UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

Layla Reginna Silva Munhoz de Vasconcelos

**Tempo de ação antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio
associadas a agitação ultrassônica**

BAURU
2015

Layla Reginna Silva Munhoz de Vasconcelos

**Tempo de ação antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio
associadas a agitação ultrassônica**

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

V441t

Vasconcelos, Layla Reginna Silva Munhoz
Tempo de ação antimicrobiana de pastas de
hidróxido de cálcio associadas a agitação
ultrassônica / Layla Reginna Silva Munhoz de
Vasconcelos– Bauru, 2015.

p. :107 il. ; 31cm.

Dissertação (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 razão por que a despedida nos dói tanto é que nossas almas estão ligadas. Talvez sempre tenham sido e sempre serão. Talvez nós tenhamos vivido mil vidas antes desta e em cada uma delas nós nos encontramos. E talvez a cada vez tenhamos sido forçados a nos separar pelos mesmos motivos. Isso significa que este adeus é ao mesmo tempo um adeus pelos últimos dez mil anos e um prelúdio do que virá.”

Nicholas Sparks

A Deus, que me deu a vida de presente e me proporcionou estar aqui neste momento.

Aos meus avós e Bisavó pelo apoio e incentivo que me deram e dão até hoje. O amor e carinho de vocês foi o que me deu coragem para correr atrás de meus objetivos.

Aos meus pais **Marcus Vinicius e Rosemeire**, e minha irmã **Larissa**, que são o meu porto seguro. Por estarem sempre do meu lado, sempre me apoiando e incentivando a buscar meus objetivos. Suportaram e entenderam a distância que vivemos, e a saudade que sentimos. Muitas vezes sacrificaram seus sonhos pra que alcançasse os meus, a quem devo tudo. Me deram forças pra continuar quando pensei em desistir, me deram conselhos que me fizeram crescer. Me apoiaram sempre nas minhas decisões. Vocês me fizeram querer chegar onde cheguei e sem vocês não continuaria, vocês foram essenciais para essa conquista e crescimento. Vocês tornaram o meu sonho possível e hoje realizado. Obrigada, amo incondicionalmente cada um de vocês.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço a minha irmã **Larissa**, que tanto amo, minha melhor amiga, minha vida, é tão difícil falar de você Maninha. Você que me apresentou essa nossa profissão tão linda, que tenho paixão de exercer. Você sabe que foi MUITO importante para essa conquista. Obrigada por todas as vezes que você esteve do meu lado, todas as vezes que me acobertou, por ser sempre minha aliada, mesmo que estivéssemos brigadas, obrigada por toda a cumplicidade durante todos esses anos, obrigada por ser a irmã mais perfeita do mundo, Sabe né que o nosso amor não é de hoje. Você é incrivelmente maravilhosa! EU TE AMO!

Agradeço ao meu **Dinho Rafael**, obrigada Dinho, você acompanhou tudo bem de perto. Você sabe que acima de tudo é um grande amigo, amo você como um irmão, sei que sempre que precisar posso contar com você e você pode sempre contar comigo! Você é uma pessoa maravilhosa, obrigada por fazer parte de tudo isso, e ter me dado forças quando precisei!

Agradeço ao meu namorado **Rodrigo**, pela paciência diária. Por me ouvir tanto nos momentos de desespero como nos de alegria. Por me apoiar e sempre ser sincero. Pelo seu companheirismo, por sempre me colocar pra cima quando estou desacreditada, por sempre estar disposto a me ajudar. Por sempre me fazer sentir melhor quando estava por perto, pelos bons momentos, risadas e conversas. Amor, obrigada pelo amor, carinho, companheirismo, amizade, preocupação, enfim, por tudo o que você fez e demonstrou por mim durante esse tempo.

Ao meu pai **Marcus**, por desde o início nunca ter desistido de mim e pela constante preocupação em fazer tudo dar certo. Por acreditar em meus ideais e me apoiar em todos os momentos da minha vida. Você é o meu melhor exemplo de caráter, bondade, honestidade, força e perseverança. Pai, você é o meu maior orgulho e se eu cheguei onde estou hoje, sem dúvida devo isso a você. Muito obrigada por tudo, sempre!

À minha mãe **Rosemeire**, pela preocupação diária. Pela amizade, amor, carinho, paciência, confiança e esforço em fazer por mim tudo o que há de melhor. Por me apoiar, acreditar e me convencer de que eu posso seguir e atingir meus objetivos com dignidade. Agradeço a Deus todos os dias por Ele ter me dado você como mãe. Obrigada por existir e por sua presença constante em minha vida!

Vocês me proporcionaram os melhores momentos da minha vida. A nossa família é o meu maior orgulho, como nos amamos, como somos amigos, cúmplices, estamos juntos sempre. Senti muita falta de vocês durante esses 8 anos que estive fora de casa. Quero ser como vocês, vocês são meu maior exemplo, meu maior orgulho. Obrigada por todo o apoio, por acreditarem em mim, por me levantarem toda vez que eu caio, por me acalmarem toda vez que fico nervosa. Tudo que sou hoje devo a vocês, que muitas vezes deixaram os seus sonhos para que eu realizasse os meus. Estiveram comigo sempre e vão estar para sempre. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida, as que eu mais amo, vocês são tudo pra mim! Amo incondicionalmente vocês! Obrigada por terem escolhido serem meus pais!

Obrigada a todos, sem vocês nada disso seria possível!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, que sem ele nada disso seria possível, pois tudo acontece da maneira que ele escreveu para cada um de nós! Agradeço por toda a força de enfrentar e nunca desistir dos meus sonhos. Agradeço por ter me dado o maior presente da minha vida, a minha família, que tanto amo e tanto me apóia em todos os momentos.

À Faculdade de Odontologia de Bauru, por proporcionar a estrutura para formar e transformar alunos em profissionais da melhor qualidade.

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

Agradeço a minha professora orientadora **Flaviana** que foi a mentora desse trabalho! Agradeço seus ensinamentos. Todas as boas ideias para o desenvolvimento da pesquisa, toda compreensão, apoio, todas as risadas. Obrigada por acreditar no meu potencial e confiar tanto no meu trabalho. Meu pai sempre diz que aquilo que aprendemos levamos para toda a vida, e ninguém pode nos tirar. Cada aprendizado nos faz melhor! Levamos conosco as pessoas que nos ensinam com carinho, nunca esquecerei você professora e tudo que me ensinou. Gostaria que você soubesse que te admiro muito, pelo seu esforço, competência, atenção, dedicação e empenho. Com você aprendi que pra conseguirmos alcançar alguns objetivos temos que ter disciplina, perseverança e me esforçar ao máximo, e então o resultado chega. Obrigada por fazer parte dessa conquista. Você se tornou além de tudo uma grande amiga!

À minha amiga e companheira de trabalho **Thais**, por todo o tempo que dividimos juntas, seja no lazer ou no trabalho. Pela amizade durante esses 2 anos, pela cumplicidade, companhia, por dividir comigo as dificuldades e tornar as coisas mais fáceis, mesmo quando já estava impossível. Pelas risadas sobre coisas engraçadas e pelas risadas nervosas que compartilhamos. Por dividir comigo problemas diários e pela tentativa de me ajudar a resolvê-los. Por todas as noites de festa ou mesmo pelos finais de semana de laboratório.

Thais, obrigada pela amizade, por ser colaboradora desta pesquisa, pela grande ajuda que me deu nesta dissertação, e é claro, por dividir comigo momentos tão especiais da minha vida, afinal você é uma amiga mais que especial! Conte comigo sempre.

A amizade da **Raquel** e da **Paloma**, que eu tive o privilégio de trabalhar junto ainda na graduação e tanto admiro. Obrigada meninas, por todas as conversas, todas as risadas, todo o apoio e por me incentivarem sempre a continuar e acreditarem em mim, nunca vou esquecer de vocês, tenham certeza que tem uma pessoa que tem um grande carinho por vocês.

Agradeço a minha turma de mestrado **Thais, Samuel, Murilo e Sávio**, pela boa convivência, pela ajuda que sempre estiveram dispostos, pelo carinho e por torcerem por mim. Obrigada pelas boas risadas.

A todos os pós-graduandos do departamento por sempre convivermos bem, por toda a ajuda, pela paciência em explicar tudo que precisei, por ajudar a trilhar esse caminho, e com boas amizades tornar mais leve essa caminhada.

Aos professores Ivaldo Gomes de Moraes, Roberto Brandão, Clóvis Bramante e Norberti Bernadineli, Marco Antonio e Flaviana Andrade, Rodrigo Vivan, pela hospitalidade e bom relacionamento com os alunos, por todo o conhecimento transmitido e pelas correções, sugestões, críticas sempre construtivas e, principalmente, pelos incentivos ao longo desses anos, objetivando o nosso crescimento profissional e pessoal. Agradeço imensamente pela oportunidade da experiência vivida e pelo privilégio de ter absorvido um pouco do conhecimento de todos vocês.

A banca examinadora **Prof. Dr. Marco Antonio Húngaro Duarte** e **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo V. Berbert**, por se colocaram a disposição tão prontamente pra estarem aqui hoje, em um momento tão importante da minha carreira profissional, fazendo suas considerações sobre o trabalho e enriquecendo-o com as suas idéias.

Aos funcionários do departamento de Endodontia, **Suely, Andressa** e **Edimauro**, por sua ajuda, atenção, gentileza e convivência.

A **Marcia Graeff** que realiza o seu trabalho com muito amor e carinho, que tanto me ajudou nessa pesquisa, se tornou uma grande amiga. Obrigada pelas conversas durante as análises, pela compreensão e pela imensa torcida para que enfim tivéssemos bons resultados.

Agradeço a Todos os **meus familiares**, tios, tias, primos e primas, que sei que torceram e rezaram muito para que alcançasse todos os meus objetivos, e hoje estou aqui para dizer que conclui uma etapa, e todos vocês fizeram parte disso.

A minha grande amiga **Beatriz**, que nesses 6 anos de amizade se mostrou uma irmã pra mim durante toda a estada em Bauru. Obrigada amiga por cada momento vivido, por cada conversa, por cada incentivo, obrigada por ter me recebido na sua casa e ter sempre me apoiado, por ter acreditado em mim, pelas parcerias em trabalhos. Obrigada por ser essa amiga maravilhosa, amo você! Conte sempre comigo!

A minha família de Bauru que eu tanto amo **Letícia, Tiago, Deise e Beto**, obrigada em primeiro lugar por todo o amor que vocês me concederam, por me aceitar na família de vocês, na casa de vocês e me fazer sentir tão bem por estar perto de vocês. Obrigada por toda a força, todo o incentivo, toda a dedicação e todo o carinho que sempre tiveram comigo. Obrigada pelas risadas, pelo colo quando precisei, pelos abraços, pelas comidas, saídas, dietas e por tornarem essa minha estada em Bauru mais fácil. Vocês são pessoas maravilhosas, nunca terei como agradecer tudo o que vocês fizeram por mim, amo vocês.

"A vida - entendeu - era bem parecida com uma música.

No começo há mistério, e no final, confirmação, mas é no meio que reside a emoção e faz com que a coisa toda valha a pena. (...) Finalmente, havia entendido que a presença de Deus está em todo lugar, em todos os momentos e é sentida, em um momento ou outro, por todas as pessoas. (...) Deus - entendeu subitamente - era o amor em sua mais pura forma."

(Nicholas Sparks)

RESUMO

Tempo de ação antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio associadas a agitação ultrassônica

O objetivo foi avaliar através da Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL) e cultura microbiológica (CM) a influência do veículo propilenoglicol e água destilada e agitação ultrassônica (U) na atividade antimicrobiana e penetrabilidade de pastas de hidróxido de cálcio (HC), em diferentes tempos de manutenção da medicação intra-canal. Para isso cento e noventa e três tubos de dentina bovina padronizados foram infectados com *Enterococcus faecalis* em caldo BHI (Brain Heart Infusion) utilizando um novo protocolo de contaminação com dois ciclos de centrifugação por 5 dias. Durante o período experimental os espécimes foram divididos em 8 grupos de acordo com o veículo da pasta de HC, água destilada (Ad) e propilenoglicol (prop), com o uso do ultrassom, e tempo experimental e de 7 e 15 dias: Grupo1- HC+pro+15d, Grupo 2 – HC+prop+U+15d, Grupo3 – HC+prop+7d, Grupo 4 – HC+prop+U+7d Grupo5- HC+Ad+15d, Grupo 6 – HC+Ad+U+15d, Grupo7 – HC+Ad+7d, Grupo8 – HC+Ad+U+7d . A agitação ultrassônica foi realizada durante 1 minuto nas direções vestibulo-lingual e mésio-distal, com o auxílio de um inserto liso. As medicações permaneceram no interior dos espécimes durante cada período experimental. A MCVL analisou as bactérias viáveis (verde) e mortas (vermelho), com o auxílio do corante Live and Dead® nos tubos de dentina após o período de medicação. A contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) foi realizada a partir da cultura microbiológica (CM). As raspas de dentina foram coletadas e diluídas para semeadura em placas de Petri com ágar BHI. Para a penetração foi utilizado o corante Rodamina B durante a manipulação das pastas de HC e as análises feitas por MCVL. O grupo 3 e 7 mostraram a maior viabilidade bacteriana nos tubos de dentina contaminados e os demais grupos as menores. A agitação ultrassônica (U) reduziu significativamente a viabilidade bacteriana, nos diferentes períodos. A pasta de HC + Prop+U 7 e 15 dias, mostraram-se mais eficazes, seguidas pela pasta HC+Ad+U+15. Concluiu-se que todas as pastas demonstraram ação antimicrobiana contra *E. faecalis* e com melhor desempenho quando potencializadas com ultrassom, mesmo em períodos de 7 dias, podendo ser de escolha clínica um curativo que permaneça menor tempo no interior do canal com a mesma efetividade, otimizando o tratamento endodôntico.

Palavras-chave: Hidróxido de cálcio, ultrassom, *Enterococcus faecalis*, medicação intracanal.

ABSTRACT

Time evaluation of antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes subjected to ultrasonic activation.

The purpose was to evaluate using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) and microbiological cultures (MC) of infected dentin the influence of veicol propylene glycol (prop) or distilled water (Ad) and ultrasonic agitation (U) on the antimicrobial potential and penetrability of calcium hydroxide (CH) pastes). one hundred ninety-three cylindrical dentin specimens were infected with *Enterococcus faecalis* in BHI broth using a new contamination protocol for 5 days with centrifugations. During the experimental period, the specimens were divided into 8 groups and dressed with the following during 7 or 15 days: Group1- HC+pro+15d, Group 2 – HC+prop+U+15d, Group 3 – HC+prop+7d, Group 4 – HC+prop+U+7d Group 5- HC+Ad+15d, Group 6 – HC+Ad+U+15d, Group 7 – HC+Ad+7d, Group 8 – HC+Ad+U+7d. The ultrasonic activation was made during 1 minute in both directions (buccal-lingual / mesio-distal), with the aid of a plain point insertion. The medications remained in the root canals for each experimental period. The CLSM analyzed the viable (green) and dead (red) bacteria in the infected dentinal tubules, with Live and Dead dye. The colony forming units (CFUs) count was made possible with the MC method. The dentinal wall debris were collected and diluted to be seeded on Petri BHI-agar plates. For the penetration test, the dye Rodamine B was added to CH pastes during the manipulation and analysed by CLSM. The groups 3 and 7 showed the greatest bacteria viability in the infected dentinal tubes and the other groups the lowest,. The pastes HC + Prop+U 7 and 15 days performed more efficacy, followed by HC+Ad+U+15d paste . We conclude that all the paste tested demonstrated antimicrobial activity against *E. faecalis* from calcium hydroxide paste with propylene glycol and distilled water when leveraged with ultrasound, even in periods of seven days. Therefore, a dressing that remains less time inside the root canal with the same effectiveness can be the choice in clinical practice, optimizing the endodontic treatment.

Key words: Calcium hydroxide. Ultrasonic agitation. *Enterococcus faecalis*. Intracanal medication

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1	- Imagem dos espécimes preparadas a partir de tubos de dentina bovina, cortados, instrumentados e impermeabilizados	44
Figura 2	- Imagem dos espécimes nos microtubos em banho ultrassônico	45
Figura 3	- Imagem por MCVL da dentina contaminada de um espécime do estudo piloto	51
Figura 4	- Imagens por MCVL da dentina contaminada após as medicações dos grupos G1, G2 e G3 na região superficial e na região profunda	53
Figura 5	- Esquema mostrando a porção superficial e profunda do canal radicular, representando os locais para aquisição de imagens em MCVL.....	65
Figura 6	- Imagens por MCVL da dentina contaminada após as medicações dos grupos G4, G5 e G6 na região superficial e na região profunda	67
Figura 7	- Imagens por MCVL da dentina contaminada após as medicações dos grupos G7, G8 e do controle positivo na região superficial e na região profunda	69
Figura 8	- Imagens por MCVL da penetração das medicações nos túbulos dentinários em cortes a 3mm e 5mm da região mais apical do espécime.....	77

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - Porcentagem de bactérias vivas na área selecionada ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), após medicação intracanal dos diferentes grupos experimentais através de microscopia confocal de varredura à laser	60
Gráfico 2 - Porcentagem de bactérias vivas na área selecionada ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), no terço cervical, após medicação intra-canal dos diferentes grupos	61
Gráfico 3 - Porcentagem de bactérias vivas na área selecionada ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), nos terços médio, após medicação intra-canal dos diferentes grupos	61
Gráfico 4 - Porcentagem de bactérias vivas por($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), na região superficial, após medicação intra-canal dos diferentes grupos	62
Gráfico 5 - Porcentagem de bactérias vivas ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), na região profunda, após medicação intra-canal dos diferentes grupos	63
Gráfico 6 - Quantidade de UFC/mL entre cada grupo, após medicação intra-canal durante os períodos experimentais	71
Gráfico 7 - Quantidade de UFC/mL entre cada grupo na região superficial e profunda da dentina, após medicação intra-canal durante os períodos experimentais.....	72
Gráfico 8 - Medianas das profundidades de penetração dos diferentes grupos testados.....	74
Gráfico 9 - Profundidade de penetração das diferentes medicações intra-canal no terço médio e cervical.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de UFC/mL por grupo para cada coleta realizada com a brica de largo 5 (L5) e broca de largo 6 (L6), quantidade de UFCs total e quantidade de placas que não apresentaram crescimento microbiano	72
---	----

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
EDTA	Ácido etilediamino tetra-ácetico
MCVL	Microscópio Confocal de Varredura a Laser
UFC	Unidade formadora de colônia
FDA	Diacetato de Fluoresceína
PI	Iodeto de Propídio
HC	Hidróxido de cálcio
U	Ustrassom
Prop	Propilenoglicol
Ad	água destilada
15d	Quinze dias
7d	Sete dias
PSCM	Placas sem crescimento microbiano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
3	PROPOSIÇÃO	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	MICRO-ORGANISMOS	43
4.2	ANTIMICROBIANOS	44
4.3	TUBOS DE DENTINA	44
4.4	PROTOCOLO DE CONTAMINAÇÃO	45
4.5	MEDICAÇÃO INTRA-CANAL	47
4.6	ANÁLISE NO MICROSCÓPIO CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (MCVL)	53
4.7	CULTURA MICROBIOLÓGICA	54
4.8	AVALIAÇÃO DA PENETRABILIDADE DAS PASTAS POR MCVL	54
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
5	RESULTADOS	59
5.1	AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (MCVL)	59
5.2	AVALIAÇÃO POR CULTURA MICROBIOLÓGICA	71
5.3	AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO INTRA-TUBULAR DAS PASTAS	73
6	DISCUSSÃO	81
6.1	DA METODOLOGIA	81
6.2	DOS RESULTADOS	85
7	CONCLUSÕES	93
8	REFERÊNCIAS	97

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

As bactérias são a principal causa de doenças pulpares e periapicais (KAKEHASHI, STANLEY, FITZGERALD, 1965; DAHLEN et al., 1982; FABRICIUS et al., 1982; MOLLER et al., 2004). 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).

O controle microbiano é essencial na clínica endodôntica (SUNDQVIST et al., 1998; SIQUEIRA Jr, ROÇAS, 2008), pois o sucesso do tratamento endodôntico depende da redução ou eliminação da infecção intrarradicular (TRONSTAD, 1992; SIQUEIRA Jr, 2001). A persistência de bactérias intrarradiculares pode ser o principal fator de insucesso do tratamento endodôntico (NAIR et al., 2005).

Em razão da existência de áreas inacessíveis, é necessária a realização de um preparo biomecânico com instrumentos complementado com substâncias químicas irrigantes (ABBOTT, 1990). No entanto, esse preparo muitas vezes não é suficiente, podendo permanecer bactérias no sistema de canais radiculares (PETERS et al., 2002; BYSTROM, SUNDQVIST, 1981; ORSTAVIK, KEREEKES, MOLVEN, 1991).

Enterococcus faecalis é uma bactéria Gram-positiva anaeróbia facultativa, comumente encontrada em canais com lesões periapicais persistentes (SIQUEIRA Jr, RÔÇAS, 2004; SEDGLEY et al., 2006), tendo uma grande capacidade de invadir túbulos dentinários, suportar condições estritas e se adaptar a desafios letais (KAYAOGLU, ORSTAVIK, 2004).

O preparo biomecânico do sistema de canais radiculares, instrumentação e irrigação, são responsáveis pela maior eliminação de bactérias dos canais radiculares. Porém muitas vezes, a fim de otimizar a desinfecção se indica o uso de uma medicação intra-canal com uma ação antibacteriana (FERREIRA et al., 2007)

A medicação intra-canal entre sessões é uma etapa muito importante no tratamento endodôntico, reduzindo significativamente o número de bactérias dos canais radiculares (BYSTROM, SUNDQVIST, 1981).

Diversas substâncias são descritas na literatura para este fim, sendo que a principal é o Hidróxido de Cálcio, pois apresenta ação antibacteriana, através da inibição enzimática e alterações na parede celular; ação anti-exsudativa e atividade biológica 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).

Os veículos utilizados com hidróxido de cálcio interferem na velocidade de dissociação iônica, exercendo uma influência direta sobre o pH (FERREIRA et al., 2004) e sobre as atividades biológicas de bactérias e de tecidos, podendo alterar o efeito antimicrobiano do curativo, potencializando ou minimizando os mesmos (ESTRELA et al., 1995; ESTRELA e PESCE, 1996). É importante que o veículo permita que o medicamento, de forma mais eficaz, penetre em áreas que não foram atingidas pela instrumentação e irrigação e, assim, matar as bactérias remanescentes (CRUZ et al., 2002).

Os veículos são classificados por alguns autores como hidrossolúveis: aquosos (soro fisiológico, água destilada e solução anestésica) e viscosos (polietileno glicol, propilenoglicol, metilcelulose e a glicerina) e não hidrossolúveis (oleosos), como o paramonoclorofenol canforado, óleo de oliva e lipiodol (ESTRELA, PESCE, 1996; PÉCORA et al., 1993).

Propilenoglicol é um líquido incolor comumente utilizado com hidróxido de cálcio, que possui efeito antimicrobiano leve, demonstrando efeitos benéficos para o uso na endodontia, uma vez que permite a permanência de medicações intra-canais por maior período de tempo (CRUZ et al., 2002).

A água destilada também é um veículo comumente utilizado em medicamentos intra-canais e consiste em uma substância com viscosidade e tensão superficial elevada (CRUZ et al., 2002). Proporciona ao hidróxido de cálcio um elevado grau de solubilidade, tendo uma grande liberação de íons nos períodos iniciais e prolongados, da mesma forma que alguns veículos viscosos (FERREIRA et al., 2004).

Recomenda-se que a pasta de hidróxido de cálcio permaneça no interior do canal por pelo menos 14 dias, para que consiga alcançar efeitos satisfatórios na eliminação de micro-organismos (FERREIRA et al., 2004; SIQUEIRA JR et al., 2001). Quando realizado o tratamento em sessão única ou quando o medicamento é mantido por 7 dias no interior do canal, são encontrados micro-organismos em maior quantidade do que quando a medicação é mantida por 14 dias no interior do canal (HOLLAND et al. 2003).

A agitação ultrassônica da medicação de hidróxido de cálcio não vem sendo muito estudada, tendo poucos relatos na literatura. Duarte et al. (2012), demonstraram que o efeito da agitação ultrassônica da medicação intra-canal de hidróxido de cálcio foi favorável, elevando o pH na superfície externa da raiz em reabsorções radiculares externas simuladas e maior liberação de íons cálcio, nos grupos em que o ultrassom foi empregado.

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., 2011), com potencial promissor.

Baseado na escassez de evidências científicas nesta linha, este trabalho foi delineado, com o objetivo de verificar a ação antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio, quando submetidas à agitação ultrassônica sobre *E. faecalis*, além da análise do potencial antimicrobiano quando o tempo de ação do curativo é reduzido e da penetrabilidade das pastas no interior dos túbulos dentinários. Dessa forma, será avaliada a hipótese nula de que a agitação ultrassônica favorece maior ação antimicrobiana intradentinária em menos tempo de curativo intra-canal.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

O tratamento dos canais radiculares visa a eliminação dos elementos infecciosos do sistema de canais radiculares, obtendo a cura da periodontite apical. Muitos estudos mostram que as bactérias são a principal causa de doenças pulpares e periapicais (KAKEHASHI, STANLEY, FITZGERALD, 1965; MOLLER et al., 2004; DAHLEN et al., 1982; FABRICIUS et al., 1982).

As bactérias podem ser encontradas em istmos, canais laterais, ramificações e estruturas anatômicas que são inacessíveis na instrumentação mecânica. (NG et al., 2008; NAIR et al., 2005). Em razão disso, é necessária a realização de um preparo biomecânico com instrumentos complementado com substâncias químicas irrigantes (ABBOTT, 1990).

Canais radiculares infectados alojam uma variedade de bactérias que vão gerar reações periapicais (BERGENHOLTZ, 1975; SUNDQVIST e EHRNST 1976). Canais de dentes com polpa necrosada e lesão periapical apresentam uma população mista de micro-organismos, com maioria de anaeróbios estritos (63,6%) e menor quantidade de anaeróbios facultativos (34,6%). Aproximadamente 500 espécies bacterianas diferentes foram encontradas em infecções endodônticas (SIQUEIRA JR e ROÇAS, 2009).

Embora, os micro-organismos sejam removidos durante o preparo biomecânico, bactérias residuais são encontradas em cerca de 50% dos casos no momento da obturação do canal radicular, apesar da irrigação com hipoclorito de sódio (BYSTROM e SUNDQVIST, 1983).

Exames microbiológicos de dentes com inflamação periapical, mostram que bactérias viáveis são frequentemente encontradas nos 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).

A relação entre biofilmes bacterianos dentro do canal radicular, 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).

Há uma grande variedade na anatomia dos canais radiculares e os estudos atuais de anatomia interna revelam com maior clareza a grande complexidade destes sistemas e, com isso, a dificuldade para tratá-los (VILLAS BÔAS et al., 2011), Levando então em consideração a complexidade do sistema de canais radiculares e a infecção de canais com polpas necrosadas, altamente contaminados, é de grande importância um planejamento do tratamento endodôntico, devendo-se atentar a escolha do instrumento, técnica de instrumentação, solução irrigadora e medicação intra-canal.

Uma etapa importante do tratamento endodôntico é a irrigação, onde é recomendado o uso de uma substância de potencial antimicrobiano durante toda a sua realização. Para dentes com polpas necrosadas o hipoclorito de sódio é mais utilizado por apresentar muitas das características desejáveis, estando entre elas a baixa tensão superficial, capacidade de dissolução de matéria orgânica (recomendada também para polpas vitais) e ação antimicrobiana (ARIAS-MOLIZ et al., 2009).

A irrigação convencional e aspiração simultânea tem mostrado eficiência menor quando comparadas com técnicas como o Endovac® e uso de ultrassom. A irrigação ultrassônica passiva, consiste na agitação da substância irrigadora com um instrumento endodôntico fino, acionado por aparelho de ultrassom (ALVES et al. 2011).

Em dentes humanos contaminados por *E. faecalis* durante 4 semanas, a ação da irrigação ultrassônica passiva por 1 minuto com hipoclorito de sódio a 1%, e medicação intra-canal de hidróxido de cálcio por uma semana, mostram resultados satisfatórios, e ainda, a medicação intra-canal após a irrigação promoveu maior morte bacteriana (HARRISON et al., 2010).

A agitação ultrassônica do irrigante ressurgiu no cenário endodôntico com grande força. O objetivo é promover o fenômeno da cavitação no interior do líquido com as bolhas produzidas a partir das ondas acústicas. Estas bolhas chegam ao colapso e a energia liberada é transferida para a parede do canal radicular, desta

forma ocorre a liberação dos restos encontrados nas paredes dos canais, removidos posteriormente com a aspiração (AHMAD, PITTFORD, CRUM, 1987).

Há relatos que a irrigação ultrassônica final, após a instrumentação, possibilitou a mensuração de pH elevado no terço apical dos dentes analisados. Este resultado foi associado ao aumento da facilidade de difusão da pasta de hidróxido de cálcio após os procedimentos ultrassônicos, possibilitando a chegada de íons hidroxila na região apical (ZAMPRONIO, et al., 2008).

Esta modalidade de irrigação mostra-se como a forma mais eficiente de remover debris do sistema de canais radiculares, inclusive de regiões de difícil acesso, como istmos (RÖDIG et al., 2010; ALVES et al., 2011) e canais laterais, promovendo a maior redução de bactérias do sistema de canais, que apresentam áreas de difícil acesso pela complexidade anatômica presente (KLYN, KIRKPATRICK, RUTLEDGE, 2010).

Arias 2015, realizou um estudo afim de avaliar a influência da agitação ultrassônica de pastas de hidróxido de cálcio quanto a sua ação antimicrobiana e penetrabilidade, quando veiculadas em propilenoglicol com ou sem extrato etanólico de própolis. Foram utilizados ubos de dentina bovina, contaminados com *E. faecalis* durante 5 dias, então as amostras receberam a medicação e foram armazenadas em estufa bacteriológica durante 15 dias. As avaliações foram realizadas através da Microscopia Confocal de Varredura a Laser e cultura microbiológica. A agitação ultrassônica das pastas de hidróxido de cálcio potencializou o efeito antimicrobiano, e promoveu uma maior penetrabilidade das pastas quando comparadas aos grupos onde a medicação não foi agitada com ultrassom.

Vem sendo bastante estudado o uso do ultrassom no momento da obturação, a fim de avaliar a penetração dos cimentos nos túbulos dentinários, quando é utilizado esse método adicional. Guimarães et al. (2014) avaliaram os efeitos da ativação ultrassônica em 4 cimentos a base de resina epóxi, sobre a qualidade do preenchimento (penetração intra-tubular, adaptação na interface e presença de vazios). Obtiveram como resultado que a agitação ultrassônica dos cimentos a base de resina epoxi promoveu um aumento na penetração e menor quantidade de espaços vazios.

Hegde e Arora, (2015) realizaram um estudo que avaliou o efeito de diferentes técnicas de irrigação final, sobre a linha de união de um cimento obturador auto-expansivo nos diferentes terços do canal radicular. As técnicas utilizadas foram irrigação convencional, canalbrush, ultrassônica, e EndoActivator, e como irrigantes foram utilizados EDTA 17% e hipoclorito de sódio 3%. Observou-se que a irrigação final com agitação ultrassônica melhorou a linha de união do cimento testado no terço cervical e médio. Isso ocorre provavelmente pela maior remoção de smear layer, melhorando assim a adesão do cimento às paredes do canal.

Mesmo com efetivo preparo biomecânico alguns micro-organismos são dificilmente eliminados do canal radicular. Em casos de insucesso são encontradas principalmente micro-organismos Gram-positivos, o mais comumente encontrado é o *Enterococcus faecalis* (SUNDQVIST et al., 1998). São micro-organismos com grande capacidade de invasão dos túbulos dentinários, alta resistência a agentes antimicrobianos, inclusive ao hidróxido de cálcio (HC), medicação mais utilizada em Endodontia (KAYAOGLU et al., 2011). Além disso, podem superar mudanças no ambiente causadas pelo tratamento endodôntico, como redução do suprimento de nutrientes, alterações no potencial redox dessas bactérias e influências de antimicrobianos (SUNDQVIST e FIGDOR, 2003)

Evans et al (2002) mostraram que *E. faecalis* possui alguns mecanismos de resistência, tais como a presença de bomba de prótons que auxilia na acidificação do citoplasma e as torna resistente ao elevado pH, mecanismo de ação antimicrobiano da medicação de hidróxido de cálcio. A resistência fornecida com tais mecanismos não é absoluta, já que houve morte bacteriana quando o pH foi mantido em níveis iguais ou maiores a 11,5 para a medicação de hidróxido de cálcio.

Os estudos com este micro-organismo se intensificou, desde que passou a ser frequentemente observada a sua presença em infecções persistentes. Passou a ser a bactéria de escolha para testar diferentes fases do tratamento endodôntico como irrigação e medicação intra-canal, para fins de desinfecção, com resultados que mostraram sua inata capacidade de sobrevivência (DAHLÉN et al., 2000; EDDY et al., 2005; PORTENIER et al., 2005).

Foram estudados fatores de virulência como a presença de enzimas líticas, citolisina, substância de agregação, ferormônios e ácido lipoteicóico. Além disso, *E. faecalis* podem expressar proteínas capazes de alterar as respostas do hospedeiro, como a supressão de linfócitos, o que lhe confere uma alta virulência, dificultando que o organismo do hospedeiro combata o agressor, podendo contribuir para o fracasso do tratamento endodôntico (STUART et al., 2006).

A persistência de micro-organismos resistentes ao pH alcalino, mesmo depois do emprego de uma medicação a base de hidróxido de cálcio, sugere que a sobrevivência está relacionada a uma resposta adaptativa, que inclui a ativação de transporte de íons, a fim de equilibrar o pH intra-celular. Foi possível observar que a bomba de prótons é ativada em resposta a um pH alcalino. (BOOTH e KROLL 1983, BOOTH 1985, EVANS et al. 2002).

É de grande importância que não haja micro-organismos remanescentes no canal após o preparo biomecânico. Tem sido mostrado que, se o canal não é obturado ou preenchido com um antimicrobiano entre sessões, as bactérias podem se proliferar rapidamente dentro de dias, e voltar a um número próximo ao seu original (BYSTRÖM e SUNDQVIST, 1981).

Os maiores casos de insucesso no tratamento endodôntico é causado pela persistência de micro-organismos na região apical do canal já obturado (NAIR et al., 1990). A microbiota encontrada nos canais radiculares depois de falhas no tratamento endodôntico tem uma variedade muito limitada em relação aos micro-organismos detectados em canais não tratados (SUNDQVIST, 1976, SUNDQVIST 1978; WASFY et al., 1992).

Tem sido demonstrado que a contaminação remanescente pode ser controlada com o uso de uma medicação intra-canal a base de hidróxido de cálcio, através do confinamento de bactérias no interior dos túbulos (BYSTRÖM, CLAEISSON E SUNDQVIST. 1985).

Os primeiros relatos de uso de medicamentos datam de 1045 a.c., sobre o uso de óleos de vinho na boca de pacientes que apresentavam dores. Já na idade média, encontram-se relatos sobre a utilização de óleo de cravo e de madeira de faia, para essa finalidade (FOREMAN e BARNES, 1990). A maioria desses

medicamentos não eram específicas e causavam desconforto para os pacientes. A partir disso, o Hidróxido de Cálcio emergiu como um potente medicamento para ser usado intra-canal (WALTON, 1984).

O hidróxido de cálcio como medicamento intra-canal foi introduzido por Hermann no começo do século 20, a partir de então ele tem sido vastamente usado na prática clínica endodôntica (FOREMAN e BARNES, 1990) podendo ser empregado no tratamento de reabsorção radicular, componente de cimentos obturadores do canal radicular e como medicação intracanal (GEORGE et al, 2009).

As principais características de um curativo intracanal são a atividade antimicrobiana e a boa reação dos tecidos adjacentes frente ao contato (CARROTTE, 2004). O hidróxido de cálcio $[Ca(OH)_2]$ tem sido amplamente descrito para este fim, em razão de sua ação (LEONARDO et al., 2006; MOHAMMADI, DUMMER, 2011), sua capacidade de dissolver tecido orgânico (HASSELGREN e OLSSON, CVEK, 1988) e inativar bactérias e suas toxinas (SAFAVI e NICHOLS, 1993; TANOMARU et al., 2003), além do auxílio no reparo dos tecidos periapicais, induzindo a formação de tecido mineralizado (HOLLAND et al., 1980).

O seu efeito antimicrobiano está relacionado com o aumento do pH, que modifica o transporte de nutrientes e componentes orgânicos através da membrana citoplasmática, inibindo as atividades enzimáticas como o metabolismo, crescimento e divisão celular, que são essenciais para a sobrevivência bacteriana (ESTRELA e PESCE, 1996).

Essas características são altamente desejáveis em um tratamento endodôntico, uma vez que este visa o reparo do tecido periapical, e a eliminação de bactérias, que é um grande desafio.

Para que o hidróxido de cálcio produza seus efeitos é necessário que ele esteja em contato com os tecidos e ocorra a difusão iônica de maneira satisfatória, tornando dessa forma o meio alcalino o que inibe o crescimento bacteriano e promove a inativação de toxinas bacterianas, que são responsáveis pela grande patogenicidade (ZAMPRONIO et al., 2008), além da hipótese de inibição enzimática irreversível ocorrer quando o pH do hidróxido de cálcio permanece elevado durante longos períodos de tempo (ESTRELA et al., 1994).

BYSTROM, CLAEISSON, SUNDQVIST (1985) avaliaram a redução de bactérias após instrumentação e medicação intra-canal com hidróxido de cálcio em diferentes micro-organismos. Como resultado obtiveram que o *Enterococcus faecalis* foi o mais resistente, sobrevivendo em pH até 11,5 tendo uma necessidade de seis minutos de contato, no estudo *in vitro*, para sua morte, enquanto que para as demais espécies bacterianas apenas um minuto de contato direto, foi suficiente. Por outro lado, demonstraram também que com pH de 12,5 nenhum dos micro-organismos resistiu, mostrando que o hidróxido de cálcio é um potente agente antimicrobiano, sendo capaz de eliminar grande quantidade de micro-organismos, inclusive o *E. faecalis*.

Os veículos utilizados com hidróxido de cálcio interferem na velocidade de dissociação iônica, exercendo uma influência direta sobre o pH (FERREIRA et al., 2004), atividades biológicas de bactérias e de tecidos, podendo alterar o efeito antimicrobiano do curativo, potencializando ou minimizando os mesmos (ESTRELA et al., 1995; ESTRELA e PESCE, 1996).

Os veículos são classificados por alguns autores como hidrossolúveis: aquosos (soro fisiológico, água destilada e solução anestésica) e viscosos (polietileno glicol, propilenoglicol, metilcelulose e a glicerina) e não hidrossolúveis (oleosos), como o paramonoclorofenol canforado, óleo de oliva e lipiodol (ESTRELA e PESCE, 1996; PÉCORA et al., 1993).

Um veículo eficiente é útil para permitir que o medicamento, de forma mais eficaz, penetre em áreas que não foram atingidas pela instrumentação e irrigação e, assim, matar as bactérias remanescentes (CRUZ et al., 2002).

Vários estudos têm 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 veiculado com água destilada, os íons cálcio e hidroxila são liberados com rapidez e esta pasta apresenta alto grau de solubilidade quando em contato direto com fuidos teciduais. Para desinfecção entre sessões a

curto prazo, a característica de rápida liberação de íons é desejável (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), quando usado em concentrações acima de 20%, tem demonstrado forte ação antibacteriana contra micro-organismos comumente encontrados nos canais radiculares (SAFAVI e NAKAYAMA, 2000). Uma vantagem consagrada na prática clínica é a facilidade de manipulação das pastas quando preparadas com propilenoglicol (SIMON, BHAT e FRANCIS, 1995).

SIMON, BHAT e FRANCIS (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. Um estudo mostrou que ele possui as vantagens do etilenoglicol, mas com baixa toxicidade e pouco efeito acumulativo (SEIDENFELD, HAZLIK, 1932).

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.

A maior limitação do uso de pastas de hidróxido de cálcio é o tempo que deve ser deixada no canal radicular para que promova seus efeitos. Estudos demonstram que o tempo de permanência recomendado do medicamento entre sessões, para veículos viscosos e aquosos é de 14 a 21 dias, para que promova os efeitos desejáveis (SIQUEIRA Jr et al., 2001; HOLLAND et al., 2003; FERREIRA et al., 2004).

O hidróxido de cálcio não é tão efetivo quando usado em curto prazo e não é recomendado como irrigante, mas sim como curativo de demora entre sessões e,

para que se obtenha uma boa atividade antimicrobiana é necessário que seja utilizado por longo período (PETERS e PETERS, 2011)

Silveira et al. (2001) avaliaram o efeito antimicrobiano de pastas a base de hidróxido de cálcio empregada como curativo de demora em pré-molares de cães com lesão periapical crônica, com 7, 15 e 30 dias de curativo. Após esses períodos os cortes histológicos obtidos foram corados pelo método Brown & Brenn. O grupo de 7 dias obteve os piores resultados, sendo que 85,5% dos espécimes apresentaram micro-organismos presentes e em 50% estavam presentes nos túbulos dentinários, seguido do grupo de 15 dias, onde 73,33% dos espécimes apresentaram micro-organismos, em apenas 26,66% estavam presentes nos túbulos dentinários. No grupo de 30 dias 53,33% apresentaram micro-organismos e em 33,33% dos casos estavam presentes nos túbulos dentinários. Os resultados mostram melhor efeito antimicrobiano do curativo mantido por 30 dias, resultados satisfatórios quanto à descontaminação intra-tubular do curativo mantido por 15 dias, e resultados ruins quando a medicação foi mantida somente por 7 dias.

Holland et al. (2003) realizou um estudo a fim de observar o processo de reparo e micro-organismos presentes em dentes de cães com periodontite apical após o tratamento de canal em sessão única ou duas sessões. Os dentes foram deixados expostos ao meio bucal durante 6 meses para que houvesse a contaminação e formação das lesões, então os canais foram tratados, e divididos nos grupos sem curativo, 7 dias de curativo e 14 dias de curativo. O grupo em que o curativo foi mantido por 14 dias obteve o melhor reparo apical seguido pelo grupo de 7 dias. Para essa análise foi utilizada a coloração de Hematoxilina e Eosina e para a avaliação da presença de micro-organismos foi utilizado o método de Brown & Brenn. No grupo de sessão única foram encontradas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em todos os espécimes, sendo observados no canal principal, nas ramificações apicais e nas lacunas de cimento. O grupo de 7 dias mostrou bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em 10 casos, encontradas somente nas ramificações apicais e nas lacunas de cimento, já o grupo em que o medicamento permaneceu por 15 dias no canal foram encontradas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em 4 casos, somente nas lacunas de cimento.

Vários métodos de avaliações de efeitos antimicrobianos de medicações entre sessões e outros anti-sépticos utilizados nos tratamentos endodônticos já foram estabelecidos na literatura, porém os métodos vão evoluindo em busca da maior proximidade com a condição real.

Haapasalo; Orstavik estabeleceram em 1987 uma metodologia de contaminação que permitia uma maior proximidade com a real atividade microbiana, possibilitando a penetração intra-tubular nos micro-organismos, aproximando o estudo de atividade antimicrobiana da realidade. Foram utilizados tubos de dentes incisivos bovinos de 4mm de comprimento, 6mm de diâmetro externo e 2,3mm de diâmetro interno. Foi então realizada uma contaminação com *E. faecalis* durante 21 dias, e a contaminação foi comprovada através do microscópio eletrônico de varredura.

Ma et al. em 2011 utilizou um protocolo de centrifugação para os espécimes de tamanho reduzido (fragmentos de dentina) contendo inóculo de *E. faecalis* na concentração de 3×10^6 UFC/mL, induzindo em apenas 24h biofilme na superfície dos espécimes e promovendo uma contaminação intratubular.

A fim de avaliar o efeito antimicrobiano residual de três diferentes soluções irrigadoras, foram contaminados por 14 dias, tubos de dentina bovina, com *Enterococcus faecalis*. Após a contaminação e ação dos agentes irrigantes, foram obtidas raspas de dentina através de brocas esféricas, que caíam em um caldo de cultura, e após semeadura em placas, as unidades formadoras de colônia (UFC) eram contadas (MOHAMMADI et al.2012).

Recentemente Dianat et al. (2015) utilizando 23 blocos de dentes humanos, avaliaram o efeito antimicrobiano de nanopartículas de hidróxido de cálcio e do hidróxido de cálcio sobre *Enterococcus faecalis*. Para isso utilizaram o método de concentração inibitória mínima dos medicamentos.

Um micro-organismo viável pode ser definido pela capacidade das suas células realizarem suas funções necessárias para sobreviver (BREEUWER e ABEE, 2000). Para determinarmos a viabilidade bacteriana de uma maneira simples, podemos utilizar o método da contagem de unidades formadoras de colônias, onde

a quantidade de colônias formadas em placas de ágar é equivalente a quantidade de células viáveis (CHÁVEZ et al., 2006).

Resultados de Ma et al. (2011) analisados por microscopia confocal de varredura a laser demonstraram bom padrão de contaminação, porém os espécimes utilizados foram seccionados, facilitando assim a contaminação intra-tubular, portanto não simulou condições reais de contaminação endodôntica.

Quando análises de viabilidade bacteriana são realizadas através da microscopia confocal, é utilizado o corante Live/dead® BacLight™ Kit (Molecular Probes, Burlington, ON, Canada) para corar as bactérias. Este kit é composto de dois fluorocromos de afinidade pelos ácidos nucleicos, o SYTO-9 e o Iodeto de propídeo, tendo como parâmetro a integridade da membrana citoplasmática que é imprescindível para a manutenção da viabilidade celular. Esse método permite análises em profundidade no interior dos túbulos dentinários, através da fluorescência emitida pelas bactérias coradas.

O fluorocromo SYTO-9 penetra tanto em células vivas, tanto como em células mortas. Em contraste, o Iodeto de propídeo, penetra somente em micro-organismos mortos, com membrana comprometida (JIN et al., 2005). Quando utilizados simultaneamente, o Iodeto de propídeo reduz o SYTO-9 no interior das células mortas. Deste modo, micro-organismos vivos, com membrana citoplasmática intacta, demonstram fluorescência verde, enquanto que, micro-organismos mortos, com membrana citoplasmática comprometida, apresentam fluorescência vermelha (JIN et al., 2005). Desta forma, é possível não só visualizar como também quantificar a viabilidade bacteriana.

Diante da extensa literatura a respeito de medicações intra-canal, é importante a realização de pesquisas com novas metodologias de contaminação e de avaliação do conteúdo bacteriano em canais radiculares padronizados, após o uso destes antimicrobianos. Da mesma forma, técnicas que facilitem a utilização clínica destas medicações com a mesma eficiência devem ser estudadas e aprimoradas.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho, por meio das metodologias de microscopia confocal de varredura a laser e cultura microbiológica, foram:

1. Analisar o efeito da agitação ultrassônica na ação antimicrobiana intra dentinária de pastas de hidróxido de cálcio; Avaliar o tempo do curativo intracanal na efetividade antimicrobiana em função da agitação ultrassônica;
2. Analisar o efeito do veículo das pastas de hidróxido de cálcio na ação antimicrobiana;
3. Avaliar a penetração intra-tubular das pastas de hidróxido de cálcio em função do veículo e da agitação ultrassônica.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tubos de dentina

Foram utilizados 16 dentes bovinos para cada grupo, sendo 10 submetidos à avaliação por cultura microbiológica e 06 por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL).

Os tubos de dentina foram confeccionados de acordo com a metodologia descrita por Haapasalo; Orstavik (1987) com modificações, a partir de dentes unirradiculares bovinos. Para descontaminação inicial estes ficaram 12 horas em solução de hipoclorito de sódio a 1%. Em seguida os dentes foram seccionados em uma máquina de corte (Isomet, Buehler, IL, EUA) com refrigeração, onde foram removidos os 5mm apicais e a coroa, padronizando os tubos de dentina em 12mm de comprimento. Os espécimes foram então instrumentados com limas endodônticas até o diâmetro 1,2mm (instrumento k#120) para padronização do canal radicular.

Para maior descontaminação dos espécimes esses foram submetidos a um banho ultrassônico imersos em hipoclorito de sódio a 1%, seguido de um banho ultrassônico imerso em EDTA e finalizado por um banho ultrassônico imerso em soro fisiológico, com duração de 10 minutos cada.

Para impermeabilização da superfície externa dos espécimes foi aplicada uma camada dupla de esmalte de unha vermelho (Colorama, L'ORÉAL BRASIL COMERCIAL DE COSMÉTICOS LTDA., Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), aguardando 24 horas para que cada camada secasse adequadamente. Os tubos de dentina foram esterilizados em autoclave a 121°C por 24 minutos dentro de microtubos de 2 mL, mantidos hidratados com soro fisiológico esterilizado. (figura 1)

Figura 1 – Tubos de dentina de 12mm, impermeabilizados externamente por duas camadas de esmalte.

4.2 Micro-organismos

Foi obtida uma cepa bacteriana 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 da cepa.

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 Mc Farland até atingir a concentração adequada.

4.3 Antimicrobianos

Para as medicações intra-canais foi utilizado hidróxido de cálcio veiculado em água destilada e propilenoglicol.

- -Hidróxido de cálcio P.A. (Biodinâmica, Londrina, PR, Brasil).
- - O propilenoglicol foi obtido em farmácia de manipulação e utilizado como veículo para pastas de hidróxido de cálcio;

- -Água destilada foi obtida através de um destilador, e esterilizada antes do uso.
- - A manipulação das medicações foi realizada na proporção de 2:1 (pó/líquido) em peso e manipuladas em placas de vidro com auxílio de espátulas 24 esterilizadas (ARIAS; 2013).

4.4 Protocolo de contaminação

Os tubos de dentina preparados foram inseridos em microtubos contendo 1mL de meio de cultura BHI e submetidos a um banho ultrassônico durante 15 minutos para que os espécimes se hidratassem e que o meio de cultura alcançasse máxima penetração nos túbulos dentinários (Figura 2).

Figura 2 – Espécimes em microtubos imersos em BHI, submetidas a banho ultrassônico.

Em seguida foi realizada a contaminação com o micro-organismo traçador (cepa de referência *Enterococcus faecalis* ATCC número 29212), por um período de cinco dias, realizando trocas periódicas de forma asséptica, em câmara de fluxo laminar, e alternada de inóculo contaminado e meio de cultura limpo, além de ciclos de centrifugações, seguindo um protocolo desenvolvido no departamento de 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 tubos de ensaio com 3 mL de meio de cultura BHI. Estes ficaram por 24 horas em estufa bacteriológica (Estufa Modelo 502-42L, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) a 37°C. A partir desta cultura reativada, um frasco com meio de cultura, de volume maior para condução do experimento, foi contaminado, permanecendo por 24 horas em estufa.

No primeiro dia de contaminação dos espécimes 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 Mc Farland.

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

Decorridas essas 7 horas, o meio de cultura BHI utilizado para banho ultrassônico dos espécimes foi removido do microtubo 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 os espécimes 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 substituída por 1 mL de BHI esterilizado, e foi realizado um ciclo de centrifugação a 3600g, por 5 minutos a 25°C e novamente armazenadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

No terceiro dia os procedimentos realizados foram iguais aos do primeiro dia de contaminação onde um novo inóculo obtido após 7 horas na estufa para crescimento foi utilizado. Foram realizados 8 ciclos de centrifugações e após a ultima centrifugação o meio turvo foi substituído por BHI esterilizado e os espécimes armazenados em estufa bacteriológica a 37° durante 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi trocado e os espécimes foram novamente armazenados, de modo idêntico ao segundo dia. No quinto dia, os espécimes estavam suficientemente contaminados para receber o teste antimicrobiano.

4.5 Medicação Intracanal

Após este período os blocos de dentina foram selados com coltosol na abertura apical do canal, então irrigados com EDTA e soro fisiológico e ficaram prontos para receberem a medicação intra-canal, sendo divididos aleatoriamente nos grupos:

- Grupo 1: Pasta de hidróxido de cálcio+ propilenoglicol +15dias
- Grupo 2: Pasta de hidróxido de cálcio+ propilenoglicol +15dias+ultrassom
- Grupo 3: Pasta de hidróxido de cálcio+ propilenoglicol +7dias
- Grupo 4: Pasta de hidróxido de cálcio+ propilenoglicol +7dias+ultrassom
- Grupo 5: Pasta de hidróxido de cálcio+ água destilada+15dias
- Grupo 6: Pasta de hidróxido de cálcio+ água destilada+15dias+ultrassom
- Grupo 7: Pasta de hidróxido de cálcio+ águas destilada+7dias
- Grupo 8: Pasta de hidróxido de cálcio+ água destilada+7dias +ultrassom

Após a aplicação da medicação intracanal a região cervical das amostras foram também seladas com coltosol (Coltene, Vigodente do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) .

Controles Negativos:

Foram utilizados 5 espécimes sem contaminação para cada grupo experimental para análise por cultura microbiológica, e 02 dentes sem contaminação para cada grupo para análise por MCVL. Totalizando 56 dentes bovinos.

Controle Positivo:

Como controles positivos foram utilizados 05 dentes para análise por cultura microbiológica e 05 dentes para MCVL que passaram pelo protocolo de contaminação e não receberam medicação.

Foram utilizados 16 dentes para cada grupo, sendo 10 submetidos à avaliação por cultura microbiológica e 06 por MCVL para avaliar viabilidade bacteriana.

As pastas foram inseridas no canal radicular com limas K#90 de diâmetro 0,9 mm (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça).

Para os 4 grupos em que foi empregada a agitação ultrassônica, foi utilizado o equipamento da Gnatus (Jet Sonic, Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os espécimes foram preenchidos da mesma maneira, então as pastas foram agitadas por 1 minuto com auxílio do inserto liso rígido (TU13, Trinit Periodontia, SP, Brasil) esterilizado, sendo 30 segundos no sentido mésio-distal e 30 segundos no sentido vestibulo-lingual, considerando o sentido de maior vibração do transdutor piezoelétrico ajustado na tecla Endo, ajuste fino número 02, sempre um milímetro aquém do comprimento do espécime. Foram realizados movimentos no sentido do longo eixo durante o tempo de agitação para não favorecer áreas específicas do canal radicular.

A medicação permaneceu nos espécimes por um período de 7 dias nos grupos 3, 4, 7 e 8, e 15 dias no restante dos grupos, inclusive nos controles negativos, armazenados em estufa a 37°C.

Em um estudo piloto ficou determinado que os espécimes deveriam ser armazenados em microtubos contendo 1mL de água destilada esterilizada durante os 7 ou 15 dias com a medicação.

No estudo piloto, foram utilizados 10 espécimes preparados da mesma maneira e contaminados, a fim de determinar a melhor condição para viabilidade bacteriana, durante o maior período desejado. Após a contaminação os espécimes foram selados nas extremidades com cimento cotosol, armazenados em microtubos por 15 dias e divididos de acordo com a condição de armazenamento em 5 grupos:

- 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 cortados com auxílio de maquina de corte isomet, e então corados por um período de 20 minutos com 30µL de LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), suficiente para cobrir a superfície. 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 demonstraram 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 3).

Figura 3 – 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)

Passados os períodos experimentais, a medicação intra-canal dos diferentes grupos foi removida dos tubos de dentina (n=6), com seringas de irrigação e soro fisiológico esterilizado. Foram então seccionados longitudinalmente com o auxílio de disco diamantado de precisão (EXTEC, Enfield, EUA, 102mmX0.3mmX12mm) em máquina de corte sob refrigeração.

Foram então imersos em EDTA a 17% em placas de 24 poços durante 5 minutos para remoção da smear layer produzida durante o corte, e em seguida foram lavados com 500µL de soro fisiológico esterilizado. Os espécimes foram então 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 seqüencial e divididos em superficial e profundo (Figura 4). O escaneamento foi realizado com a objetiva de 40X, a cada 1µm de profundidade e 275µm². 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 biolmagel 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.

Figura 4 – Esquema mostrando a porção superficial (A) e profunda (B) do canal radicular, representando os locais para aquisição de imagens em MCVL.

4.7 Cultura Microbiológica

Para os dez espécimes de tubos de dentina de cada grupo, a medicação foi removida com soro fisiológico e com ácido cítrico a 0,5% (DELGADO et al, 2013; WANG et al, 2007) para neutralizar o pH alcalino do hidróxido de cálcio. Os tubos de dentina foram secos com cones de papel absorvente esterilizado. As raspas de dentina utilizadas como amostras para a cultura microbiológica foram extraídas dos espécimes com o auxílio de brocas de Largo de números 5 e 6, sendo utilizada uma broca para cada dente(Dentsply/Maillefer; Ballaigues, Suíça). As brocas foram utilizadas com motor elétrico (VDW, Munique, Alemanha) com 410 rotações por minuto, para que não fosse promovido um aquecimento suficiente que pudesse interferir nos resultados e crescimento microbiano. As raspas obtidas durante 70 segundos foram dispensadas imediatamente em microtubos com caldo BHI, agitadas e semeadas (100 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).

A região mais superficial em relação a luz do canal foi representada pelas amostras colhidas com o auxílio da broca 5, enquanto que as amostras colhidas com a broca de Largo 6 foram representativas da região mais profunda, mostrando a presença ou ausência de contaminação remanescente nestas regiões.

Todos os procedimentos envolvendo cultura microbiológica foram realizados dentro de câmara de fluxo laminar, evitando a contaminação por outros micro-organismos presentes no ambiente que pudessem comprometer os resultados.

4.8 Avaliação da penetrabilidade das pastas por MCVL

Para o teste da penetrabilidade dos curativos, foram testados 20 dentes bovinos, divididos em 4 grupos:

Grupo A: Hidróxido de cálcio + propilenoglicol (HC prop)

Grupo B: Hidróxido de cálcio + propilenoglicol +ultrassom (HC prop U)

Grupo C: Hidróxido de cálcio + água destilada (HC ad)

Grupo D: Hidróxido de cálcio + água destilada + ultrassom (HC ad U)

Os espécimes foram preparados da mesma forma que para os demais testes, porém sem contaminação bacteriana. Estes receberam a respectiva medicação adicionada do corante rodamina B a 0,1%, permanecendo no canal durante um período de 7 dias. Após a remoção da medicação intra-canal com soro fisiológico e secagem com pontas de papel absorvente esterilizadas, os espécimes 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). Foi utilizado o programa ImageJ 1.48v (National Institutes of Health, USA) para realizar as medidas de penetração intra-tubular. Foi realizada a medida da área onde houve penetração intra-tubular, e realizada a medida da área do canal, esses valores foram subtraídos e obtivemos a área de penetração da pasta nos túbulos dentinários.

4.9 Análise Estatística

A análise estatística para ambas metodologias foi realizada após a verificação da normalidade pelos testes de Shapiro-Wilkis e Komorov-smirnoff. Os resultados não foram paramétricos, desta forma, foi utilizado 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, os grupos G3,(hidróxido de cálcio em propilenoglicol por 7 dias no interior do canal),G5 (HC em água destilada por 15 dias), G7 e G8 (HC em água destilada deixados por 7 dias) mostraram os piores desempenhos, apresentando diferenças estatísticas com os demais grupos testados.

Todos os outros grupos, em que o medicamento permaneceu 15 dias no canal (menos o G5) obtiveram resultados satisfatórios, mostrando menor quantidade de bactérias viáveis, não havendo diferenças estatísticas entre eles.

Os grupos em que foi empregada a agitação ultrassônica da medicação intracanal (G2,G4,G6 e G8) mostraram uma boa efetividade na inativação das bactérias, mas não apresentaram diferenças estatísticas entre eles, independente do período de permanência da pasta.

Os grupo G4 e G8 (7 dias com ultrassom) não apresentaram diferenças estatísticas com os grupos G1,G2, G5 e G6 (15 dias), mostrando a mesma efetividade na eliminação dos micro-organismos.

Somente os grupos G3 e G7 (7 dias sem ultrassom) e também o G5 e G8 não apresentaram diferenças estatísticas com o controle positivo de proliferação bacteriana, mesmo que o grupo 5 (HC+Ad 15 dias) e grupo 8 (HC+Ad+US 7 dias) tenha apresentado uma boa redução nos micro-organismos (Gráfico 1).

Gráfico 1: Porcentagem de bactérias vivas nas áreas selecionadas ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), após medicação intra-canal dos diferentes grupos experimentais 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.

No terço cervical os grupos em que a pasta foi agitada com ultrassom mantida no interior do canal por um período de 15 dias houve melhor desempenho, porém não apresentaram diferenças estatísticas com os grupos em que a medicação foi agitada com ultrassom e mantida por 7 dias no canal, e com os grupos que a medicação não sofreu agitação ultrassônica e deixadas por 15 dias no canal. Os grupos em que a medicação foi mantida no canal por 7 dias sem agitação prévia com ultrassom, obtiveram os piores desempenhos, não apresentando diferenças estatísticas com o grupo controle positivo.

O grupo de propilenoglicol 7dias com ultrassom, apresentou os mesmos que os grupos de 15 dias e apresentou diferenças estatísticas com o controle positivo. (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Porcentagem de bactérias vivas nas áreas selecionadas ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), no terço cervical, após medicação intra-canal dos diferentes grupos.

Quando comparada a efetividade das pastas no terço médio o melhor desempenho foi do grupo G2, apresentando diferença estatística somente com os grupos G3, G7, G5 e com o grupo controle. As demais medicações se apresentaram tão efetivas quanto o grupo G2 .

Também podemos observar que grupo de propilenoglicol 7dias com ultrassom, apresentou os mesmos que os grupos de 15 dias e apresentou diferenças estatísticas com o controle positivo. (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Porcentagem de bactérias vivas nas áreas selecionadas ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), nos terços médio, após medicação intra-canal dos diferentes grupos.

Ao comparar a ação das pastas em regiões de profundidades diferentes na massa dentinária da raiz, na região superficial em relação ao canal, os grupos G3 e G7 obtiveram os piores desempenhos, porém o grupo G7 apresentou diferenças estatísticas significantes somente com G2 (HC+Prop+U+15) ($P=0,041$). O grupo G3 não apresentou diferenças estatísticas com nenhum grupo experimental, porém, de acordo com a mediana houve uma redução em média de 22,7% de bactérias comparando com o grupo controle, enquanto que os demais grupos obtiveram uma maior redução G1, G2, G4, G5, G6 e G8 (41,5% a 84,7%). O grupo G2 alcançou a maior redução de micro-organismos na região superficial. Somente os grupos G1, G2, G4 e G6 apresentaram diferenças estatísticas com o grupos controle (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Porcentagem de bactérias vivas em $\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$, na região superficial, após medicação intra-canal dos diferentes grupos.

Na região profunda dos túbulos dentinários, o grupo G2 exerceu melhor desempenho, seguido pelos grupos G6, G4, G1 e G5. O pior desempenho foi dos grupos G3 e G7 que apresentaram diferenças estatísticas significantes com os grupos G1, G2, G4 e G6. Somente os grupos G2, G4 e G6 apresentaram diferenças estatísticas significantes com o grupo controle positivo. Os grupos G8 e G5 não apresentaram diferenças estatísticas com nenhum grupo experimental (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Porcentagem de bactérias vivas ($\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$), na região profunda, após medicação intra-canal dos diferentes grupos.

A seguir, imagens representativas da dentina contaminada nas regiões superficial e profunda, após 7 e 15 dias com as medicações testadas no presente estudo e do controle positivo. Nessas imagens é possível visualizar as bactérias viáveis coradas em verde e as não viáveis coradas em vermelho (Figuras 2 e 3).

Figura 5 - 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 propilenoglicol, 15 dias (G1). **C e D.** Hidróxido de cálcio veiculado em propilenoglicol, 15 dias, com ultrassom (G2). **E e F.** Hidróxido de cálcio veiculado em propilenoglicol 7 dias (G3).

Figura 6 - 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 7 dias, com ultrassom (G4). **I e J.** Hidróxido de cálcio em água destilada 15 dias (G5). **K e L** hidróxido de cálcio em água destilada 15 dias, com ultrassom (G6).

Figura 7 - Imagens da dentina contaminada após as medicações na região superficial (coluna esquerda) e na região profunda (coluna direita). **M e N** Hidróxido de cálcio em água destilada 7 dias (G7). **O e P**. Hidróxido de cálcio em água destilada 7 dias, com ultrassom (G8). **Q e R** Controle positivo de contaminação sem medicação.

5.2 AVALIAÇÃO POR CULTURA MICROBIOLÓGICA

Na avaliação por cultura microbiológica, as pastas de hidróxido de cálcio sem agitação ultrassônica quando deixadas por 7 dias no interior do canal radicular se mostraram menos eficientes na descontaminação intra-tubular, havendo um maior número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL (G3 e G7). A pasta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol e submetida à agitação ultrassônica deixada por 15 dias no canal (G2) obteve o menor número de UFCs/mL. Seguidas dessa pasta, as medicações com melhor desempenho foram a de hidróxido de cálcio em água destilada, 15 dias (G5), pasta de hidróxido de cálcio em propilenoglicol e agitação ultrassônica deixada por 7 dias (G4), hidróxido de cálcio em água destilada, agitação ultrassônica deixada por 15 dias (G6) e hidróxido de cálcio em propilenoglicol deixada por 15 dias (G1). Por último na eficiência antimicrobiana, mas melhor do que os grupos G3 e G7, foi a pasta de hidróxido de cálcio em água destilada e agitação ultrassônica deixada por 7 dias (G8). O G3 apresentou diferenças estatísticas com G1,G2,G5 e G6 e o grupo G7 apresentou diferenças estatísticas com G1,G2,G4,G5 e G6.

Gráfico 6 – Quantidade de UFC/mL entre cada grupo, após medicação intra-canal durante os períodos experimentais.

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, associada ao ultrassom e mantida por 15 dias (G2) apresentou o melhor resultado, não apresentando crescimento de UFCs. Os grupos que obtiveram a maior contagem de UFCs foram os grupos de hidróxido de cálcio sem associação ao ultrassom onde o medicamento foi deixado durante 7 dias, (G3 e G7). Não houve diferenças estatísticas entre o grupo G7, com os grupos G3 e G8, e houve diferença do G7 com os demais grupos. Os grupos se apresentaram de forma semelhante na região profunda, quando a comparação foi realizada a partir da dentina excisada pela broca de Largo 6, ou seja, camada mais profunda dos túbulos dentinários. Porém as diferenças estatísticas foram encontradas somente entre o G3 e os grupos G1, G2, G4 G5 e G6 (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Quantidade de UFC/mL entre cada grupo na região superficial e profunda da dentina, após medicação intra-canal durante os períodos experimentais.

Tabela 1 – Quantidade de UFC/mL por grupo para cada coleta realizada com a broca de largo 5 (L5) e broca de largo 6 (L6), quantidade de UFCs total e quantidade de placas que não apresentaram crescimento microbiano.

GRUPOS	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	C+
L5	34	0	113	13	17	13	153	45	>100
L6	8	7	244	17	8	13	191	69	>100
UFC TOTAL	42	7	357	30	25	26	344	114	>100
PSCM *	14	17	5	13	14	14	3	10	0

*Placas sem crescimento microbiano

Pelos resultados demonstrados pela tabela1 podemos observar maior crescimento microbiano nos grupos de 7 dias sem ultrassom (G3 e G7), apresentando poucas placas sem crescimento microbiano, sendo muito semelhantes ao controle positivo. Já o grupo de água destilada 7 dias com ultrassom (G8), apresentou uma contagem pouco menor de UFCs, porém apresentou uma quantidade maior de placas sem crescimento microbiano. Os grupos de propilenoglicol de 15 dias sem ultrassom, 7 dias com ultrassom e os grupos de água destilada 15 dias com e sem ultrassom (G1, G4, G5 e G6) apresentaram contagem de UFCs semelhantes, mostrando crescimentos menores do que os do controle positivo. O grupo que apresentou a menor contagem de UFCs e a maior quantidade de placas sem crescimento microbiano foi o grupo de propilenoglicol 15 dias com ultrassom (G2), mostrando grande diferença com o controle positivo.

Foi realizado o teste estatístico de correlação entre as duas metodologias usadas para avaliar a ação antimicrobiana frente às pastas testadas – cultura microbiológica e análise por MCVL. As metodologias demonstraram correlação linear positiva média (correlação = 0,53) quando aplicado o teste de Pearson ($p < 0,05$), demonstrando, que apesar de diferentes, as metodologias apresentam resultados semelhantes e complementares.

5.3 AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO INTRATUBULAR DAS PASTAS

A análise da penetração da medicação intra-canal foi avaliada em cortes transversais a 3 e a 5mm do ápice dos tubos de dentina bovina, medindo-se a área do canal e a área onde de obteve penetração, quando realizada a subtração obtínhamos o valor da área onde a medicação penetrou. A agitação ultrassônica possibilitou o maior preenchimento dos túbulos dentinários quando comparado àqueles grupos que receberam a mesma medicação somente com a introdução por instrumento manual (K 90). A maior penetração da pasta foi alcançada no grupo em que o hidróxido de cálcio foi veiculado com propilenoglicol e associado à agitação ultrassônica apresentando diferenças estatísticas com os demais grupos .

Gráfico 8 – Medianas das áreas de penetração dos diferentes grupos testados.

Nos terços cervical e médio os grupos se comportaram de forma semelhante, sendo que a maior penetração da pasta em ambos os terços foi obtida pelo GB (hidróxido de cálcio, propilenoglicol e ultrassom). O grupo GD (hidróxido de cálcio, água destilada e ultrassom).

Gráfico 9 – Área de penetração das diferentes medicações intra-canal no terço médio e cervical.

Os resultados dos testes de penetrabilidade intra-tubular das pastas testadas demonstraram correlação linear negativa fraca (correlação= -0,35) com os resultados das avaliações antimicrobianas utilizadas, quando aplicado o teste de Pearson ($p < 0,05$), demonstrando que quando houve a maior penetração das pastas, houve uma menor quantidade de bactérias vivas.

Figura 8 - Imagens da penetração das pastas de hidróxido de cálcio coradas com Rodamina B 0,1% nos cortes de 3mm (coluna direita) e 5mm (coluna esquerda) a partir da porção mais apical do espécime. **A e B** Hidróxido de cálcio em propilenoglicol, **C e D** Hidróxido de cálcio em propilenoglicol associado a agitação com ultrassônica, **E e F** Hidróxido de cálcio em água destilada e **G e H** Hidróxido de cálcio em água destilada associada a agitação com ultrassônica.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 Da Metodologia

Para realização deste estudo foram utilizados dois métodos diferentes para as análises da ação antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio submetidas ou não a ação ultrassônica em dentes bovinos, a fim de se obter resultados mais confiáveis. Os métodos utilizados para as análises foram a cultura microbiológica e a captura de imagens pelo Microscópio Confocal de Varredura a Laser (MCVL), que são meios complementares, de forma que auxilie na escolha mais eficaz para uso clínico da medicação intra-canal. Realizou-se a pesquisa a partir de um único micro-organismo traçador que foi o *Enterococcus faecalis*, pois esta bactéria é frequentemente encontrada em casos de insucesso da terapia endodôntica (SAFAVI et al, 1990; SUNDQVIST, 1998).

Enterococcus faecalis é uma bactéria Gram-positiva e anaeróbia facultativa, comumente encontrada nos canais radiculares tratados com lesões periapicais persistentes (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2004; SEDGLEY et al, 2006). É conhecido por ser resistente ao procedimento clínico padrão (STUART et al, 2006). Estudos demonstram que o *Enterococcus faecalis* tem grande capacidade de penetrar nos túbulos dentinários, o permite que essa espécie possa resistir aos efeitos dos agentes antimicrobianos e procedimentos biomecânicos (HAAPASALO, ORSTAVIK; 1987; ZOLETTI; SIQUEIRA; SANTOS, 2006; ROÇAS; SIQUEIRA; SANTOS, 2004). Também tem a capacidade de suportar as condições ecológicas e se adaptar aos desafios letais existentes nos canais radiculares, sendo assim considerado um patógeno endodôntico persistente (KAYAGLU; ORSTAVIK, 2004).

Além disso, o *E. faecalis* tem se mostrado capaz de formar biofilme no interior do canal radicular, que pode ser um fator importante para a resistência bacteriana e sua persistência (DISTEL; HATTON; GILLESPIE; 2002).

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 a diferentes medicações deve ser estudada.

Um modelo experimental em tubos de dentina bovina e *E. faecalis* para testar medicamentos de interesse endodôntico foi descrito por Haapasalo; Orstavik (1987), e bastante utilizado desde então (EVANS et al., 2003). CAMARGO et al., 2006 em seu estudo 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 fim de obter-se uma maior descontaminação dos espécimes utilizados, para que não houvesse interferências de outros micro-organismos previamente existentes, após a instrumentação dos tubos de dentina e previamente a esterilização, foram submetidos 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 que fosse estabelecida a metodologia de contaminação dos espécimes, este estudo baseou-se na viabilidade bacteriana por meio de MCVL. O protocolo de contaminação desenvolvido pelo departamento de Endodontia da FOB-USP (ANDRADE et al., 2015) foi baseado nos estudos prévios de Haapasalo; Ørstavik (1987) e Ma et al. (2011). Este modelo experimental foi escolhido pois a intenção do estudo é simular *in vitro* o mais próximo possível a situação clínica das infecções endodônticas no ambiente oral. Foram utilizados dentes unirradiculares bovinos, seccionados em tubos padronizados em comprimento e diâmetro interno (HAAPASALO e ØRSTAVIK, 1987), pois a dentina bovina é reconhecida pela similaridade com a dentina humana na estrutura e composição (EVANS et al., 2003), e não mostram diferenças na difusão de pH, apesar do diâmetro maior dos túbulos bovinos (CAMARGO et al., 2006). Os dentes foram seccionados duas vezes, a primeira para remoção dos 5mm apicais e a segunda para dar origem aos espécimes de tubos de dentina de 12mm de comprimento. O diâmetro interno foi padronizado em 1,2 mm por meio de limas da terceira série.

Para impermeabilização da superfície externa, a fim de que a contaminação e penetração de micro-organismos na dentina ocorressem somente via canal radicular para contaminação *in vitro*, foi aplicada uma dupla camada de esmalte, na tentativa de simular com maior veracidade o ambiente oral (ARIAS, 2013). Para que fosse

obtida 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. A partir da contaminação com repetidas centrifugações, associada a confecção dos espécimes utilizada e algumas adaptações realizadas, sendo elas a utilização de tubos de dentina de 12 mm, acréscimo de mais um ciclo de oito centrifugações com alternância de dias, constituindo 5 dias de contaminação e a concentração do inóculo de 3×10^8 , após 7 horas de cultivo, obtendo-se proliferação exponencial da bactéria, pode-se obter comprovação da melhor proliferação bacteriana intra-tubular, através de MCVL, quando comparado a métodos de contaminação utilizados anteriormente (ANDRADE et al., 2015).

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, e deixadas por um período de 7 dias e 15 dias no interior do canal, sendo que foram divididas em 8 grupos, onde quatro grupos recebiam a agitação ultrassônica da medicação, mas a inserção das medicações foi realizada da mesma maneira para todos os grupos.

Foram realizadas modificações no momento do armazenamento dos espécimes após a aplicação da medicação intra-canal. Após 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. Diferentemente de Arias (2013), que manteve os dentes sem umidade, ficou determinado que os espécimes permaneceriam armazenados imersos em água destilada esterilizada, afim de se obter um ambiente úmido, passível de proliferação bacteriana e que se aproximasse da condição do alveolo em que o dente se encontra na cavidade oral.

Como método clássico de análise de substâncias antimicrobianas utilizou-se a cultura microbiológica, que possibilita a contagem de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFCs/mL) 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).

Muitos estudos que avaliam efeito antimicrobiano do tratamento endodôntico e de medicações descritos na literatura têm se baseado na metodologia de cultura. Porém, já se sabe que essa metodologia possui algumas limitações, dentre elas a baixa sensibilidade, dificuldade na identificação de cepas cultiváveis com fenótipos ambíguos, difícil detecção de algumas espécies e inabilidade de muitas espécies orais em crescer sob condições laboratoriais artificiais (SIQUEIRA e RÔÇAS, 2009), no entanto estes problemas não são aplicáveis no presente estudo, uma vez que este foi executado com uma bactéria de proliferação abundante.

Através da correlação de Pearson positiva, comparando-se os resultados das duas metodologias, MCLV e cultura microbiológica, foi possível mostrar que ambas apresentam resultados confiáveis, mesmo que a cultura microbiológica não analise o espécime como um todo, utilizando somente uma porção de raspas de dentina, enquanto que a microscopia confocal analisa o espécime em maior aumento, visto que a penetração do laser permite a captura do corante em relativa profundidade ao longo do espécime. Com isso é possível afirmar que a cultura microbiológica é um método adequado, e a MCVL bastante preciso, e podem ser utilizadas para análise de substâncias antimicrobianas com sucesso.

A fim de aumentar a relevância deste estudo tornou-se oportuna a utilização da análise dos espécimes por MCVL utilizando o corante LIVE/DEAD, já que com esta tecnologia através da fluorescência emitida pelos micro-organismos corados é possível visualizar as bactérias em profundidade no interior dos túbulos dentinários (ARIAS, 2013), 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 ORSTAVIK, 1987; SIQUEIRA, UZEDA e FONSECA, 1996).

6.2 DOS RESULTADOS

Para a eliminação bacteriana de canais contaminados além do preparo biomecânico é importante o uso de uma medicação entre as sessões do tratamento. 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 possui mecanismos de sobrevivência ao pH alcalino (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987; EVANS et al., 2002).

Em casos de dentes que estão expostos ao meio bucal há uma penetração de bactérias constantemente através da saliva. Ao realizar um tratamento endodôntico nessa situação clínica, é de grande importância que tenhamos a mão antimicrobianos potentes durante o preparo, além de utilizarmos uma boa medicação intra-canal entre sessões para a maior eliminação possível de micro-organismos. Também em casos de insucesso do tratamento é de grande importância o uso de um antimicrobiano que possibilite a inativação de micro-organismos que resistiram ao tratamento anterior.

Para utilização do hidróxido de cálcio como medicação intra-canal, é necessário a adição de um veículo, pois este determina a taxa de dissociação iônica e a difusão desses íons através da dentina. O veículo influencia na solubilidade dessa pasta (MOHAMMADI e DUMMER, 2011).

Apesar dos veículos viscosos também serem solúveis em água, conferem ao medicamento uma liberação de íons por períodos prolongados (SIQUEIRA, LOPES e ESTRELA, 2004, FERREIRA et al., 2004), sendo essa liberação mais lenta, benéfica, pois em diferentes situações clínicas como na inibição de reabsorção radicular inflamatória e reparo de lesões periapicais (GROVER e SHETTY, 2014) é importante que haja a liberação contínua destes íons. Foi observado neste trabalho que os grupos em que foi utilizado o propilenoglicol como veículo para o hidróxido de cálcio, apresentaram melhores resultados, principalmente nas regiões mais

profundas, do que o veículo água destilada, provavelmente devido a sua maior facilidade de penetração em áreas mais difíceis, como nos túbulos dentinários,.

Ao analisar a penetração das medicações estudadas em túbulos dentinários, foi evidenciada diferença significativa entre os veículos, sendo que a medicação com propilenoglicol associada a agitação ultrassônica alcançou uma maior profundidade nos túbulos dentinários, mostrando que a tensão superficial mais baixa do propilenoglicol permitiu a melhor difusão da pasta no interior dos túbulos dentinários, corroborando com Cruz et al (2002), mostrando uma maior penetrabilidade.

Mesmo que quando o hidróxido de cálcio é veiculado com água destilada haja uma liberação mais rápida de ions cálcio e hidroxila, que é um efeito desejado para este medicamento na prática clínica (GROVER e SHETTY, 2014), este trabalho mostrou em alguns testes uma menor ação do medicamento nessas condições, ou seja, no veículo água, principalmente nas regiões mais profundas da dentina. Isso pode ser explicado devido a menor tensão superficial do propilenoglicol (dow propileno glicol USP/EP), o que proporciona maior difusão do medicamento através da membrana celular das bactérias.

Através do teste de correlação de Pearson obteve-se que os resultados das avaliações antimicrobianas apresentaram uma correlação negativa com a avaliação da penetração intra-tubular das pastas de hidróxido de cálcio, o que mostra que quando houve uma maior proximidade da medicação com os micro-organismos, houve a maior inativação dos mesmos.

A agitação ultrassônica proporcionou maior preenchimento de túbulos dentinários, quando comparada à mesma medicação sem a agitação. Este dado pode auxiliar na elucidação da melhora do efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio ao sofrer a energização ultrassônica. Porém após a agitação ultrassônica na clínica pode-se completar o preenchimento do canal, pois devido ao impulsionamento da pasta para o interior dos túbulos, formam-se espaços no canal que devem ser preenchidos para que obtenhamos melhores resultados.

Não são encontrados muitos trabalhos na literatura sobre a agitação de medicação intracanal com uso de ultrassom, o que limita as inferências, mas é reconhecido que o hidróxido de cálcio, por ser uma substância que atua por

elevação de pH e promoção de alterações proteicas, necrose superficial e eventos que resultam em morte bacteriana e melhora no processo de reparo, teve a sua ação potencializada devido ao impulsionamento da pasta promovido pela ação do ultrassom, corroborando com Duarte et al (2012), mostrando maior penetrabilidade. Assim, a medicação pode atuar de maneira semelhante nas regiões mais profundas, da mesma forma que na região mais próxima a luz do canal, ou seja, atua em contato com local onde o acesso é restrito, e de mais difícil eliminação de micro-organismos.

A agitação promovida pelo ultrassom possibilitou com o maior impulsionamento da pasta, uma maior penetração intratubular observada por MCVL, que vai de acordo com trabalhos anteriores (ARIAS, 2013), deixando a medicação em maior proximidade com os micro-organismos, podendo isso ser a causa da menor viabilidade bacteriana quando a agitação foi realizada.

Os presentes resultados demonstraram que, após 15 dias de medicação, ou 7 dias de medicação quando potencializada com ultrassom, podem trazer bons resultados na redução ou eliminação de *E. faecalis* nos túbulos dentinários. Esta medicação de hidróxido de cálcio pode ser veiculada com propilenoglicol ou água destilada, na qual a ação antimicrobiana ocorre por elevação do pH.

Estudos anteriores (SILVEIRA et al., 2001; HOLLAND et al., 2003) demonstram a inefetividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio quando mantido durante 7 dias no interior do canal radicular. Neste estudo pudemos confirmar com os grupos G3 (HC+Prop) e G7 (HC+Ad) o baixo efeito antimicrobiano deste curativo em curto período de tempo, porém quando a medicação foi agitada com o ultrassom mesmo aos 7 dias houve uma melhora na ação antimicrobiana, se equivalendo às medicações mantidas por 15 dias no interior do canal.

Os resultados de cultura microbiológica demonstraram maior formação de colônias bacterianas para os grupos em que a medicação foi mantida no interior do canal por 7 dias e não foi realizada a agitação ultrassônica (G3 e G7), em acordo com os resultados demonstrados na MCVL, que demonstrou a maior viabilidade

bacteriana para estes grupos, sendo clara sua menor efetividade como medicação intra-canal contra *E. faecalis*.

No presente estudo, a pasta de Hidróxido de cálcio com propilenoglicol associada à agitação ultrassônica e deixada tanto por 7 como por 15 dias no interior do canal apresentaram níveis de redução bacteriana significativa em relação ao controle.

As diferenças estatísticas foram encontradas na maioria dos testes com as medicações sem agitação ultrassônica mantidas durante 7 dias no interior do canal.

Nas análises em MCVL tanto na região superficial como na região profunda os grupos G3 (HC+Prop+7d) e G7(HC+Ad+7d) apresentaram a menor inativação bacteriana. Os melhores resultados na região profunda foram alcançados pelos grupos G2(HC+Prop+U+15d) G4(HC+Prop+U+7d) e G6 (HC+Ad+U+15d) que mostraram diferenças com o controle positivo, mostrando que a agitação ultrassônica potencializou ação antimicrobiana dos medicamentos.

Este resultado concorda com Duarte et al. (2012) que demonstraram maior liberação de cálcio e elevado pH na porção externa da raiz, em reabsorções externas simuladas, quando a pasta de hidróxido de cálcio foi agitada com ultrassom. Esses resultados foram explicados pelos autores por uma provável intensificação da ionização promovida pela agitação ultrassônica, ou ainda em decorrência da maior penetração das partículas de hidróxido de cálcio nos túbulos dentinários com a agitação.

Trabalhos atribuem à capacidade tampão da dentina a redução de íons hidroxila quando uma pasta de hidróxido de cálcio é introduzida no interior do canal (NERWICH, FIGDOR E MESSER 1993; WANG e HUME, 1988), porém com este trabalho podemos dizer que a maior interferência é a difusão nos túbulos dentinários, pois uma vez que a medicação foi energizada com ultrassom, obtivemos os mesmos resultados nos dois períodos testados. Quanto maior o tempo que a medicação é empregada maior é a sua difusão (CAMARGO et al., 2004), e com a associação com ultrassom esse tempo foi reduzido para a mesma inativação bacteriana.

Com a medicação alcançando regiões mais profundas, se consegue um pH mais elevado nessas regiões, o que é muito importante contra micro-organismos resistentes, como o *E. faecalis* que sobrevive a pH até 11,5 (BYSTROM, CLAEISSON, SUNDQVIST, 1985). Sobre a “capacidade tampão” da dentina, que dificultaria a ação alcalinizante do HC, em um trabalho desenvolvido por Ferrari et al. (2010), utilizando pó de dentina com HC, foi observado pH alcalino da mistura, ou seja, a dentina não realizou “tamponamento” da pasta. A dificuldade das pastas de HC em eliminar micro-organismos alojados nas áreas profundas da dentina é que, de fato, a pasta e seu alto pH não chegam nessas regiões.

A atividade antimicrobiana em túbulos dentinários aqui estudada foi melhor quando ocorreu a agitação ultrassônica, para as duas medicações testadas (veículos). Estes resultados sugerem que a maior penetração de HC poderia gerar pH elevado em maior profundidade nos túbulos dentinários.

A importância de determinarmos um menor tempo de curativo intra-canal obtendo uma descontaminação satisfatória é que quanto menor for o tempo que for realizado o tratamento completo, reduz-se o risco de infiltração coronária. Tennert et al (2014) mostram que a partir de 24h de selamento provisório já iniciam-se aparecimento de fraturas neste material. Além da infiltração coronária, quanto mais rápido for o tempo de tratamento, mais rápido o paciente fica reabilitado e com isso menor é o risco de fratura do dente. Lausten et al (2005) mostraram que depois de oito dias de selamento provisório, muitos dentes sofreram fratura de cúspide. Mandarati et al (2008) indicam que a restauração definitiva do dente deve ser realizada dentro de uma ou no máximo duas semanas.

Desta forma, as metodologias utilizadas neste estudo possibilitaram a análise da taxa de viabilidade bacteriana em profundidade após 7 e 15 dias de medicação intracanal nos espécimes. As medicações de 15 dias e as de 7 dias associadas ao ultrassom (G1,G2,G4,G5 e G6) demonstraram taxas menores de viabilidade bacteriana e por isso obtiveram melhor comportamento antimicrobiano nos dois métodos analisados. Além disso, a agitação ultrassônica promoveu uma diminuição significativa e mais proeminente de *E. faecalis* para as duas pastas testadas, e melhorou a ação das mesmas no período de 7 dias. Na região mais profunda, as medicações com propilenoglicol foram mais efetivas, podendo ser uma escolha para

o uso na clínica, a medicação com propilenoglicol, durante 7 dias, contanto que associada à agitação ultrasônica.

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 a base de hidróxido de cálcio deixadas no interior do canal durante 7 e 15 dias .

b) A ação do ultrassom potencializou o efeito antimicrobiano das pastas de hidróxido de cálcio em ambos os períodos testados, sendo que houve uma melhora mais significativa na ação antimicrobiana das pastas deixadas durante 7 dias.

c) A pasta de hidróxido de cálcio mantida 7 dias no canal associada a agitação ultrassônica foi tão eficiente quanto as pastas mantidas por 15 dias no canal sem agitação e com agitação ultrassônica, portanto, diminuindo o tempo de espera necessário entre sessões clinicamente.

d) A maior penetrabilidade foi alcançada pelo grupo que o hidróxido de cálcio foi veiculado com propilenoglicol e submetido a agitação ultrassônica, apresentando diferenças estatísticas com os demais grupos.

e) Ambas metodologias utilizadas, de cultura microbiológica como a análise em microscopia confocal de varredura a laser mostraram-se efetivas na determinação da eficiência antimicrobiana das pastas com diferentes veículos, com e sem agitação ultrassônica.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABBOTT PV. Medicaments: aids to success in endodontics. Part 1. A review of the literature. **Aust Dent J**. 1990 Oct 35(5):438–48.
- AHMAD M, PITT FORD TR, CRUM LA. Ultrasonic debridement or root canals: acoustic streaming and its possible role. **J Endod**. 1987 Oct;13(10):490–9.
- ALVES FR, ALMEIDA BM, NEVES MA, MORENO JO, ROCAS IN, SIQUEIRA JF. Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches. **J Endod**. 2011 Apr;37(4):496-501.
- 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.
- ARIAS-MOLIZ MT, FERRER-LUQUE CM, ESPIGARES-GARCIA M, et al. Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants. **J Endod**. 2009 May;35(5):711–4.
- 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/>>.
- 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.
- BOOTH IR, KROLL RG. Regulation of cytoplasmic pH (pH1) 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.
- BREEUWER P, ABEE T. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. **Int J Food Microbiol**. 2000 Apr 10;55(1-3):193-200.

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;1; 170-175.

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** 1985 Jan; 18(1);18-35.

BYSTROM A., SUNDQVIST G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1983 Mar; 55(3);307-312.

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.

CAMARGO SC, GAVINI G, AUN CE, WATERFIELD D, COIL JM. Difusion of calcitonin through the wall of the root canal. **Braz Oral Res** 2004 Jan-Mar;18(1);59-62.

CARROTTE P. "Endodontics: part 9 Calcium hydroxide, root resorption, endo-perio lesions," **British Dental Journal**. 2004 Dec;197(12); 735–743.

CHÁVEZ DE PAZ LE, BERGENHOLTZ G, DAHLÉN G, SVENSÄTER G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. **Int Endod J** 2006 May;40(5):344-55.

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

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.

DAHLEN, G., FABRICIUS, L., HEYDEN G., HOLM, S.E., MOLLER, A.J. Apical periodontitis induced by selected bacterial strains in root canals of immunized and nonimmunized monkeys. **Scand J Dent Res**. 1982 Jun; 90(3):207–16.

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.

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. **Journal of Endodontic** 2002 Oct;28(10):689-93.

DUARTE MAH, BALAN NV, MARCIA A. ZEFERINO MA, VIVAN RR, CARLOS ALBERTO H. MORAISCAH, TANOMARU-FILHO M, ORDINOLA-ZAPATA R, AND MORAES IG. Effect of Ultrasonic Activation on pH and Calcium Released by Calcium Hydroxide Pastes in Simulated External Root Resorption. **J Endod** 2012 Jun;38(6):834-7.

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, 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, 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, SYDNEY GB, BAMMANN L, FELIPPE Jr O: Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. **Rev Fac Odontol Bauru** 1994 Out/Dez: 2; 31-38.

ESTRELA C, SYDNEY GB, BAMMANN LL, FELIPPE Jr O: Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Braz Dent J** 1995 Sept: 6(2):85-90.

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.

FABRICIUS, L., DAHLEN, G., HOLM, S.E., MOLLER, A.J. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. **Scand J Dent Res**. 1982 Jun; 90(3):200-6.

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

FERREIRA FBA, SILVA E SOUZA PA, VALE MS, MORAIS IG, GRANJEIRO 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;388-392.

FERREIRA FBA. et al. Antimicrobial effect of própolis and other substances against selected endodontic pathogens. **Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2007Nov: 104; 709-716.

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.

FREIRE LG, CARVALHO CN, FERRARI PH, SIQUEIRA EL, GAVINI G. Influence of dentin on pH of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone or in combination. **Dent Traumatol**. 2010 Jun;26(3):276-80.

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 Oct;25(5):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 Dec;31(12):867-72.

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 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.

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.

GUIMARÃES BM, AMOROSO-SILVA PA, ALCALDE MP, MARCIANO MA, DE ANDRADE FB, DUARTE MA. Influence of ultrasonic activation of 4 root canal sealers on the filling quality. **J Endod**. 2014 Jul;40(7):964-8.

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

HARRISON AJ, CHIVATXARANUKUL P, PARASHOS P, MESSER HH. The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. **Int Endod J**. 2010 Nov;43(11):968–77.

HASSELGREN G, OLSSON B, AND CVEK M. "Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue." **J Endod.** 1988 Mar; 14;125–127.

HEGDE V, ARORA S. Effect of advanced irrigation protocols on self-expanding Smart-Seal obturation system: A scanning electron microscopic push-out bond strength study. **Contemp Clin Dent.** 2015 Jan-Mar;6(1):26-30

HOLLAND R, OTOBONI FILHO JA, DE SOUZA V, NERY MJ, BERNABÉ PF, DEZAN E JR. A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs' teeth with apical periodontitis. **J Endod.** 2003 Feb;29(2):121-4.

HOLLAND R, SOUZA V, NERY MJ, BERNABÉ DFE, MELLO W, OTOBONI FILHO JA: Apical hard tissue deposition in adult teeth of monkeys with use of calcium hydroxide. **Aust Dent J** 1980 Aug; 25; 189-192.

JIN Y, ZHANG T, SAMARANAYAKE YH, FANG HH, YIP HK, SAMARANAYAKE LP. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia** 2005 Apr; 159(3):353-60.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1965 Sept; 20(3):340–9.

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.

KAYAOGU G, ORSTAVIK D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Crit Rev Oral Biol Med** 2004; Sep 1;15(5).

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.

KLYN SL, KIRKPATRICK TC, RUTLEDGE RE. In vitro comparisons of debris removal of the endo activator system, the F file, ultrasonic irrigation, and NaOCl irrigation alone after hand-rotatory instrumentation in human mandibular molars. **J Endod.** 2010 Aug;36(8):1367-71.

LAUSTSEN MH, MUNKSGAARD EC, REIT C, BJORNDAL L. A temporary filling material may cause cusp deflection, infractions and fractures in endodontically treated teeth. **International Endodontic Journal** 2005 sept;38, 653–7.

LEONARDO MR, HERNANDEZ MEFT, SILVA LAB, AND TANOMARU-FILHO M. “Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study,” **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**.2006 Nov;102; 680–685.

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

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.

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.

Madarati A¹, Rekab MS, Watts DC, Qualtrough A. Time-dependence of coronal seal of temporary materials used in endodontics. **Aust Endod J**. 2008 Dec;34(3):89-93

MOHAMMADI Z AND DUMMER PMH. “Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology,” **Int Endod J**. 2011 Aug; 44; 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.

MOLLER, A.J., FABRICIUS L., DAHLEN, G., SUNDQVIST, G., HAPPONEN, R.P. Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains. **Eur J Oral Sci**. 2004 Jun; 112(3):207–15.

Dow propileno glicol USP/ EP.
http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_0034/0901b80380034a21.pdf?filepath=propyleneglycol/pdfs/noreg/117-01144.pdf&fromPage=GetDoc.

Acessado em 09/08/2015

NAIR PNR, SJTIGREN U, KAHNBERG K-E, SUNDQVIST G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a longterm light and electron microscopic follow-up study. **J Endod** 1990 Dec;16:580-8.

NAIR, P.N., HENRY, S., CANO, V., VERA, J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2005 Febr; 99:231-252.

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 Jun;19(6):302-6.

NG,Y.L.,MANN,V.,RAHBARAN S.,LEWSEY J.,GULABIVALA K.Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature – part 2. Influence of clinical factors. **Int Endod J**. 2008 Jan;41:6-31.

ORSTAVIK D, KERESKES K, MOLVEN O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study. **Int Endod J**. 1991 Jan;24(1):1–7.

PÉCORA JD et al.. Effect of Dakins and EDTA solutions on dentin permeability of root canals. **Braz Dent J**.1993;4;79-84.

PETERS AO, PETERS CI. Limpeza e moldagem do sistema de canais rediculares. In: HARGREAVES KM, COHEN S ,Editores, FERNANDES-FILHO et al., Tradutores. Caminhos da Polpa. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 265-323.

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 Jan;35(1):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, 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.

RÖDIG T, SEDGHI M, KONIETSCHKE F, LANGE K, ZIEBOLZ D, HÜLSMANN M. Efficacy of syringe irrigation, RinsEndo and passive ultrasonic irrigation in removing debris from irregularities in root canals with different apical sizes. **Int Endod J.** 2010 Jul;43(7):581-9.

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

SAFAVI KE, NICHOLS FC. "Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide," **J Endod.** 1993 Feb;19(2):76-8.

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

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

SEDGLEY C, NAGEL A, DAHL EN G, REIT C, MOLANDER A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. **J Endod** 2006 Mar;32:173–7.

SEIDENFELD MA, HANZLIK PJ. The general properties, actions and toxicity of propylene glycol. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** . 1932 Jan;44 , 109–21.

SILVEIRA FF, LEONARDO MR; ITO IY; SILVA LAB, TANOMARU FILHO M. Avaliação histomicrobiológica após curativo de demora com pastas à base de hidróxido de cálcio por diferentes períodos de tempo. **Rev. Bras. Odontol** 2001 jul-ago;58(4):224-7.

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 Oct;80:459-464.

SIQUEIRA JF JR., "Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail," **Int Endod J.** 2001 Jan;34;1-10.

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, J.R.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 JR. J.F., RÔÇAS I.N. Diversity of endodontic microbiota revisited. **J Dent Res** 2009 Nov; 88(11):969–981

SIQUEIRA JF JR, RÔÇAS IN. Polymerase chain reaction- Based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2004 Jan;97(1):85-94.

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 JR JF. et al. Efeitos do hidróxido de cálcio associado a diferentes veículos sobre dentina contaminada. **Rev Bras Odontol.** 2001 Jan/Fev;58; 44-47

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.

STUART CH, SCHWARTZ SA, BEESON TJ, OWATZ CB. Enterococcus faecalis: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **J Endod.** 2006 Feb;32(2):93-8.

TENNERT C¹, EISMANN M, GOETZ F, WOELBER JP, HELLWIG E, POLYDOROU O. A temporary filling material used for coronal sealing during endodontic treatment may cause tooth fractures in large Class II cavities in vitro. **Int Endod J.** 2015 Jan;48(1):84-8.

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 G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Umeå, Sweden: University of Umeå; 1976. Dissertation.

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

TANOMARU JMG, LEONARDO MR, TANOMARU FILHO M, BONETTI FILHO I, AND SILVA LAB. "Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS." **Int Endod J**. 2003 Nov: (36)733-739.

TRONSTAD L, "Recent development in endodontic research," **Scandinavian Journal of Dental Research**, 1992 Feb: (100);52–59.

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.

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 through dentine. **Int Endod J**. 1988 Jan;21(1):17-26.

WASFY MO, MCMAHON KT, MINAH GE, FALKLER WA. Microbial evaluation of periapical infections in Egypt. **Oral Microbiol Immunol** 1992 Apr (7):100-5.

ZAMPRONIO CF, SIVIERI-ARAÚJO G, BONETTI-FILHO I, BERBERT FL. pH changes after manual or ultrasonic instrumentation and smear layer removal with EDTA or ultrasonic. **Dent Traumatol**. 2008 Oct;24(5):542-5.

ZOLETTI GO, SIQUEIRA JF JR, SANTOS KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches **Journal of Endodontic** 2006 Aug;32(8):722-6.