupo, a medicação foi removida com soro fisiológico e com agentes neutralizantes para que não continuasse fazendo efeito. Para neutralizar o hidróxido de cálcio foi utilizado ácido cítrico a 0,5% (DELGADO et al, 2013; WANG et al, 2007) e para neutralizar a clorexidina foi utilizado Tween 80 (Laboratório de Bioquímica, Faculdade de Odontologia de Bauru, USP) e Lecitina de soja a 0,3% (Specífica, Bauru, São Paulo, Brasil). Os tubos de dentina foram secados com papel absorvente esterilizado. As amostras para cultura microbiológica

foram extraídas dos blocos de dentina com o auxílio de brocas de Largo de números 5 e 6 (Microdont, São Paulo, Brasil). As raspas obtidas foram dispensadas imediatamente em microtubos com caldo BHI, agitadas, diluídas e semeadas (50 µL) em placas de ágar BHI. Todas as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas, para que fosse possível a contagem das unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

As raspas obtidas com a broca de Largo 5, corresponderam à região mais superficial da dentina radicular em relação à luz do canal, onde a medicação havia sido colocada. Já as raspas obtidas com a broca número 6, corresponderam à contaminação presente ou ausente na porção mais profunda da massa dentinária em relação à luz do canal.

Todos os procedimentos envolvendo cultura microbiológica foram realizados dentro de câmara de fluxo laminar, evitando a contaminação das culturas e do ambiente.

4.8 Avaliação da penetrabilidade das pastas por MCVL

Para o teste da penetrabilidade dos curativos, 05 dentes de cada grupo foram preparados da mesma forma como nas avaliações anteriores, porém sem contaminação bacteriana, e receberam a medicação dos cinco grupos adicionada do corante rodamina B a 0,1%, permanecendo no canal durante um período de 15 dias. Após a remoção da medicação intracanal com soro fisiológico e secagem com pontas de papel absorvente esterilizadas, os blocos foram cortados transversalmente em máquina de corte refrigerada a 200rpm, nas alturas de 3mm e 5 mm da borda mais apical e levadas para exame em um microscópio confocal invertido Leica TCS-SPE (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha).

As imagens foram adquiridas utilizando o programa Leica Application Suite-Advanced Fluorescence *software* (LAS AF, Leica Mannheim, Alemanha). E foi utilizado o programa ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, USA) para medir o perímetro total dos canais radiculares dos espécimes e o perímetro em que houve penetrabilidade da medicação, obtendo assim a porcentagem de penetração de

cada uma. O objetivo neste teste foi assegurar se os veículos e as substâncias melhoram a sua penetrabilidade nos túbulos dentinários.

4.9 Análise Estatística

A análise estatística para ambas metodologias foi realizada utilizando testes comparativos de análise de variância seguidos pelo teste de Tukey, ou quando os resultados não foram paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn, com nível de significância de 5%.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (MCVL)

As análises por MCVL demonstraram que, de acordo com a viabilidade bacteriana detectada nas imagens, em geral, o grupo G1, hidróxido de cálcio em água destilada, mostrou maior porcentagem de bactérias vivas, porém mostrou diferença estatisticamente significativa somente com o grupo G5, em que o PMCC foi usado como aditivo ($p = 0,01$).

Assim, o grupo G5 teve menor porcentagem de bactérias viáveis, seguidos pelos grupos G2 (hidróxido de cálcio veiculado em propilenoglicol), G3 (hidróxido de cálcio veiculado em propilenoglicol com EEP a 10%), G4 (hidróxido de cálcio veiculado em propilenoglicol com clorexidina) e G1 (hidróxido de cálcio veiculado em água destilada).

Gráfico 1: Mediana da porcentagem de bactérias vivas por μm^3 , após medicação intracanal durante 15 dias através de microscopia confocal de varredura à laser.

Quando os grupos foram comparados nos terços cervical e médio isoladamente, observou-se maior eficácia das pastas no terço cervical. O grupo G5 alcançou melhor desempenho nos dois terços, e o grupo com água destilada (G1) o pior. Porém no terço cervical o grupo G4, em que a clorexidina a 2% foi usada como aditivo, houve melhor desempenho que o grupo G3, em que o EEP a 10% foi usado como aditivo. Diferente do que aconteceu no terço médio em que o grupo G3, em

que o EEP foi usado como aditivo, foi mais eficaz que o grupo G4. O grupo com hidróxido de cálcio e propilenoglicol somente (G2) teve melhor desempenho que os grupo G1, G3 e G4 nos dois terços. Houve diferença estatisticamente significativa somente na comparação entre cada grupo e os controles positivos (Gráficos 2 e 3).

Terço Cervical

Gráfico 2 – Mediana da porcentagem de bactérias vivas por μm^3 no terço cervical, após medicação intracanal dos diferentes grupos durante 15 dias.

Terço Médio

Gráfico 3 – Mediana da porcentagem de bactérias vivas por μm^3 no terço médio, após medicação intracanal dos diferentes grupos durante 15 dias.

Ao comparar a ação das pastas em regiões de profundidades diferentes na massa dentinária do canal radicular apenas no terço cervical na região superficial (A), a pasta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol mostrou uma menor quantidade de bactérias vivas enquanto na região profunda (B), a pasta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol e o aditivo PMCC mostrou menor quantidade de bactérias vivas.

Na região A, a pasta que mostrou maior quantidade de bactérias vivas foi a do grupo G1(somente com água destilada) seguida pelas pastas dos grupos G3, G4 e G5. Enquanto na região B, a pasta do grupo G3 permitiu maior quantidade de bactérias vivas. Esta, na região B, teve desempenho muito semelhante a pasta do grupo G2. Houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos e os controles positivos (Gráficos 4 e 5).

Terço Cervical – Região Superficial

Gráfico 4 – Mediana da porcentagem de bactérias vivas por μm^3 nas região superficial do terço cervical do canal radicular, após medicação intracanal durante 15 dias.

Terço Cervical – Região Profunda

Gráfico 5 – Mediana da Porcentagem de bactérias vivas por μm^3 nas região profunda do terço cervical do canal radicular, após medicação intracanal durante 15 dias.

No terço médio, a pasta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol e PMCC (G5) exerceu melhor desempenho tanto na região superficial (A) quanto na profunda (B). E no grupo G1(pasta de hidróxido de cálcio com água destilada) houve um maior número de bactérias vivas comparado com os outros grupos nas duas regiões. Os grupos com menor quantidade de bactérias vivas foram, em ordem crescente, os grupos G5, G2, G3 e G4. Em nenhuma comparação houve significância estatística a não ser com o controle (Gráficos 6 e 7).

Terço Médio – Região Superficial

Gráfico 6: Mediana da porcentagem de bactérias vivas por μm^3 na região superficial do terço médio do canal radicular, após medicação intracanal durante 15 dias.

Terço Médio – Região Profunda

Grupos - teste

Gráfico 7: Mediana da porcentagem de bactérias vivas por μm^3 na região profunda do terço médio do canal radicular, após medicação intracanal durante 15 dias.

A seguir, imagem de um gráfico obtido pela análise biovolumétrica da quantidade de bactérias viáveis e não viáveis das imagens do MCVL analisadas no programa Bioimagel de um espécime usado como controle positivo (Figura 2) e as imagens representativas da dentina contaminada nas regiões superficial e profunda, após 15 dias com as medicações testadas no presente estudo e do controle positivo, nelas é possível visualizar as bactérias viáveis coradas em verde e as não viáveis coradas em vermelho (Figuras 3 e 4).

Stack: Cervical 1A - Total biovolume: 24677 (μm^3)
 Green : 20353 (μm^3) - (82 %)
 Red : 4237 (μm^3) - (17 %)
 NS : 87 (μm^3) - (0 %)

bioImageL (TM) v.2 (2010)

Figura 3 – Imagem do gráfico obtido pela análise das imagens do MCVL pelo programa Bioimagel de um espécime utilizado como controle positivo.

Figura 4 - Imagens da dentina contaminada após as medicações na região superficial (coluna esquerda) e na região profunda (coluna direita). **A e B.** Hidróxido de cálcio veiculado em água destilada. **C e D.** Hidróxido de cálcio veiculado em propilenoglicol. **E e F.** Hidróxido de cálcio veiculado em propilenoglicol com EEP.

Figura 5 - Imagens da dentina contaminada após as medicações na região superficial (coluna esquerda) e na região profunda (coluna direita). **G e H.** Hidróxido de cálcio em propilenoglicol e clorexidina. **I e J.** Hidróxido de cálcio em propilenoglicol e PMCC. **K e L.** Controle positivo de contaminação sem medicação.

5.2 AVALIAÇÃO POR CULTURA MICROBIOLÓGICA

Na avaliação por cultura microbiológica, a pasta de hidróxido de cálcio veiculada em propilenoglicol e que teve a clorexidina como aditivo (G4), mostrou ser menos eficiente na descontaminação intra-tubular, havendo um maior número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL, nas placas em que foi feita a semeadura. A pasta de hidróxido de cálcio com PMCC (G5) obteve o menor número de UFCs/mL. Seguidas dessa pasta, as medicações com melhor desempenho foram a de hidróxido de cálcio em propilenoglicol (G2), seguida da pasta de hidróxido de cálcio com EEP (G3), e após essa a de hidróxido de cálcio em água destilada (G1). Não houve diferença estatística significativa em nenhuma comparação, a não ser dos grupos com o controle positivo (Tabela 1 e Gráfico 9).

Tabela 1- Média da quantidade de UFC/mL em cada grupo, após medicação intracanal durante 15 dias.

Grupos	G1	G2	G3	G4	G5	C+
Nº UFC	12	4	6	41	0	>100

Gráfico 8 – Quantidade de UFC/mL entre cada grupo, após medicação intracanal durante 15 dias.

Quando foi realizada a comparação entre os grupos na camada mais superficial de túbulos dentinários, ou seja, na excisão de dentina com a broca de Largo número 5, a pasta de hidróxido de cálcio veiculada em propilenoglicol (G2) e a pasta de hidróxido de cálcio veiculada em propilenoglicol com PMCC (G5) apresentaram os mesmos resultados, sendo as mais eficazes. A pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina (G4) permitiu uma maior crescimento bacteriano, seguida pelas pastas dos grupos G1 (hidróxido de cálcio em água destilada) e depois o grupo G3 (hidróxido de cálcio em propilenoglicol com EEP). Não houve

diferença estatística significativa em nenhuma comparação, a não ser dos grupos com o controle positivo (Tabela 2 e Gráfico 10).

Tabela 2- Média da quantidade de UFC/mL em cada grupo da região superficial, após medicação intracanal durante 15 dias.

Grupos	G1	G2	G3	G4	G5	C+
Nº UFC	12	0	6	23	0	>100

Gráfico 9 – Quantidade de UFC/mL entre cada grupo na região superficial da dentina, após medicação intracanal durante 15 dias.

Na comparação entre os grupos a partir da dentina excisada pela broca de Largo 6, ou seja, camada mais profunda dos túbulos dentinários, os grupos G5 (aditivo PMCC), G3 (aditivo EEP) e G1 (hidróxido de cálcio veiculado em água destilada) apresentaram os mesmos resultados e foram os mais eficazes. O grupo G4 (aditivo clorexidina) foi menos eficaz que a pasta de hidróxido de cálcio e propilenoglicol (grupo G2). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos, somente entre os grupos e os controles positivos (Tabela 3 e Gráfico 11).

Tabela 3- Média da quantidade de UFC/mL em cada grupo da região profunda, após medicação intracanal durante 15 dias.

Grupos	G1	G2	G3	G4	G5	C+
Nº UFC	0	4	0	18	0	>100

Gráfico 10 - Quantidade de UFC/mL entre cada grupo na região profunda da dentina, após medicação intracanal durante 15 dias.

5.3 AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO INTRATUBULAR DAS PASTAS

A análise da penetração da medicação intracanal foi avaliada em cortes transversais a 3 e a 5mm do ápice dos tubos de dentina bovina, medindo-se o perímetro total dos canais radiculares e o perímetro em que houve penetração da medicação, e a partir disso foi calculada a porcentagem de penetração de cada pasta. Apesar de não haver diferença estatística significativa entre nenhuma das medicações, o G1, em que o hidróxido de cálcio foi veiculado em água destilada mostrou menor porcentagem de penetração intra-tubular quando comparado com os demais grupos. Os grupos G3 e G5 (hidróxido de cálcio em propilenoglicol mais EEP e PMCC respectivamente) demonstraram melhor penetrabilidade, seguidos pelos grupos G2 e G4 (hidróxido de cálcio em propilenoglicol e hidróxido de cálcio em propilenoglicol mais clorexidina respectivamente). Esses quatro grupos, porém, tiveram resultados semelhantes (Gráfico 8).

Tabela 4- Mediana da porcentagem de penetração das diferentes medicações intra-canal.

Grupos	G1	G2	G3	G4	G5
%penetrabilidade	76,50	97,73	99,17	97,42	99,23

Gráfico 11 – Mediana da Porcentagem de penetração das diferentes medicações intra-canal.

A seguir, imagens demonstrativas da penetração das medicações, associadas ao corante rodamina, na dentina obtidas pelo MCVL, onde pode-se observar em vermelho as áreas alcançadas pelas diferentes pastas de hidróxido de cálcio (Figuras 6 e 7).

Figura 6 - Imagens da penetrabilidade das medicações intra-canal do corte do espécime a 3mm do ápice (coluna esquerda) e a 5mm do ápice (coluna direita). **A e B.** Hidróxido de cálcio em água destilada. **C e D.** Hidróxido de cálcio em propilenoglicol. **E e F.** Hidróxido de cálcio em propilenoglicol e própolis.

Figura 7 - Imagens da penetrabilidade das medicações intra-canal do corte do espécime a 3mm do ápice (coluna esquerda) e a 5mm do ápice(coluna direita). **G e H.** Hidróxido de cálcio em propilenoglicol e clorexidina. **I e J.** Hidróxido de cálcio em propilenoglicol e PMCC.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 Da Metodologia

No presente estudo foram utilizados dois métodos diferentes para analisar em dentes bovinos a ação antimicrobiana das diferentes pastas a base de hidróxido de cálcio, para que assim, possam ser obtidos resultados mais precisos. Os dois métodos complementares, que são análise por cultura microbiológica e pelo Microscópio Confocal de Varredura a Laser (MCVL), auxiliarão a obtenção de uma escolha mais eficaz para uso clínico. A pesquisa foi realizada com um único micro-organismo traçador que foi o *Enterococcus faecalis*, já que esta bactéria é frequentemente encontrada em casos de insucesso na terapia endodôntica (SAFAVI et al, 1990; SUNDQVIST, 1994).

Haapasalo; Ostarvick (1987), já utilizavam o modelo experimental em tubos de dentina bovina e *E. faecalis* para testar medicamentos de interesse endodôntico, e desde então essa metodologia se tornou bastante utilizada (EVANS et al., 2003). Outro estudo (CAMARGO et al., 2006) não encontrou diferenças entre os dentes humanos e os bovinos em relação a difusão de íons através da dentina. Além disso, a estrutura dentinária principal de dentes bovinos e humanos não são significativamente diferentes (HAAPASALO e ORSTAVIK, 1987).

A cultura microbiológica foi utilizada como método clássico para análise de substâncias antimicrobianas, possibilitando a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) após 48 horas de execução do procedimento de coleta. GONZALES-CABEZAS et al., (1999) mostrou que a MCVL era capaz de detectar bactérias em lesões cariosas, pelo uso da fluorescência além da detecção da viabilidade de determinados micro-organismos colonizadores das paredes do canal radicular (GEORGE, KISHEN, SONG, 2005; KISHEN, GEORGE, KUMAR, 2006; FIMPLE et al., 2008).

A grande maioria dos estudos clínicos avaliando os efeitos antibacterianos dos procedimentos do tratamento endodôntico tem sido baseada nas técnicas com cultura. No entanto, sabe-se que a cultura tem algumas limitações, incluindo baixa sensibilidade, dificuldade na identificação de cepas cultiváveis com fenótipos ambíguos, dificuldades na detecção de espécies de cultura difícil, e inabilidade de

muitas espécies orais em crescer sob condições laboratoriais artificiais (SIQUEIRA e RÔÇAS, 2009), problemas estes não aplicáveis no presente estudo.

Adicionando a isso o fato de que a penetração nos túbulos dentinários é o mecanismo de resistência mais importante do *E. faecalis* contra os agentes antibacterianos na terapia endodôntica (HAAPASALO e ØRSTAVIK, 1987; SIQUEIRA, UZEDA e FONSECA, 1996) tornou-se oportuna a utilização da análise dos espécimes por (MCVL) utilizando o corante LIVE/DEAD, já que com esta tecnologia é possível visualizar as bactérias em profundidade no interior dos túbulos dentinários, através da fluorescência emitida pelos micro-organismos corados (ARIAS, 2013).

Ainda, previamente a contaminação, optou-se por submeter os espécimes a um banho ultrassônico por 10 minutos imersos em Hipoclorito de Sódio a 1%, depois em EDTA 17% e depois em soro fisiológico seguindo o protocolo de Marinho et al. (2014), para garantir melhor descontaminação dentinária antes da esterilização dos espécimes.

Os critérios utilizados para estabelecer a metodologia de contaminação dentinária foram baseados na determinação da viabilidade bacteriana por meio de MCVL. A contaminação dos espécimes seguiu o protocolo desenvolvido na Endodontia da FOB-USP (ANDRADE et al., 2015) adaptado de Haapasalo; Ørstavik (1987) e Ma et al. (2011). O modelo experimental utilizado foi constituído na intenção de se aproximar ao máximo da situação real que ocorre nas infecções endodônticas no ambiente oral. Para isso, dentes incisivos bovinos, na forma de tubos padronizados em comprimento e diâmetro interno, foram utilizados (HAAPASALO e ØRSTAVIK, 1987), já que a dentina bovina é reconhecida pela similaridade com a dentina humana na estrutura, composição e diâmetro dos túbulos (EVANS et al., 2003). Assim, os dentes foram seccionados para formar amostras de 12mm de comprimento e 1,2 cm de diâmetro interno. A superfície externa foi impermeabilizada com dupla camada de esmalte e as amostras utilizadas sem cortes na tentativa de simular com maior veracidade o ambiente oral, objetivando a penetração de micro-organismos na dentina somente via canal radicular para contaminação *in vitro* (ARIAS, 2013). Para promover a contaminação bacteriana por *E. faecalis* dentro dos túbulos, utilizou-se o protocolo de centrifugação dos espécimes utilizado por Ma et al. (2011) em dias alternados e repetidos. Desta

forma, aliando-se o formato dos espécimes com centrifugações repetidas e demais adaptações, pode-se comprovar por meio de MCVL, melhor proliferação intra-tubular do que os métodos de contaminação anteriormente utilizados, (ANDRADE et al., 2015).

Após a colocação da medicação intracanal, algumas modificações foram realizadas, como a imersão e armazenamento dos dentes em água destilada esterilizada, para que o ambiente úmido e passível de contaminação pudesse também se aproximar do alvéolo onde se encontra o dente na cavidade oral. Escolha essa feita a partir de um estudo piloto que avaliou diferentes formas de armazenamento dos dentes com a medicação intra-canal, sendo o mais apropriado para a pesquisa aquele que proporcionasse maior viabilidade bacteriana.

Os medicamentos utilizados neste estudo foram a pasta de hidróxido de cálcio veiculada em água destilada, a pasta de hidróxido de cálcio veiculada em propilenoglicol, a pasta de hidróxido de cálcio veiculada em propilenoglicol com Extrato Etanólico de Própolis a 10% (EEP), a pasta de hidróxido de cálcio veiculada em propilenoglicol com Clorexidina e a pasta de hidróxido de cálcio veiculada em propilenoglicol com Paramonoclorofenol Canforado (PMCC). A inserção das medicações foi realizada da mesma maneira para todos os grupos.

O micro-organismo traçador escolhido para o presente estudo foi o *E. faecalis* já que este tem sido considerado o tipo de bactéria predominante em dentes com canais radiculares obturados, portadores de periodontite apical crônica (SCHIRRMISTER et al., 2007, 2009). Gomes et al. (2008) detectaram *E. faecalis* em 77,8% de um total de 45 canais radiculares de dentes obturados com lesão periapical. Sendo portanto, uma bactéria com capacidade de sobrevivência à terapia endodôntica, cuja resistência deve ser estudada.

6.2 DOS RESULTADOS

O hidróxido de cálcio deve ser associado a um veículo para ser usado em pasta como medicação intracanal, e, esse veículo determina sua taxa de dissociação em íons e sua difusão através dos túbulos dentinários. Ainda, o veículo influencia na solubilidade dessa pasta e em como ela será reabsorvida caso extravase para os tecidos periapicais (MOHAMMADI e DUMMER, 2011).

No presente estudo, apesar de algumas variações e de quase não haver diferença estatística significativa, em geral, a pasta de hidróxido de cálcio veiculada em propilenoglicol utilizando PMCC como aditivo (G5) mostrou ter o melhor efeito antimicrobiano contra *E. faecalis* dentre as medicações aqui estudadas, tanto na avaliação por cultura microbiológica quanto na avaliação por MCVL. Os excelentes resultados em relação ao uso dessa medicação intracanal nesse estudo, foram similares aos resultados obtidos em estudos anteriores (BYSTRÖM et al., 1985; SJÖGREN et al., 1991). Segundo Siqueira e Uzeda (1996 e 1998), Sukawat e Srisuwan (2002), a pasta de hidróxido de cálcio com PMCC elimina micro-organismos localizados em regiões mais distantes da região ao redor de onde a pasta foi aplicada, e mata bactérias mais rapidamente do que as misturas de hidróxido de cálcio com veículos inertes como água destilada. A pasta do grupo G2, hidróxido de cálcio apenas veiculado em propilenoglicol, também demonstrou bons resultados, tanto no terço cervical quanto no médio, o que sugere que os outros aditivos utilizados (própolis e clorexidina) podem de alguma forma diminuir o efeito antimicrobiano da pasta. Esse resultado, ainda pode comprovar a boa ação antimicrobiana e de difusão pela dentina do propilenoglicol, já verificada em outros estudos (BHAT e WALLEKAR, 1975; THOMAS, BHAT e KOTIAN; 1980; CRUZ et al., 2002). Assim, esses resultados podem ser aplicados na rotina clínica, optando-se por utilizar a pasta de hidróxido de cálcio e propilenoglicol com PMCC em casos de dentes com necrose pulpar (principalmente nos casos onde existe lesão periapical), e nos casos de reintervenção endodôntica, nos quais existem bactérias que sobrevivem em ambientes com restrição de nutrientes (SIQUEIRA-JUNIOR, 2001; CHÁVEZ DE PAZ et al., 2003). Enquanto nos casos de biopulpectomia que não são finalizados em uma única sessão, ou onde não há certeza de que a cadeia asséptica foi mantida, a pasta de hidróxido com propilenoglicol pode ser utilizada

sem prejudicar o coto pulpar, já que nesta pasta nenhuma substância citotóxica é utilizada.

SIQUEIRA-JÚNIOR, MAGALHÃES e RÔÇAS (2007) afirmam que o hábito de usar medicação intracanal entre sessões, com certas substâncias como pasta de hidróxido de cálcio com PMCC, pode ser primordial na obtenção de uma alta incidência de culturas negativas antes da obturação melhorando assim o resultado do tratamento endodôntico, principalmente em casos de necrose pulpar.

Silveira et al. (2007) avaliaram, em cães, a resposta dos tecidos periapicais ao tratamento endodôntico de canais radiculares infectados realizados em uma ou duas sessões, utilizando diferentes medicações intra-canal. As lesões periapicais foram induzidas pela contaminação do canal radicular com *E. faecalis*, e as medicações usadas foram óleo ozonizado e hidróxido de cálcio com paramonoclorofenol canforado. Eles tiveram como resultado final uma taxa de sucesso de 74% entre os casos em que foi usada a medicação de Hidróxido de Cálcio com PMCC entre sessões, 77% em que foi usado o óleo ozonizado e, 46% nos casos tratados em somente uma sessão reforçando o importante aspecto da utilização de medicação intra-canal entre sessões.

A associação de hidróxido de cálcio com PMCC, foi sugerida por Kaiser (1964) e usada por Frank (1966), portanto tem seus efeitos e eficácia bastante conhecidos e estudados. Tem ainda bom escoamento e penetrabilidade, tendo alta porcentagem de penetração intra-tubular. Embora alguns estudos tenham comprovado a toxicidade do PMCC *in vitro* e *in vivo* (CHANG et al., 1999), em baixas concentrações, os fenóis mostram baixa toxicidade quando em contato com tecidos vivos mantendo seu efeito antibacteriano (RÔÇAS et al., 2006). Assim, o PMCC deve ser usado cautelosamente na odontologia (CHANG et al., 1999), devendo ser então usado como um aditivo e não como um veículo, partindo daí então a necessidade de se acrescentar um veículo viscoso como o propilenoglicol (SIMON, BHAT e FRANCIS, 1995). A pasta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol e PMCC pode exercer um papel fundamental na eliminação de micro-organismos nos casos de reintervenções endodônticas, já que, nesses casos encontram-se no sistema de canais radiculares, bactérias que sobrevivem a altos níveis de pH e a baixo suporte de nutrientes, como o *Enterococcus faecalis*. Essas bactérias podem

estar aí presentes por terem sobrevivido aos procedimentos antimicrobianos da terapia endodôntica ou por terem infiltrado através de um selamento provisório ou restauração inadequados ou até mesmo ausentes, deixando assim a obturação em contato com a saliva (RICUCCI, GRONDAHL e BERGENHOLTZ, 2000; RÔÇAS et al., 2004).

Neste estudo, as pastas veiculadas em propilenoglicol (mesmo no grupo sem nenhum aditivo) apresentaram melhores resultados antimicrobianos em comparação com o hidróxido de cálcio somente em água destilada (G1), fato explicado pela ótima penetrabilidade intra-tubular do propilenoglicol.

Apesar da rápida liberação de íons cálcio e hidroxila (efeito desejado na prática clínica) obtida pela mistura de hidróxido de cálcio com água destilada, levando a um alto nível de solubilidade quando esta pasta fica em contato com os fluidos teciduais (GROVER e SHETTY, 2014), o propilenoglicol tem tensão superficial menor que a da água, propiciando assim uma maior difusão do medicamento através da membrana celular das bactérias, o que comprova os presentes achados. Este veículo, proposto por Laws em 1962 (BHAT e WALVEKAR, 1975) tem atividade antibacteriana e não é irritante aos tecidos periapicais (GROVER e SHETTY, 2014).

Os veículos viscosos são também substâncias solúveis em água, mas liberam íons cálcio e hidroxila por períodos longos, devido ao seu alto peso molecular, que minimiza essa dispersão (SIQUEIRA, LOPES e ESTRELA, 2004, FERREIRA et al., 2004). A liberação prolongada desses íons é benéfica em diferentes situações clínicas como na inibição de reabsorção radicular inflamatória, reparo de lesões periapicais e outras (GROVER e SHETTY, 2014).

Alguns estudos compararam a eficácia antimicrobiana do hidróxido de cálcio veiculado em água destilada, propilenoglicol e PMCC e encontraram resultados que concordam com os resultados observados em nosso estudo (PAUL, 1997; GANESH et al., 2014).

No estudo feito por Paul (1997), foi mostrado que a pasta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol exerce uma significativa ação antibacteriana e pode ser usada como medicação intracanal em preferência a pastas preparadas com

componentes fenólicos que são irritantes teciduais como o PMCC. No presente estudo, na avaliação por MCVL a ação antimicrobiana contra *E. faecalis* das diferentes medicações aqui analisadas, na região mais superficial do terço cervical, a pasta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol (G2) obteve maior eficácia.

A associação da clorexidina ao hidróxido de cálcio veiculada em propilenoglicol (G4), neste estudo, não demonstrou resultados tão satisfatórios, sendo uma das medicações menos eficazes. Estrela et al., 2001 já demonstraram que a adição de clorexidina a pasta não influencia a efetividade e nem no tempo necessário para inativar micro-organismos, incluindo *Enterococcus faecalis*. Estes resultados podem ser atribuídos ao fato de que a clorexidina em ambientes com altos pHs é degradada em até 7 dias (BARBIN et al., 2008).

O benefício de misturar essas substâncias a fim de melhorar a eficácia antimicrobiana do hidróxido de cálcio como medicação intracanal na eliminação de *E. faecalis* gera muitas controvérsias. As possíveis razões para essas controvérsias são devidas às diferenças nos materiais e métodos utilizados incluindo avaliações microbiológicas, concentrações e formas físicas da clorexidina, período de tempo dos experimentos, cepas e concentrações de *E. faecalis*, métodos de inoculação bacteriana e métodos para colocar os medicamentos (SAATCHI et al., 2014).

Tendo resultados de acordo com o presente trabalho, Saatchi et al. (2014) concluíram em uma meta-análise que a clorexidina não aumenta o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio, e que em *ex vivo* não melhora suas propriedades antibacterianas contra *E. faecalis*. Assim, acreditam que estudos *in vivo* mais aprofundados são necessários para confirmar e correlacionar seus achados com resultados clínicos.

Uma razão para que não haja uma melhora no efeito do hidróxido de cálcio ao se adicionar clorexidina, pode ser devido à desprotonação da clorexidina em altos pHs, reduzindo sua solubilidade e alterando sua interação com as superfícies bacterianas, como resultado de uma carga de moléculas alteradas (MOHAMMADI e SHALAVI, 2012).

Bhandari e Patil (2014) avaliaram o efeito antimicrobiano intratubular contra *E. faecalis* do hidróxido de cálcio, clorexidina e própolis separadamente, e obtiveram

como resposta uma máxima atividade antimicrobiana da clorexidina, e o hidróxido de cálcio foi o menos eficaz, porém com pouca diferença em relação à própolis.

Por outro lado, quanto à biocompatibilidade da clorexidina, Barbin et al. (2008, 2013) observaram que produtos tóxicos como a paracloroanilina e oxigênio reativo foram liberados da clorexidina sozinha ou associada à pasta de hidróxido de cálcio, apesar desta substância ter sido considerada por muito tempo como inócua aos tecidos ou até mesmo biocompatível (ESTRELA et al., 2003; EVANOV et al., 2004). Desta forma, a questão da biocompatibilidade da clorexidina deve ser melhor investigada.

Os mecanismos de atividade contra micro-organismos da própolis têm sido estudados, e podem ser atribuídos aos componentes flavonóides e fenólicos desta substância (KUIUMGIEV et al., 1999). Ainda, há registros de que a própolis previne a divisão celular bacteriana e age na membrana microbiana causando danos funcionais e estruturais, similares a ação de alguns antibióticos (TAKAISI-KIKUNI e SCHILCHER, 1994; MIRZOEVA, GRISHANIN e CALDER, 1997).

Estudos recentes relataram ser a própolis mais eficaz contra micro-organismos resistentes assim como mais biocompatível aos tecidos perirradiculares do que os medicamentos já existentes (MADHUBALA, SRINIVASAN e AHAMED, 2011). Porém, no presente estudo, a pasta de hidróxido de cálcio veiculada em propilenoglicol com EEP a 10% (G3) obteve resultados intermediários quando comparada com as outras medicações analisadas.

Porém, é difícil comparar os resultados de diferentes estudos que avaliaram o efeito antimicrobiano da própolis contra *E. faecalis* devido as suas diferentes formulações assim como os diferentes métodos microbiológicos e período da medicação intracanal. Sua composição varia dependendo da flora do local de onde foi extraída, o tempo em que foi coletada e a inclusão de ceras contaminadas. Isso poderia variar a efetividade clínica da própolis na microbiota do canal radicular (BHANDARI e PATIL, 2014).

Para isso, a utilização de amostras de própolis tipificadas é imprescindível nos estudos. É necessária sua purificação com eliminação de cera, assim como a pesquisa de seus componentes. Neste estudo, a amostra utilizada foi analisada por

HPLC (High performance liquid chromatography), para determinação e padronização dos componentes.

De qualquer forma, é interessante observar que na descontaminação intratubular dentinária todas as pastas de hidróxido de cálcio testadas foram de uma maneira ou outra, antimicrobianas, sendo estatisticamente eficazes na redução de *Enterococcus faecalis*, em relação aos dentes controles que não receberam medicação. O hidróxido de cálcio é um antimicrobiano efetivo, de fácil utilização e totalmente acessível, sendo então indicado para a clínica e o grande foco é a sua potencialização antimicrobiana, sem perder sua excelente característica de biocompatibilidade.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Considerando as metodologias utilizadas nesse estudo e os resultados obtidos foi possível observar:

- a) Houve ação antimicrobiana intra-tubular dentinária sobre *Enterococcus faecalis* por todas as pastas de hidróxido de cálcio testadas.
- b) As pastas de hidróxido de cálcio com propilenoglicol e PMCC demonstraram melhor desempenho tanto nas regiões superficial como profunda da massa dentinária, podendo ser, portanto, escolhidas para uso clínico, porém sem diferença estatística significativa.
- c) A penetrabilidade das pastas veiculadas em propilenoglicol foi maior em relação ao veículo água destilada, porém não houve diferença estatística significativa.
- d) Ambas metodologias utilizadas, de cultura microbiológica como a análise em microscopia confocal de varredura a laser mostraram resultados semelhantes.

Referências

REFERÊNCIAS

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.

ANDRADE, F.B.; ARIAS, M.P.C.; MALIZA, A.G.A.; DUARTE, M.A.H.; GRAEFF, M.S.Z.; MIDENA, R.Z.; AMOROSO-SILVA, P.A.; MORAES, I.G. (in press) A new improved protocol for *in vitro* intratubular contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. **J. Appl. Oral Sci.**, 2015.

ANTHONY DR, GORDON TM, DEL RIO CE. The effect of three vehicles on the pH of calcium hydroxide. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1982 Nov;54(5):560-5.

APPELBE OK, SEDGLEY CM. Effects of prolonged exposure to alkaline pH on *Enterococcus faecalis* survival and specific gene transcripts. **Oral Microbiol Immunol.** 2007 Jun;22(3):169-74.

ARIAS, Marcela Paola de Castro. **Influência da agitação ultrassônica na ação antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio e própolis.** 2013. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2013. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25147/tde-03092013-151731/>>.

ASSOULINE LS, FUSS Z, MAZOR Y, WEISS EI. Bacterial penetration and proliferation in root canal dentinal tubules after applying dentin adhesives in vitro. **J Endod.** 2001 Jun;27(6):398-400.

BARBIN LE, SAQUY PC, GUEDES DFC, SOUSA-NETO MD, ESTRELA C, PÉCORA JD. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. **J Endod** 2008;34:1508–14.

BASRANI B, GHANEM A, TJÄDERHANE L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. **J Endod.** 2004 Jun;30(6):413-7.

BASRANI BR, MANEK S, SODHI RNS, FILLERY E, MANZUR A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. **J Endod** 2007;33:966–9.

BASRANI B, SANTOS JM, TJÄDERHANE L, GRAD H, GORDUYSUS O, HUANG J, LAWRENCE HP, FRIEDMAN S. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2002 Aug;94(2):240-5.

BASRANI B, TJÄDERHANE L, SANTOS JM, PASCON E, GRAD H, LAWRENCE HP, FRIEDMAN S. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2003 Nov;96(5):618-24.

BEHNEN MJ, WEST LA, LIEWEHR FR, BUXTON TB, MCPHERSON JC 3RD. Antimicrobial activity of several calcium hydroxide preparations in root canal dentin. **J Endod.** 2001 Dec;27(12):765-7.

BERGENHOLTZ G. Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth.

Odontol Revy. 1974;25(4):347-58. Bhat KS, Walvekar S. Response of subcutaneous connective tissue to materials and drugs: a simplified technique. **J Endod.** 1975 Jun;1(6):202-4.

BHAT KS, WALVEKAR SV. Evaluation of bactericidal property of propylene glycol for its possible use in endodontics. **Arogya J Health Sci** 1975;1:54-9.

BHANDARI S, T S A, PATIL CR. An in Vitro Evaluation of Antimicrobial Efficacy of 2% Chlorhexidine Gel, Propolis and Calcium Hydroxide Against *Enterococcus faecalis* in Human Root Dentin. **J Clin Diagn Res.** 2014 Nov;8(11):ZC60-3.

BREEUWER P, ABEE T. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. **Int J Food Microbiol.** 2000 Apr 10;55(1-3):193-200.

BOOTH IR, KROLL RG. Regulation of cytoplasmic pH (pH_i) in bacteria and its relationship to metabolism. **Biochem Soc Trans.** 1983 Jan;11(1):70-2.

BOOTH IR. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. **Microbiol Rev.** 1985 Dec;49(4):359-78.

BOULOS L, PRÉVOST M, BARBEAU B, COALLIER J, DESJARDINS R. LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. **J Microbiol Methods.** 1999 Jul;37(1):77-86.

BRETZ WA, CHIEGO DJ JR, MARCUCCI MC, CUNHA I, CUSTÓDIO A, SCHNEIDER LG. Preliminary report on the effects of propolis on wound healing in the dental pulp. **Z Naturforsch C**. 1998 Nov-Dec;53(11-12):1045-8.

BYSTROM A, CLAEISSON R, SUNDQVIST G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endod Dent Traumatol**. 1985 Oct;1(5):170-5.

BYSTRÖM A, SUNDQVIST G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scand J Dent Res**. 1981 Aug;89(4):321-8.

BYSTRÖM A, SUNDQVIST G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. **Int Endod J**, v. 18, n.1, p.18-35, Jan 1985.

CALT S, SERPER A, OZÇELIK B, DALAT MD. pH changes and calcium ion diffusion from calcium hydroxide dressing materials through root dentin. **J Endod**. 1999 May;25(5):329-31.

CAMARGO CH, BERNARDINELI N, VALERA MC, DE CARVALHO CA, DE OLIVEIRA LD, MENEZES MM, AFONSO SE, MANCINI MN. Vehicle influence on calcium hydroxide pastes diffusion in human and bovine teeth. **Dent Traumatol**. 2006 Dec;22(6):302-6.

CAMÕES IC, SALLES MR, CHEVITARESE O, GOMES LN. Diffusion of Ca(OH)₂ associated with different vehicles: chromatographic study (high-performance liquid chromatography). **J Endod**. 2004 Jan;30(1):30-4.

CHANG YC, TAI KW, CHOU LS, CHOU MY. Effects of camphorated parachlorophenol on human periodontal ligament cells in vitro. **J Endod** 1999;25:779-781.

CHÁVEZ DE PAZ LE, BERGENHOLTZ G, DAHLÉN G, SVENSÄTER G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. **Int Endod J** 2006.

CHÁVEZ DE PAZ LE, DAHLÉN G, MOLANDER A, MÖLLER A, BERGENHOLTZ G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. **Int Endod J**. 2003 Jul;36(7):500-8.

CHÁVEZ DE PAZ LE. Image analysis software based on color segmentation for

characterization of viability and physiological activity of biofilms. **Appl Environ Microbiol.** 2009 Mar;75(6):1734-9.

CHONG BS, PITT FORD TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. **Int Endod J.** 1992 Mar;25(2):97-106.

CRUZ EV, KOTA K, HUQUE J, IWAKU M, HOSHINO E. Penetration of propylene glycol into dentine. **Int Endod J.** 2002 Apr;35(4):330-6.

CURY JA, ROCHA EP, KOO H, FRANCISCO SB, DEL BEL CURY AA. Effect of saccharin on antibacterial activity of chlorhexidine gel. **Braz Dent J.** 2000;11(1):29-34.

DAHLÉN G, SAMUELSSON W, MOLANDER A, REIT C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. **Oral Microbiol Immunol.** 2000 Oct;15(5):309-12.

DEL CARPIO-PEROCHENA AE, BRAMANTE CM, DUARTE MA, CAVENAGO BC, VILLAS-BOAS MH, GRAEFF MS, BERNARDINELI N, DE ANDRADE FB, ORDINOLA-ZAPATA R. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. **J Endod.** 2011 Aug;37(8):1134-8.

DELGADO RJ, GASPAROTO TH, SIPERT CR, PINHEIRO CR, DE MORAES IG, GARCIA RB, DUARTE MA, BRAMANTE CM, TORRES SA, GARLET GP, CAMPANELLI AP, BERNARDINELI N. Antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on intratubular *Candida albicans*. **Int J Oral Sci.** 2013 Mar;5(1):32-6.

DE REZENDE GP, DA COSTA LR, PIMENTA FC, BARONI DA. In vitro antimicrobial activity of endodontic pastes with propolis extracts and calcium hydroxide: a preliminary study. **Braz Dent J.** 2008;19(4):301-5.

DE SOUZA-FILHO FJ, SOARES ADE J, VIANNA ME, ZAIA AA, FERRAZ CC, GOMES BP. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. **Braz Dent J.** 2008;19(1):28-33.

DIANAT O, SAEDI S, KAZEM M, ALAM M. Antimicrobial Activity of Nanoparticle

Calcium Hydroxide against *Enterococcus Faecalis*: An In Vitro Study. **Iran Endod J.** 2015 Winter;10(1):39-43.

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

DUARTE MA, DEMARCHI AC, YAMASHITA JC, KUGA MC, FRAGA SDE C. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2003 Mar;95(3):345-7.

EDDY RS, JOYCE AP, ROBERTS S, BUXTON TB, LIEWEHR F. An in vitro evaluation of the antibacterial efficacy of chlorine dioxide on *E. faecalis* in bovine incisors. **J Endod.** 2005 Sep;31(9):672-5.

EL KARIM I, KENNEDY J, HUSSEY D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2007 Apr;103(4):560-9. Epub 2007 Jan 12.

ESBERARD RM, CARNES DL JR, DEL RIO CE. Changes in pH at the dentin surface in roots obturated with calcium hydroxide pastes. **J Endod.** 1996 Aug;22(8):402-5.

Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pécora JD. Control of microorganism *in vitro* by calcium hydroxide pastes. **Int Endod J** 2001;34:416–8.

ESTRELA C, PÉCORA JD, SOUZA-NETO MD, ESTRELA CR, BAMMANN LL. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide pastes. **Braz Dent J.** 1999;10(2):63-72.

ESTRELA C, PESCE HF. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide pastes in the presence of connective tissue of the dog. **Part I Braz Dent J.** 1996;7(1):41-6.

ESTRELA C, RIBEIRO RG, ESTRELA CR, 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 C, SYDNEY GB, PESCE HF, FELIPPE JÚNIOR O. Dentinal diffusion of hydroxyl ions of various calcium hydroxide pastes. **Braz Dent J.** 1995;6(1):5-9.

EVANOV C, LIEWEHR F, BUXTON TB, JOYCE AP. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide and chlorhexidine gluconate irrigants at 37 degrees C and 46 degrees C. **J Endod.** 2004 Sep;30(9):653-7.

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.

EVANS MD, BAUMGARTNER JC, KHEMALEELAKUL SU, XIA T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. **J Endod**. 2003 May;29(5):338-9.

FAVA LR. One-appointment root canal treatment: incidence of postoperative pain using a modified double-flared technique. **Int Endod J**. 1991 Sep;24(5):258-62.

FAVA LR, SAUNDERS WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. **Int Endod J**. 1999 Aug;32(4):257-82.

FERRAZ CC, GOMES BP, ZAIA AA, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. **Braz Dent J**. 2007;18(4):294-8.

FERRAZ CC, GOMES BP, ZAIA AA, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **J Endod**. 2001 Jul;27(7):452-5.

FERREIRA FB, FERREIRA AL, GOMES BP, SOUZA-FILHO FJ. Resolution of persistent periapical infection by endodontic surgery. **Int Endod J**. 2004 Jan;37(1):61-9.

FERREIRA FBA, SILVA E, SOUZA PA, VALE MS, MORAIS IG, GRANJERO JM. Evaluation of pH levels and calcium ion release in various calcium hydroxide endodontic dressings. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2004 Mar;97(3):388-392.

FERREIRA FB, TORRES SA, ROSA OP, FERREIRA CM, GARCIA RB, MARCUCCI MC, GOMES BP. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. **Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2007 Nov;104(5):709-16.

FIGDOR D, SUNDQVIST G. A big role for the very small--understanding the endodontic microbial flora. **Aust Dent J**. 2007 Mar;52(1 Suppl):S38-51.

FIMPLE JL, FONTANA CR, FOSCHI F, RUGGIERO K, SONG X, PAGONIS TC, TANNER AC, KENT R, DOUKAS AG, STASHENKO PP, SOUKOS NS. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. **J Endod**. 2008 Jun;34(6):728-34.

FOREMAN PC, BARNES IE. Review of calcium hydroxide. **Int Endod J.** 1990 Nov;23(6):283-97.

FRANK AL (1966) Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation. **Journal of the American Dental Association** 72, 87±93.

FRIEDMAN S. Management of post-treatment endodontic disease: a current concept of case selection. **Aust Endod J.** 2000 Dec;26(3):104-9.

GANESH MR, CHAURASIA VR, MASAMATTI VK, MUJEEB A, JHAMB A, AGARWAL JH. In vitro evaluation of antibacterial efficacy of calcium hydroxide in different vehicles. **J Int Soc Prev Community Dent.** 2014 Jan;4(1):56-60.

GEORGE GK, RAJKUMAR K, SANJEEV K, MAHALAXMI S. Calcium ion diffusion levels from MTA and apexcal in simulated external root resorption at middle third of the root. **Dent Traumatol** 2009;25:480–3.

GEORGE S, KISHEN A, SONG KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. **J Endod.** 2005.

GHISALBERTI EL. Propolis: a review. **Bee World** 1979;60:59 - 84.

GOMES AP, DE ARAUJO EA, GONÇALVES SE, KRÄFT R. Treatment of traumatized permanent incisors with crown and root fractures: a case report. **Dent Traumatol.** 2001 Oct;17(5):236-9

GOMES BP, FERRAZ CC, GARRIDO FD, ROSALEN PL, ZAIA AA, TEIXEIRA

FB, DE SOUZA-FILHO FJ. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. **J Endod.** 2002;28:758-61.

GOMES BP, MONTAGNER F, BERBER VB, ZAIA AA, FERRAZ CC, DE ALMEIDA JF, SOUZA-FILHO FJ. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. **J Dent.** 2009 Jan;37(1):76-81.

GOMES BP, PINHEIRO ET, JACINTO RC, ZAIA AA, FERRAZ CC, SOUZA-FILHO FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. **J Endod.** 2008 May;34(5):537-40.

GOMES BP, SATO E, FERRAZ CC, TEIXEIRA FB, ZAIA AA, SOUZA-FILHO FJ. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. **Int Endod J**. 2003 Sep;36(9):604-9.

GOMES BP, VIANNA ME, SENA NT, ZAIA AA, FERRAZ CC, DE SOUZA FILHO FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of Calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2006 Oct;102(4):544-50.

GOMES IC, CHEVITARESE O, DE ALMEIDA NS, SALLES MR, GOMES GC. Diffusion of calcium through dentin. **J Endod**. 1996 Nov;22(11):590-5.

GONZALEZ-CABEZAS C, LI Y, GREGORY RL, STOOKEY GK. Distribution of three cariogenic bacteria in secondary carious lesions around amalgam restorations. **Caries Res**. 1999 Sep-Oct;33(5):357-65.

GONSALES GZ, ORSI RO, FERNANDES JÚNIOR A, RODRIGUES P, FUNARI, S. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. 2006 Apr-Jun;12(2):276-84.

GRANGE JM, DAVEY RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **J R Soc Med**. 1990 Mar;83(3):159-60.

GRECCA FS, LEONARDO MR, DA SILVA LA, TANOMARU FILHO M, BORGES MA. Radiographic evaluation of periradicular repair after endodontic treatment of dog's teeth with induced periradicular periodontitis. **J Endod**. 2001 Oct;27(10):610-2.

GROVER C, SHETTY N. Evaluation of calcium ion release and change in pH on combining calcium hydroxide with different vehicles. **Contemp Clin Dent**. 2014Oct;5(4):434-9.

HARRISON JW, MADONIA JV (1970) Antimicrobial effectiveness of parachlorophenol. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology** 30, 267±75.

HARRISON JW, MADONIA JV (1971) The toxicity of parachlorophenol. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology** 32, 90±9.

HAAPASALO M, ORSTAVIK D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. **J Dent Res**. 1987 Aug;66(8):1375-9.

HAAPASALO M, QIAN W, PORTENIER I, WALTIMO T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. **J Endod.** 2007 Aug;33(8):917-25. Epub 2007 Jun 22.

HANCOCK HH 3RD, SIGURDSSON A, TROPE M, MOISEWITSCH J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2001 May;91(5):579-86.

HAVLIKOVA L, MATYSOVA L, NOVAKOV_ L, HÁJKOVÁ R, SOLICH P. HPLC determination of chlorhexidine gluconate and p-chloroaniline in topical ointment. **J Pharm Biomed Anal** 2007; 43:1169–73.

IKENO K, IKENO T, MIYAZAWA C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Res** 1991;25:347—51.

JAVELET J, TORABINEJAD M, BAKLAND LK. Comparison of two pH levels for the induction of apical barriers in immature teeth of monkeys. **J Endod.** 1985 Sep;11(9):375-8.

JEANSONNE MJ, WHITE RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. **J Endod.** 1994 Jun;20(6):276-8.

KAISER HJ (1964) Management of wide open canals with calcium hydroxide. Read before the American Association of Endodontists, Washington, DC, April 17.

KAKEHASHI S, STANLEY HR, FITZGERALD RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1965 Sep;20:340-9.

KANDASWAMY D, VENKATESHBABU N, GOGULNATH D, KINDO AJ. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. **Int Endod J.** 2010 May;43(5):419-23.

KAYOUGLU G, ÖMÜRLÜ H, AKCA G, GÜREL M, GENÇAY E, SORKUN K, SALIH B. Antibacterial activity of propolis versus conventional endodontic disinfectants against *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules. **J Endod.** 2011 Mar;37(3):376– 381.

KHEMALEELAKUL S, BAUMGARTNER JC, PRUKSAKOM S. Autoaggregation and coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections. **J Endod.** 2006 Apr;32(4):312-8.

KISHEN A, GEORGE S, KUMAR R. Enterococcus faecalis-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. **J Biomed Mater Res A**. 2006 May;77(2):406-15.

KONTAKIOTIS E, NAKOU M, GEORGOPOULOU M. In vitro study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *Int Endod J*. 1995 Nov;28(6):285-9.

KOO H, PEARSON SK, SCOTT-ANNE K, ABRANCHES J, CURY JA, ROSALEN PL, PARK YK, MARQUIS RE, BOWEN WH. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. **Oral Microbiol Immunol**. 2002 Dec;17(6):337-43.

KOO H, ROSALEN PL, CURY JA, PARK YK, IKEGAKI M, SATTTLER A. Effect of Apis mellifera propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. **Caries Res** 1999;33: 393—400.

KUIUMGIEV A, TSVETKOVA L, SERKEDJIEVA Y, BANKOVA V, CHRISTOV R, POPOV S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J. Ethno. Pharmacol**. 1999;64:235-40.

LEONARDO MR, DA SILVA LA, TANOMARU FILHO M, BONIFÁCIO KC, ITO IY. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. **J Endod**. 2000 Jul;26(7):391-4.

LEONARDO MR, ROSSI MA, SILVA LA, ITO IY, BONIFÁCIO KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. **J Endod**. 2002 Dec;28(12):815-8

LEUKO S, LEGAT A, FENDRIHAN S, STAN-LOTTER H. Evaluation of the LIVE/DEAD BacLight kit for detection of extremophilic archaea and visualization of microorganisms in environmental hypersaline samples. **Appl Environ Microbiol**. 2004 Nov;70(11):6884-6.

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 dentin. **J Endod**. 2003 Mar;29(3):187-90.

MADHUBALA MM, SRINIVASAN N, AHAMED S. Comparative evaluation of propolis and triantibiotic mixture as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. **J Endod**. 2011 Sep;37(9):1287-9.

MA J, WANG Z, SHEN Y, HAAPASALO M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. **J Endod**. 2011 Oct;37(10):1380-5.

MARCUCCI MC. Propolis: chemical composition, biological properties, and therapeutic activity. **Apidologie**. 1995;26:83-99.

MARINHO AC, MARTINHO FC, GONÇALVES LM, RABANG HR, GOMES BP. Does the Reciproc file remove root canal bacteria and endotoxins as effectively as multifile rotary systems? **Int Endod J**. 2014 Jul 29.

MARTINHO FC, CHIESA WM, MARINHO AC, ZAIA AA, FERRAZ CC, ALMEIDA JF, SOUZA-FILHO FJ, GOMES BP. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. **J Endod**. 2010 Nov;36(11):1766-9.

MATTIGATTI S, RATNAKAR P, MOTURI S, VARMA S, RAIRAM S. Antimicrobial effect of conventional root canal medicaments vs propolis against *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **J Contemp Dent Pract**. 2012 May 1;13(3):305-9.

MCKENNA SM, DAVIES KJ. The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bactericidal activity of phagocytes. **Biochem J**. 1988 Sep 15;254(3):685-92.

METZGER Z, BASRANI B, GOODIS H. Instruments, materials, and devices. In: Hargreaves KM, Cohen S, editors. *Pathways of the pulp*. 10th ed. St. Louis: Mosby; 2011. p. 283-348.

MOHAMMADI Z, DUMMER PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. **Int Endod J**. 2011 Aug;44(8):697-730.

MOHAMMADI Z, GIARDINO L, PALAZZI F, SHALAVI S, FARAHANI MF. Substantivity of three concentrations of tetraclean in bovine root dentin. **Chonnam Med J**. 2012 Dec;48(3):155-8.

MOHAMMADI Z, SHALAVI S. Is chlorhexidine an ideal vehicle for calcium hydroxide? A microbiologic review. **Iran Endod J**. 2012;7:115-22.

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.

MONCLA BJ, GUEVARA PW, WALLACE JA, MARCUCCI MC, NOR JE, BRETZ WA. The inhibitory activity of typified propolis against *Enterococcus* species. **Z Naturforsch C**. 2012 May-Jun;67(5-6):249-56.

MONTERO JC, MORI GG. Assessment of ion diffusion from a calcium hydroxide-propolis paste through dentin. **Braz Oral Res**. 2012 Jul -Aug;26(4):318-22.

MORI GG, NUNES DC, CASTILHO LR, DE MORAES IG, POI WR. Propolis as storage media for avulsed teeth: microscopic and morphometric analysis in rats. **Dent Traumatol**. 2010 Feb;26(1):80-5.

MIRZOEVA OK, GRISHANIN RN, CALDER PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiol Res**. 1997;152:239-46.

NAIR PN, SJÖGREN U, KREY G, KAHNBERG KE, SUNDQVIST G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. **J Endod**. 1990 Dec;16(12):580-8.

NELSON FILHO P, SILVA LA, LEONARDO MR, UTRILLA LS, FIGUEIREDO F. Connective tissue responses to calcium hydroxide-based root canal medicaments. **Int Endod J**. 1999 Aug;32(4):303-11.

NERWICH A, FIGDOR D, MESSER HH. pH changes in root dentin over a 4 week period following root canal dressing with calcium hydroxide. **J Endod** 1993;19: 302–6.

ORDINOLA-ZAPATA R, BRAMANTE CM, GRAEFF MS, DEL CARPIO PEROCHENA A, VIVAN RR, CAMARGO EJ, GARCIA RB, BERNARDINELI N, GUTMANN JL, DE MORAES IG. Depth and percentage of penetration of endodontic sealers into dentinal tubules after root canal obturation using a lateral compaction technique: a confocal laser scanning microscopy study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2009 Sep;108(3):450-7.

PACIOS MG, DE LA CASA ML DE, BULACIO M DE LOS A, LOPEZ ME. Influence of different vehicles on the pH of calcium hydroxide pastes. **J Oral Sci** 2004;46:107–11.

PARK YK, KOO MH, ABREU JA, IKEGAKI M, CURY JA, ROSALEN PL. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Curr Microbiol** 1998;36:24—8.

PETERS LB, VAN WINKELHOFF AJ, BUIJS JF, WESSELINK PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. **Int Endod J** 2002;35:13-21.

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

RATHKE A, MEISOHLE D, BOKELMANN J, HALLER B. Antibacterial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine containing points against *Fusobacterium nucleatum* and *Parvimonas micra*. **Eur J Dent.** 2012 Oct;6(4):434-9.

RICUCCI D, GRÖNDAHL K, BERGENHOLTZ G. Periapical status of root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration or caries. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2000 Sep;90(3):354-9.

RICUCCI D, SIQUEIRA JF JR. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. **J Endod.** 2010 Aug;36(8):1277-88.

RÔÇAS IN, BAUMGARTNER JC, XIA T, SIQUEIRA JF JR. Prevalence of selected bacterial named species and uncultivated phylotypes in endodontic abscesses from two geographic locations. **J Endod** 2006;32:1135– 8.

RÔÇAS IN, SIQUEIRA JF JR, ABOIM MC, ROSADO AS. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2004 Dec;98(6):741-9.

RÔÇAS IN, SIQUEIRA JF JR, SANTOS KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J Endod.** 2004 May;30(5):315-20.

RUSSELL AD, DAY MJ. Antibacterial activity of chlorhexidine. *J Hosp Infect.* 1993 Dec;25(4):229-38. SAITO H, KOBAYASHI H. Bacterial responses to alkaline stress. **Sci Prog.** 2003;86(Pt 4):271-82.

SAATCHI M, SHOKRANEH A, NAVAEI H, MARACY MR, SHOJAEI H. Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. **J Appl Oral Sci.** 2014 Sep-Oct;22(5):356-65.

SAFAVI KE, SPANGBERG LS, LANGE LAND K. Root canal dentinal tubule disinfection. **J Endod.** 1990 May;16(5):207-10.

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

SCHIRRMMEISTER JF, LIEBENOW AL, BRAUN G, WITTMER A, HELLWIG E, AL-AHMAD A. Detection and eradication of microorganisms in root-filled teeth associated with periradicular lesions: an in vivo study. **J Endod.** 2007 May;33(5):536-40.

SCHIRRMMEISTER JF, LIEBENOW AL, PELZ K, WITTMER A, SERR A, HELLWIG E, AL-AHMAD A. New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. **J Endod.** 2009 Feb;35(2):169-74.

SILVA FB, ALMEIDA JM, SOUSA SMG. Natural medicaments in endodontics- a comparative study of the anti-inflammatory action. **Braz Oral Res.** 2004 Apr/Jun; 18(2):174-9.

SIMON ST, BHAT KS, FRANCIS R. Effect of four vehicles on the pH of calcium hydroxide and the release of calcium ion. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 1995;80:459-464.

SIQUEIRA JR, J F. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. **Int Endod J.** 2000 Aug; 34, 1–10.

SIQUEIRA JR, JF, BATISTA MM, FRAGA RC, DE UZEDA M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. **J Endod.** 1998 Jun;24(6):414-6.

SIQUEIRA JF JR, LOPES HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **Int Endod J.** 1999 Sep;32(5):361-9.

SIQUEIRA JR, J.F.; LOPES, H.P.; ESTRELA, C. Tratamento endodôntico em dentes com rizogênese incompleta. **Endodontia: biologia e técnica**; 2a ed. ; Medsi: Guanabara Koogan; 2004; cap. 23, p.707-725

SIQUEIRA JF JR, MAGALHÃES KM, RÔÇAS IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. **J Endod.** 2007 Jun;33(6):667-72. Epub 2007 Mar 26.

SIQUEIRA JF JR, RÔÇAS IN, RICHE FN, PROVENZANO JC. Clinical outcome of the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using an antimicrobial protocol. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2008 Nov;106(5):757-62.

SIQUEIRA JF JR, DE UZEDA M, FONSECA ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. **J Endod.** 1996 Jun;22(6):308-10.

SIQUEIRA, JF JR; UZEDA, M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. **J Endod.** 1996;22:674–676.

SIQUEIRA JF JR, DE UZEDA M. Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. **J Endod.** 1998 Oct;24(10):663-5.

SIQUEIRA, JF JR; UZEDA, M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. **J Endodon.** 1997;23:167–169.

SIQUEIRA JF JR, RÔÇAS IN. The microbiota of acute apical abscesses. **J Dent Res** 2009; 88:61–5.

SIRÉN EK, HAAPASALO MP, WALTIMO TM, 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.

SKUCAITE N, PECIULIENE V, VITKAUSKIENE A, MACHIULSKIENE V. Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis. **J Endod.** 2010 Oct;36(10):1611-6.

SJÖGREN U, FIGDOR D, SPÅNGBERG L, SUNDQVIST G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. **Int Endod J.** 1991 May;24(3):119-25.

SJOGREN U, HAGGLUND B, SUNDQVIST G, WING K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. **J Endod.** 1990 Oct;16(10):498-504.

SILVA FB, ALMEIDA JM, SOUSA SMG. Natural medicaments in endodontics- a comparative study of the anti-inflammatory action. **Braz Oral Res.** 2004 Apr/Jun; 18(2):174-9.

SILVEIRA AM, LOPES HP, SIQUEIRA JF JR, MACEDO SB, CONSOLARO A. Periradicular repair after two-visit endodontic treatment using two different intracanal medications compared to single-visit endodontic treatment. **Braz Dent J.** 2007;18(4):299-304.

SOARES JA, LEONARDO MR, DA SILVA LA, TANOMARU FILHO M, ITO IY. Effect of rotary instrumentation and of the association of calcium hydroxide and chlorhexidine on the antiseptics of the root canal system in dogs. **Braz Oral Res.** 2006 Apr-Jun;20(2):120-6.

SOEKANTO A, KASUGAI S, MATAKI S, OHYA K, OGURA H. Toxicity of camphorated phenol and camphorated parachlorophenol in dental pulp cell culture. **J Endod.** 1996 Jun;22(6):284-9.

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.

SUNDQVIST G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiol Immunol.** 1992 Oct;7(5):257-62.

SUNDQVIST G, FIGDOR D (2003) Life as an endodontic pathogen. **Endodontic Topics** 6, 3–28.

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

SUNDQVIST KG, EHRNST A. Cytoskeletal control of surface membrane mobility. **Nature.** 1976 Nov 18;264(5583):226-31.

TAKAISI-KIKUNI N.B.; SCHILCHER H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Med.**, v.60, p. 222-7, 1994.

TERVIT C, PAQUETTE L, TORNECK CD, BASRANI B, FRIEDMAN S. Proportion of healed teeth with apical periodontitis medicated with two percent chlorhexidine gluconate liquid: a case-series study. **J Endod.** 2009 Sep;35(9):1182-5.

THOMAS PA, BHAT KS, KOTIAN KM. Antibacterial properties of dilute formocresol and eugenol and propylene glycol. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1980, Feb;49(2):166-70.

USUI K, HISHINUMA T, YAMAGUCHI H, TACHIIRI N, GOTO J. Determination of chlorhexidine (CHD) and nonylphenoethoxylates (NPEOn) using LC-ESI-MS method and application to hemolyzed blood. **J Chromatogr B** 2006;831:105–9.

VAHDATY A, PITT FORD TR, WILSON RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. **Endod Dent Traumatol**. 1993 Dec;9(6):243-8.

VIANNA ME, HORZ HP, CONRADS G, ZAIA AA, SOUZA-FILHO FJ, GOMES BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. **Oral Microbiol Immunol**. 2007 Dec;22(6):411-8.

VILLAS-BÔAS MH, BERNARDINELI N, CAVENAGO BC, MARCIANO M, DEL CARPIO-PEROCHENA A, DE MORAES IG, DUARTE MH, BRAMANTE CM, ORDINOLA-ZAPATA R. Micro-computed tomography study of the internal anatomy of mesial root canals of mandibular molars. **J Endod**. 2011 Dec;37(12):1682-6.

WALTON RE. Intracanal medicaments. **Dent Clin North Am**. 1984 Oct;28(4):783-96.

WANG CS, ARNOLD RR, TROPE M, TEIXEIRA FB. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. **J Endod**. 2007 Nov;33(11):1283-9.

WANG JD, HUME WR. Diffusion of hydrogen ion and hydroxyl ion from various sources of through dentine. **Int Endod J** 1988;21:17–26.

World Health Organization. International Agency for Research on Cancer: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans—Occupational Exposures of Hairdressers and Barbers and Personal Use of Hair Colourants; Some

Hair Dyes, Cosmetic Colourants, Industrial Dyestuffs and Aromatic Amines. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1993. 1–436.

YEUNG SY, HUANG CS, CHAN CP, LIN CP, LIN HN, LEE PH, JIA HW, HUANG SK, JENG JH, CHANG MC. Antioxidant and pro-oxidant properties of chlorhexidine and its interaction with calcium hydroxide solutions. **Int Endod J** 2007;40: 837–44.

YUCEL AC, AKSOY A, ERTAS E, GUVENC D. The pH changes of calcium hydroxide mixed with six different vehicles. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2007; 103:712–7.

ZAPATA RO, BRAMANTE CM, DE MORAES IG, BERNARDINELI N, GASPAROTO TH, GRAEFF MS, CAMPANELLI AP, GARCIA RB. Confocal laser scanning

microscopy is appropriate to detect viability of *Enterococcus faecalis* in infected dentin. **J Endod.** 2008 Oct;34(10):1198-201.

ZERELLA JA, FOUAD AF, SPÅNGBERG LS. E SUNDQVIST G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1994 Oct;78(4):522-30.