UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

REINALDO DIAS DA SILVA NETO

Avaliação da atividade antimicrobiana dos materiais restauradores temporários: teste de difusão em ágar, quantificação do biofilme e micro-organismos dos canais radiculares submetidos ao desafio ácido *in situ*

Ribeirão Preto
2019

REINALDO DIAS DA SILVA NETO

Avaliação da atividade antimicrobiana dos materiais restauradores temporários: teste de difusão em ágar, quantificação do biofilme e micro-organismos dos canais radiculares submetidos ao desafio ácido *in situ*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Odontologia Restauradora (Opção: Endodontia).

Orientadora: Profª Drª Aline Evangelista de Souza Gabriel

Versão corrigida

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE SEJA CITADA A FONTE.

Assinatura do autor: _____ Data: ___/___/2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva-Neto, Reinaldo Dias.

Avaliação da atividade antimicrobiana dos materiais restauradores temporários: teste de difusão em ágar, quantificação do biofilme e micro-organismos dos canais radiculares submetidos ao desafio ácido *in situ*. Reinaldo Dias da Silva Neto. Ribeirão Preto, 2019.

"Versão corrigida da Tese. A versão original se encontra disponível na Unidade que se aloja o programa"

100p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP), área de concentração: Odontologia Restauradora – Opção: Endodontia.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Aline Evangelista Souza Gabriel

1. Restauração Dentária Temporária. 2. Biofilme Dentário. 3. Microbiologia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SILVA-NETO, Reinaldo Dias.

Título: Avaliação da atividade antimicrobiana dos materiais restauradores temporários: teste de difusão em ágar, quantificação do biofilme e micro-organismos dos canais radiculares submetidos ao desafio ácido *in situ.*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências junto ao Programa de Odontologia Restauradora com Área de Concentração: Odontologia Restauradora (Opção: Endodontia).

Aprovado em: ___/___/____

Banca Examinadora

Presidente: Profª Drª Aline Evangelista de Souza Gabriel

Instituição: Universidade de São Paulo/ Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Prof. (a).Dr.(a).:_____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. (a).Dr.(a).:_____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. (a).Dr.(a).:_____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Este trabalho de pesquisa foi realizado nos Laboratórios de Pesquisa em Dentística e Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e no Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com auxílio de pesquisa CNPQ (processo: 140396/2016-0).

Dedicatória

*À **Deus** por me levar a voos tão altos que nem nos meus melhores sonhos eu poderia imaginar. Sou grato por ser meu companheiro diário e estar presente nas alegrias, adversidades e me ensinar sempre a me tornar uma pessoa mais resiliente.*

*Aos meus pais, **Rosângela Carrasco** e **Sérgio Carrasco** exemplos de amor, carinho, atenção, oração e palavras de conforto e sabedoria. Vocês são os maiores responsáveis por esta conquista, obrigado por sempre estarem presentes na minha vida e por diariamente me motivarem a ser uma pessoa melhor ao servir o meu próximo.*

*A toda minha **Família** por se fazer sempre presente, seja fisicamente, com ligações, orações e carinho. Obrigado por sempre lembrarem das minhas origens.*

*Aos meus melhores amigos **Isabella Rodrigues Ziotti** e **Thiago Vinícius Cortez** por todos os dias me ouvir, acalmar, aconselhar, ajudar, acreditar e por dividir momentos especiais em conversas ou almoços. Os superpoderosos juntos, sempre salvam os dias!*

Agradecimentos

À *Prof.ª Dr.ª Aline Evangelista Souza Gabriel*, por todas as experiências compartilhadas durante toda a minha pós-graduação. Agradeço a oportunidade de ser seu orientado por 5 anos, por todo conhecimento, pela orientação acadêmica, direcionamento e orientações que me fizeram crescer e amadurecer. Sou extremamente grato por todo seu auxílio na realização deste projeto e também pelas contribuições na minha formação profissional e pessoal.

Ao *Prof. Dr. Antônio Miranda da Cruz Filho,* coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, agradeço por todas as oportunidades que me concedeu e por ter aberto as portas do Programa para a realização dos meus estudos.

Ao *Prof. Dr. Manoel D. Sousa Neto*, chefe do Departamento de Odontologia Restauradora e professor importante durante toda a pós-graduação. Obrigado pelas oportunidades que me proporcionou até aqui.

Ao *Prof. Dr. Sérgio Luiz de Souza Salvador* pela sua importante contribuição com o delineamento e execução deste projeto. Agradeço por sempre me ajudar, acalmar e orientar, sempre serei grato por poder conviver diariamente e aprender com o senhor.

A técnica *Marina Del Arco* pelo convívio semanal e por sempre me receber com um sorriso no rosto e sempre tentar me encaixar na agenda do laboratório para a execução do projeto. Agradeço por sua participação neste trabalho.

A *Prof.ª Dr.ª Silmara Aparecida Milori Corona,* professora de importância fundamental na formação acadêmica, por saber mostrar o quanto o lado humano deve estar presente nas relações pessoais e por mostrar como a carreira acadêmica pode ser encantadora.

A *Prof.ª Dr.ª Regina Guenka Palma-Dibb,* pela contribuição na qualificação deste projeto.

A *Prof.ª Dr.ª Mônica Campos Serra* por diariamente mostrar que com organização e dedicação podemos realizar tudo o que acreditamos.

Ao *Prof. Dr. Luiz Pascoal Vansan,* por todas as nossas conversas que me auxiliaram muito neste caminho.

Aos amigos professores, *Prof. Dr. Fábio Dametto, Prof. Dr. Marcílio Dias, Prof. Dr. Norberto Faria* e *Prof.ª Dr.ª Rejane Andrade*, por serem meus primeiros professores em Endodontia por acreditarem em mim e me mostrarem o encantado da ciência endodôntica.

Aos amigos da Pós-Graduação, *Bárbara Jobim, Bruna Maria, Bruna Tonin, Diego Brandariz, Fabiana Curylofo, Elaine Santos, Flávia Cabral, Isabela Quero, Júlia Gallas, Kelly Roccio, Laís Lopes, Laís Ranieri, Leonardo Lobo, Raí Matheus, Raony Môlim, Rienne Mattos, Thais Fillus e Victor Trassi* por tudo o que vocês agregaram em minha vida nesta caminhada. Agradeço em especial *Lais Líma Pelozo* e *Thiago Vinícius Cortez* que contribuíram em várias etapas deste trabalho.

À minha querida turma do doutorado, *Isabella Rodrigues Ziotti, Isabela Lima, Mirian Saavedra, Marina Godoi e Shelyn Yamakami.*

Aos alunos das *clínicas de graduação em Dentística e Endodontia FORP-USP* tenham certeza que vocês tornaram o caminho em busca do aprendizado mais prazeroso.

Aos amigos que a Odontologia me deu, sou grato por sempre terem uma palavra de conforto e amizade*, Ana Paula Rufino, Fagner Oliveira, Pedro Henrique Sette e Talita Hayaxibara.*

Aos meus amigos de fé, *Diego Phelipe, Jônatas Farizatto, Luiz Felipe Arruda e Leonardo Pedroza,* por serem meu refúgio em todos os momentos desta caminhada.

A minha querida vó *Ana Carrasco* e o vô *Roberto Barbiero* por todo seu amor e carinho desprendido por mim.

Aos meus queridos padrinhos *Sandra Brito e Roberto Brito* por todo amor e carinho que vocês demonstram por mim.

Aos meus queridos tios, *Ângela Benites, Claudemir Benites (in memorian), Crystian Benites, Irani Benites e Sônia Barbiero,* por sempre mandarem mensagem de amor, carinho, cuidado e afeto.

Aos técnicos de Laboratório *Patrícia Marchi, Reginaldo Santana e Vivianne Cássia*, por sua companhia diária e, principalmente, pela eficiência com que sempre me ajudaram.

Aos queridos funcionários *Antônio Sérgio Aparecido Mesca, Benedito Aparecido Silva, Débora Fernandes, Fátima Rizoli, Fred Augusto Batista Farias, Gledson Antunes da Silva, Hermano Teixeira Machado, Karina Dadalt Quaglio, José Aparecido Neves do Nascimento, Juliana Godoi de Oliveira Silva, Júlio César Souza da Matta, Maria Amália Viesti de Oliveira, Maria Isabel Francisco Miguel, Mary Possani Carmessano, Rosângela Angelini, Silvia Helena Fabris F. Campos e Vera do Nascimento Scandelai,* agradeço por sempre me auxiliarem quando necessário.

Ao secretário da Pós-graduação *Carlos Feitosa,* companheiro e amigo diário sempre atencioso em me atender, tirando as dúvidas, aconselhando e acalmando sempre.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio financeiro.

"Pois o Senhor, o seu Deus, os acompanhará e lutará por vocês contra os seus inimigos, para dar a vitória a vocês".

Deuteronômio 20:4

Resumo

SILVA-NETO, R.D. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos materiais restauradores temporários: teste de difusão em ágar, quantificação do biofilme e micro-organismos dos canais radiculares submetidos ao desafio ácido i*n situ*.** 2019. 100p. Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

As restaurações temporárias são essenciais para a manutenção da assepsia após o tratamento dos canais. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana dos materiais restauradores temporários por meio do teste de difusão em ágar, além da quantificação do biofilme formado sobre as restaurações e dos micro-organismos presentes no sistema de canais radiculares, após desafio ácido em meio bucal. Foram testados 4 materiais temporários: ionômero de vidro de alta viscosidade (CIV AV; Ketac Molar/ 3M), ionômero de vidro fotoativado (CIV foto; Riva Light Cure/SDI), óxido de zinco sem eugenol (OZ; Coltosol/Coltene) e óxido de zinco com eugenol (OZE; IRM/Dentsply). Para o estudo *in vitro,* foram confeccionados discos de cada material, além de discos de papel embebidos em clorexidina 0,12% (CHX – controle positivo; Periogard, Colgate). Culturas bacterianas dos micro-organismos *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083)*, Enterococcus faecalis* (cepa clínica isolada do participante da pesquisa) e *Candida albicans* (ATCC 1023) foram cultivadas em caldo BHI. Quatro discos de cada material foram distribuídos nas placas de Petri com Muller Hinton ágar, em duplicata. Após 30 dias, foi mesurada a zona de inibição do material (mm) para cada micro-organismo. Para o estudo *in situ,* foram utilizadas 70 raízes de incisivos centrais inferiores humanos com 10 mm. Foi realizado o preparo biomecânico dos canais até o instrumento #40.02, esterilização em autoclave e obturação com AH Plus e cones de guta percha. Cinquenta e seis raízes foram divididas em 4 grupos experimentais e receberam um dos quatro materiais testados. Nas 14 raízes remanescentes, não se utilizou material sobre a obturação (controle negativo). Catorze participantes foram submetidos à moldagem das arcadas dentais e foram confeccionados dispositivos acrílicos palatinos com 5 nichos (4 raízes experimentais e 1 raiz controle). As raízes foram fixadas com cera e tela para favorecer o acúmulo de biofilme sobre as restaurações. Durante 28 dias, os participantes utilizaram o dispositivo e foram orientados a gotejar solução de sacarose 20%, 6x ao dia, sobre as amostras. Ao final do período, 11 participantes concluíram o experimento. As raízes foram removidas dos dispositivos e analisou-se: 1) a quantidade de biofilme formado sobre as raízes (mg); 2) a contagem total dos micro-organismos viáveis (UFC) e a prevalência dos estreptococcus do grupo mutans (EGM) e contagem de *Enterococcus spp.* (m-Enterococcus) presentes nos canais radiculares (UFC/mL). Os dados do teste de difusão em ágar apresentaram distribuição não-normal e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (α=0,05). Verificou-se que, independentemente do micro-organismo, a maior zona de inibição foi encontrada nos discos embebidos com CHX (15,45 ± 5,76 mm), sem diferença significante do OZE (8,99 ± 7,29 mm). As menores zonas de inibição foram encontradas para CIV foto (2,21 ± 0,40 mm b), CIV AV (2,42 ± 0,63mm b) e OZ (2,49 ± 0,39mm), todos

sem diferença significante do OZE. Na comparação isolada, todos os materiais apresentaram baixa atividade antimicrobiana contra cepas padrão de *S. mutans* e *E. faecalis* ATCC. Para a cepa clínica isolada de *E. faecalis* do paciente, o OZE apresentou maior atividade antimicrobiana que a CHX. Para *C. albicans*, o OZE apresentou resultados similares a CHX, e os demais foram inferiores e iguais entre si. No estudo *in situ*, os dados referentes ao biofilme apresentaram distribuição não-normal (Kruskall-Wallis e Dunn, $p<0,05$). O menor acúmulo de biofilme foi verificado nas raízes seladas com CIV foto (16mg a) e CIV AV (16mg a), e ambos não diferiram estatisticamente do OZE (48mg ab) e OZ (41mg ab). As raízes sem material temporário apresentaram maior acúmulo de biofilme (90mg b), também sem diferença do OZE e OZ. Os dados para a contagem dos micro-organismos apresentaram distribuição normal ($p>0,05$) e foram analisados por Análise de Variância a dois critérios (material x terços) e teste de Tukey. Para a contagem geral, houve maior quantidade de micro-organismos nos terços cervical (2,44 ± 0,65 b) e médio (2,11 ± 0,71b) ($p>0,05$) e a menor foi encontrada no terço apical (1,52 ± 1,16 a) ($p<0,05$). Na contagem de *S. mutans,* verificou-se que as raízes seladas com OZE (1,06 ± 1,06 a) apresentaram menor quantidade de micro-organismos ($p<0,05$), similares ao CIV foto (1,65 ± 0,93 ab) e CIV AV (1,53 ± 0,85 ab). O OZ propiciou maior penetração de micro-organismos no canal (1,78 ± 0,92 b), sem diferença significante dos CIVs e do controle sem restauração (1,86 ± 1,11 b). Para o *E. faecalis*, o OZE (0,75 ± 0,70 a) apresentou menor quantidade de micro-organismos ($p<0,05$), sem diferença significante do CIV foto (1,29 ± 1,11 ab), CIV AV (1,27 ± 1,06 ab) e OZ (1,00 ± 1,13 ab). O controle negativo (sem restauração) mostrou maior acúmulo de micro-organismos no canal (1,72 ± 1,21 b). Concluiu-se que material temporário OZE apresentou maior ação antimicrobiana *in vitro*, embora o CIV fotoativado e o CIV de alta viscosidade demostraram expressiva inibição na formação de biofilme *in situ*. As restaurações temporárias com OZE, CIV foto e CIV de alta viscosidade reduziram o crescimento de micro-organismos no interior dos canais quando expostos ao desafio ácido em meio bucal.

Palavras-chave: Biofilme dentário; Restauração dental temporária; Terapia endodôntica, Microbiologia.

Abstract

SILVA-NETO, R.D. **Evaluation of the antimicrobial activity of temporary restorative materials: agar diffusion test, biofilm and root canal microorganism quantification submitted to *in situ* acid challenge.** 2019. 100p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Temporary restorations are essential for maintenance the aseptic chain after root canal treatment. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of temporary restorative materials using agar diffusion test, as well as to quantify of the biofilm formed on the restorations and the microorganisms in root canal system after acid challenge in oral environment. Four temporary materials were tested: high-viscosity glass ionomer (GIC HV; Ketac Molar/3M), light-activated glass ionomer (GIC-light; Riva Light Cure/SDI), zinc-oxide based cement without eugenol (ZO, Coltosol/Coltene) and zinc-oxide based cement with eugenol (ZOE; IRM/Dentsply). For the *in vitro* study, disks of each material were developed and paper disks were embedded in 0.12% chlorhexidine (CHX - positive control; Periogard, Colgate). Bacterial cultures of *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083), *Enterococcus faecalis* (strain of the research participant) and *Candida albicans* (ATCC 1023) microorganisms were stored in BHI broth. Two disks of each material were distributed in petri dishes with agar, in duplicate. After 30 days, the inhibition zone of the material (mm) was measured for each microorganism. For the *in situ* study, 70 roots of inferior human central incisors with 10 mm were used. The biomechanical preparation of the canals was performed until instrument # 40.02, root were sterilized by autoclaving and filled with AH Plus and gutta percha cones. Fifty-six roots were divided into 4 equal groups and received one of the tested materials. In the remaining 14 roots, no material was used (negative control). Fourteen participants were submitted to dental arch molding and palatine acrylic devices with 5 niches (4 experimental and 1 control) were made. The roots were fixed with wax and plastic mesh to allow the accumulation of biofilm on the restorations. For 28 days, participants used the device and were instructed to drip 20% sucrose solution, 6x daily, onto the samples. At the end of the period, 11 participants completed the experiment. The roots were removed from the devices and it were analyzed: 1) the amount of biofilm formed onto roots (mg); 2) the general quantity of microorganisms and the specific amount of *S. mutans* and *E. faecalis* in the root canals (Log10-CFU / mL). Data of the agar diffusion test had a non-normal distribution and were analyzed by the Kruskal-Wallis test (α=0.05). It was found that, regardless of the microorganism, the largest inhibition zone was found on the CHX soaked discs (15.45 ± 5.76 mm), with no significant difference in ZOE (8.99 ± 7.29 mm). The lowest zones of inhibition were found for GIC-light (2.21 ± 0.40 mm), CIV HV (2.42 ± 0.63 mm) and ZO (2.49 ± 0.39 mm), without significant difference of ZOE. In the isolated comparison, all materials had low antimicrobial activity against *S. mutans* and *E. faecalis* ATCC. For the *E. faecalis* of the patient, the ZOE had greater antimicrobial activity than the CHX. For *C. albicans*, the ZOE had similar results to CHX, and the others were either inferior or equal to each other. In the *in situ* study, biofilm data had a non-normal distribution (Kruskall-Wallis and Dunn, $p < 0.05$). The lowest biofilm accumulation was verified in the roots sealed with GIC-light (16mg a) and GIC HV (16mg a), and both did not differ statistically from ZOE (48mg ab) and ZO (41mg ab). The roots without temporary material had higher accumulation of biofilm (90mg b), also without difference of the ZOE. The data for the microorganism

had normal distribution ($p > 0.05$) and were analyzed by ANOVA at two criteria (material x thirds) and Tukey's test. For the general quantity, there were more microorganisms in the cervical (2.44 ± 0.65 b) and medium (2.11 ± 0.71 b) thirds ($p > 0.05$), and the lowest was found in the third apical (1.52 ± 1.16 a) ($p < 0.05$). For the *S. mutans*, it was verified that the roots sealed with ZOE (1.06 ± 1.06 a) had smaller amount of microorganisms ($p < 0.05$), similar to the GIC-light (1.65 ± 0.93 ab) and GIC HV (1.53 ± 0.85 ab). OZ provided a higher penetration of microorganisms in the canal (1.78 ± 0.92 b), without difference from GICs and control (1.86 ± 1.11 b). For *E. faecalis*, the ZOE (0.75 ± 0.70 a) had a lower quantity of microorganisms ($p < 0.05$), with no difference of the GIC-light (1.29 ± 1.11 a), GIC HV (1.27 ± 1.06 ab) and ZO (1.00 ± 1.13 ab). The negative control (without restoration) had a higher accumulation of microorganisms in the canal (1.72 ± 1.21 b). It was concluded that ZOE temporary material had higher antimicrobial action *in vitro*, although light-cured GIC and the high-viscosity GIC showed significant inhibition in the biofilm formation *in situ*. Temporary restorations with ZOE, light-cured GIC and high-viscosity GIC reduced the growth of microorganisms inside the root canals when exposed to the acid challenge in oral environment.

Keywords: Dental biofilm; Temporary dental restoration; Endodontic therapy, Microbiology.

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 31

2 PROPOSIÇÃO..... 39

3 MATERIAL E MÉTODO..... 43

3.1 *Delineamento experimental..... 45*

3.2 *Estudo in vitro: teste de difusão em ágar..... 46*

3.3 *Estudo in situ: quantificação do biofilme e eficiência da restauração temporária frente a desafio ácido..... 48*

3.4 Processamento microbiológico..... 57

3.4 *Análise dos dados..... 60*

***4* RESULTADOS..... 63**

4.1 Estudo in vitro: teste de difusão em ágar..... 65

4.2 Quantificação do biofilme formado sobre as raízes após o desafio ácido..... 68

4.3 Eficiência da restauração temporária e micro-organismos presentes nos canais radiculares..... 68

5 DISCUSSÃO..... 73

6 CONCLUSÕES..... 81

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 85

ANEXOS..... 95

Introdução

As infecções dos sistemas de canais são de origem polimicrobiana, com predomínio de micro-organismos anaeróbios estritos, que contribuem diretamente na patogênese das alterações pulpares e perirradiculares persistentes (MA et al., 2015; PEREIRA et al., 2017; RUIZ-LINARES et al., 2017; AL KHASAWNAH et al., 2018; HOEDKE et al., 2018). Os micro-organismos mais frequentemente isolados de canais radiculares infectados são bactérias dos gêneros *Peptostreptococcus, Prevotella, Porphyromonas, Bacteroides, Fusobacterium, Eubacterium, Actinomyces, Lactobacillus, Propionibacterium, Bifidobacterium, Veillonella* e *Capnocytophaga* e os facultativos *Streptococcus* e as espécies relacionadas tais como as dos gêneros *Enterococcus* e *Gemella* (DU et al., 2015; MUHAMMAD et al., 2015; RODRIGUES et al., 2017).

A desinfecção do sistema de canais radiculares visa à eliminação dos micro-organismos patogênicos e é comumente realizada pela limpeza e modelagem por meio do preparo químico-mecânico (MA et al., 2015; RODRIGUES et al., 2017; SOUSA-NETO et al., 2018). No entanto, a eliminação destes micro-organismos nem sempre é atingida, pode levar a reinfecção e, consequentemente, ao insucesso do tratamento endodôntico (ZANDI et al., 2016; RUIZ-LINARES et al., 2017; RODRIGUES et al., 2017; OLCAY et al., 2018; GARCIA-FONT et al., 2018). Todas essas variáveis podem ser prevenidas com cuidados que se iniciam desde a seleção do caso até o selamento dos canais radiculares (ASNAASHARI et al., 2016b; ZANDI et al., 2016; ASNAASHARI et al., 2016a; SOUSA-NETO et al., 2018).

O tratamento dos canais radiculares pode ser considerado concluído apenas quando for realizado o tratamento restaurador, devolvendo ao dente função como e estética (GILLEN et al., 2011; CUNHA et al., 2014; OMURLU et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2017). A restauração coronária temporária é necessária para que haja a manutenção da cadeia asséptica, evitando assim, a infiltração de bactérias e fluidos para o interior do sistema de canais radiculares entre as sessões de tratamento (SLUTZKY-GOLDBERG et al., 2009; BALTO et al. 2011; SRIVASTAVA et al., 2017). Neste contexto, a escolha do material temporário é de extrema importância para manter o adequado selamento em dentes tratados endodonticamente (CHEETHAM et al., 2014; SHARAFEDDIN et al., 2014; DEVIKA et al., 2016).

Os materiais temporários podem ser classificados de acordo com a composição: à base de óxido de zinco e eugenol, à base de sulfato de cálcio,

compósitos à base de resina composta, compósitos à base de resina reforçados com ionômero de vidro, materiais à base de ionômero de vidro e ionômero de vidro fotopolimerizável reforçado com resina composta (CUNHA et al., 2014; SHARAFEDDIN et al., 2014; DEVIKA et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2017). Apesar de existir uma variedade de materiais, são questionáveis as funções de vedar e prevenir a recontaminação do canal radicular pós-tratamento endodôntico (BALTO et al., 2011; CHEETHAM et al., 2014; SOHRABI et al., 2016). As propriedades requeridas para o material temporário ser adequado são: bom selamento marginal, porosidade mínima, ter estabilidade dimensional, resistência à abrasão e compressão, fácil colocação e remoção, relativa biocompatibilidade, estética, fácil manipulação, baixo custo e atividade antimicrobiana (CUNHA et al., 2014; DEVIKA et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2017).

O cimento de ionômero de vidro (CIV) tem sido utilizado por apresentar adesão química à estrutura dental, biocompatibilidade, atuam no processo remineralização por meio da liberação de íons flúor, além de possuir propriedades físicas adequadas, como módulo de elasticidade próximo à dentina e baixa solubilidade no ambiente oral (BURKE et al., 2013; KHOROUSHI et al., 2013; SIDHU et al., 2016; HAFSHEJANI et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2019). A liberação de flúor pode impedir a formação de lesões de cárie nas margens das restaurações (LUSSI et al., 2011; BELLO et al., 2014; TÜZÜNER et al., 2019). No entanto, os materiais contendo cimento de ionômero de vidro são sensíveis à técnica e o controle da umidade é obrigatório pois o contato da água na colocação ou no estabelecimento de resultados na dissolução do material (CHEETHAM et al., 2014; TÜZÜNER et al., 2019).

A substituição de parte do ácido poliacrílico por monômeros hidrófilos resultou no cimento de ionômero de vidro modificado por resina, no qual a reação ácido-base corresponde a uma parte do processo de presa do material e a outra parte é realizada por meio da polimerização dos radicais resinosos livres ativados pela luz visível (DIAS et al., 2018; ALIREZAEI et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2019). O processo de fotoativação pode causar estresse na interface e contração do material. Além disso, pode ocorrer maior sorção de água porque HEMA é um monômero hidrofílico, e apresenta menor liberação de flúor (FERRACANE et al., 2010; HAFSHEJANI et al., 2017; TÜZÜNER et al., 2019).

O cimento à base de eugenol de óxido de zinco pode ser encontrado no mercado com ou sem eugenol e é amplamente utilizado na prática clínica como material temporário, pois proporciona rápido manuseio, facilidade de inserção na cavidade e vedação adequada (LAI et al., 2007; KOAGEL et al., 2008). No entanto, demonstrou baixa adesão, selamento provisório inadequado, aumento do risco de fratura dentária devido à expansão tardia deste material (KOAGEL et al., 2008; BELLO et al., 2014).

A atividade antimicrobiana do material temporário é importante pois impede a recolonização do sistema de canais radiculares pela microbiota da cavidade oral e/ou bactérias provenientes da saliva (GILLEN et al., 2011; LI et al., 2014; SRIVASTAVA et al., 2017; TÜZÜNER et al., 2019). Com relação à atividade antimicrobiana dos materiais temporários, poucos são os relatos disponíveis na literatura. Dentre os materiais temporários com atividade antimicrobiana destacam-se os cimentos de ionômero de vidro (CIVs) por apresentar propriedades biologicamente favoráveis, longevidade das restaurações e importante papel na liberação de flúor (DEVIKA et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2017). Além disto, apresentam efeito cariostático, adesão química à estrutura dentária e biocompatibilidade (SRIVASTAVA et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2019).

Neste sentido, metodologias que combinem a terapia endodôntica convencional associada a presença de restauração temporária de diferentes materiais podem garantir a manutenção da cadeia asséptica com significativa redução microbiana e consequente elevação da taxa de sucesso do tratamento endodôntico (MUHAMMAD et al., 2015; OMURLU et al., 2016; SOHRABI et al., 2016).

Com relação a exposição em ambiente bucal, os dentes tratados endodonticamente podem ser expostos a infiltração de micro-organismos em decorrência de lesões de cárie, fratura da restauração ou do remanescente coronário e retardo da confecção da restauração definitiva após a terapia endodôntica que irá favorecer a perda de efetividade do selamento temporário (PAKDEETHAI et al., 2013; SHARAFEDDIN et al., 2014; WIERICHS et al., 2015; DEVIKA et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2017).

Diante da necessidade de avaliar o comportamento dos materiais restauradores no ambiente bucal, os estudos *in situ* ganharam reconhecimento como ferramenta auxiliar nas pesquisas pois se situa entre a situação clínica e o

ambiente altamente controlado em laboratório (MORIYAMA et al., 2014; PADOVANI et al., 2014; BAKHSH et al., 2015; SILVA-NETO et al., 2018). Geralmente, utilizam-se dispositivos para uso intraoral como placas em acrílico e grampos ortodônticos, nos quais os fragmentos dentais são fixos e permanecem expostos ao meio bucal contendo biofilme bacteriano (BARATIERI et al., 2012; PIERRO et al., 2014; PADOVANI et al., 2014; SOUZA-GABRIEL et al., 2015; SILVA-NETO et al., 2018). Na Endodontia, existem poucos trabalhos com fragmentos de dentes extraídos expostos ao ambiente bucal (BARTHEL et al., 2002; VIRTEJ et al., 2006; SILVA-NETO et al., 2018) e estes, apenas avaliaram apenas a eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras e o perfil de desgaste do material obturador.

A confecção da restauração temporária se faz necessária dentro do contexto no qual a endodontia e a odontologia restauradora procurem de forma integrada obter que o selamento coronário impeça a penetração de fluidos e micro-organismos da cavidade oral, visto que dentes expostos ao ambiente bucal tendem a ter migração bacteriana em direção ao periápice via canal radicular. Diante desta necessidade clínica, estudos que avaliem o comportamento de restaurações temporárias frente ao ambiente bucal poderiam ajudar a elucidar se a restauração temporária pode ser um método eficaz ou não na manutenção da cadeia asséptica até a confecção da restauração permanente.

Proposição

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar da atividade antimicrobiana de materiais restauradores temporários em dentes tratados endodonticamente. Para tanto, o estudo possuirá os seguintes objetivos específicos:

1. Mensurar o efeito antimicrobiano *in vitro* dos materiais restauradores temporários por meio do teste de difusão em ágar (mm);
2. Determinar a quantidade de biofilme formado sobre as raízes restauradas com os diferentes materiais e expostas ao ambiente ácido (mg);
3. Quantificar a contagem total dos micro-organismos viáveis nos canais radiculares e realizar a contagem específica para estreptococcus do grupo mutans (EGM) e *E. faecalis* após desafio ácido *in situ* (log^{10}-UFC/mL);

Material e Método

3.1. Delineamento experimental

Foi realizado um estudo com duas fases distintas: *in vitro e in situ.*

A fase *in vitro* averiguou o efeito antimicrobiano dos materiais restauradores temporários por meio do teste de difusão em ágar. Os fatores em estudo foram: material restaurador temporário em 4 níveis (OZE, OZ, CIV foto e CIV AV) e tipo de micro-organismo em 4 níveis (*S. mutans* ATCC 25175, *E. faecalis* ATCC 4083, *E. faecalis* - cepa de participante da pesquisa e *C. albicans* ATCC1023). A CHX foi utilizada como controle positivo. A variável resposta foi o diâmetro do halo de inibição após 30 dias, em mm.

O estudo *in situ* compreendeu uma fase intraoral de 28 dias em 14 participantes. Os participantes utilizaram dispositivos em acrílico contendo cinco raízes fixadas. O fator em estudo foi a restauração temporária em 5 níveis (4 experimentais - OZE, OZ, CIV foto e CIV AV; e 1 controle negativo – sem material).

Os participantes foram orientados a gotejar solução de sacarose nas raízes 6 vezes ao dia para favorecer o acúmulo de biofilme. Para a viabilização do estudo, os participantes utilizaram o dispositivo intraoral em períodos distintos. Assim, a pesquisa foi composta de 7 blocos aleatorizados de 2 participantes cada. As variáveis respostas foram: 1) quantidade de biofilme formado sobre as raízes (mg), 2) a quantidade de micro-organismos presentes nos sistemas de canais radiculares (meio MM_{10}), 3) contagens específicas de *E. faecalis* (m-Enterococcus) e *S. mutans* (SB_{20}) (log^{10}-UFC/mL). Na figura 1 tem-se a representação esquemática deste estudo.

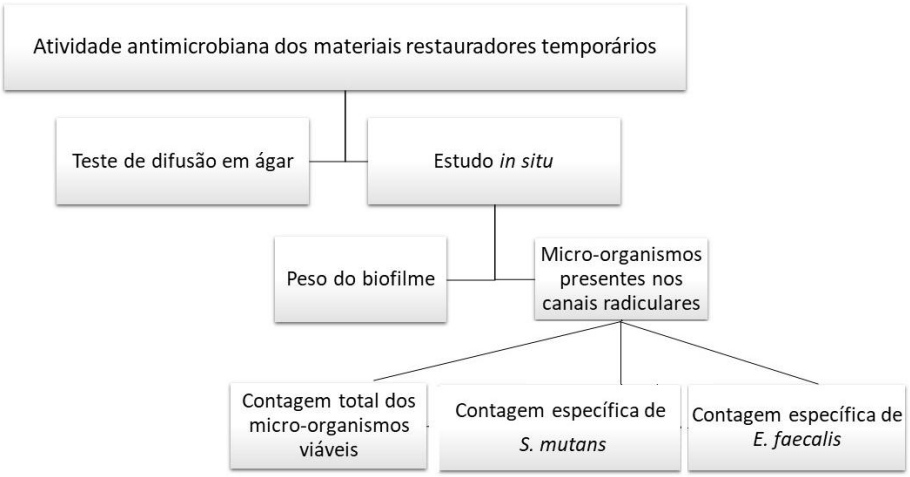

Figura 1 – Fluxograma da metodologia utilizada neste estudo

3.2. *Estudo in vitro: teste de difusão em ágar*

As análises da atividade antimicrobiana dos materiais restauradores temporários foram realizadas *in vitro* por meio do teste de difusão em ágar. Os materiais restauradores temporários utilizados neste estudo são demostrados na Figura 2.

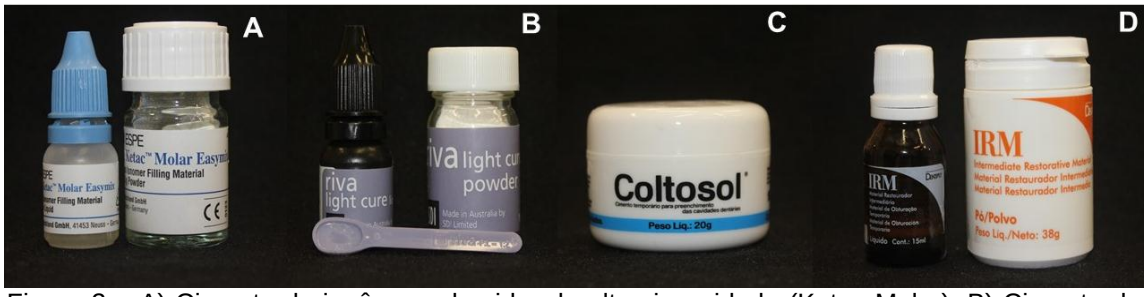

Figura 2 – A) Cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade (Ketac Molar); B) Cimento de ionômero de vidro fotoativado reforçado com resina composta (Riva Light Cure); C) Cimento de óxido de zinco sem eugenol (Coltosol); D) Cimento de óxido de zinco com eugenol (IRM).

A Tabela 1 apresenta a composição e classificação dos materiais restauradores temporários utilizados no estudo.

Tabela 1 – Materiais usados no estudo

Materiais	Composição	Classificação	Lote	Fabricante
Ketac Molar Easymix	Pó: fluorsilicato de vidro Al-Ca-La, 5% de copolimero ácido (ácido acrílico e maleico) Líquido: polyalkenoic, ácido tartárico e água	Cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade	Pó:635289 Líq:585454	3M ESPE
Riva Light Cure	70% de Vidro de Silicato Fluoroalumínio – Estrôncio, 1% de Dimetacrilato Trietileno Glicol, 9% de Metacrilato, Hidroxietil,11% de Ácido Poliacrílico, <0,5% Hidroxi Tolueno de Butila, <0,5% de Canforquinona, <0,5% Tetra Metil Anilina, 6% de Água e <0,5% de pigmento	Cimento de ionômero de vidro fotoativado	Pó170132 Liq:170108	SDI
Coltosol	Óxido de zinco, sulfato de cálcio, acetato de polivilina, mentol e dibutilftalato	Cimento de óxido de zinco sem eugenol	1601901	Coltene
IRM	Pó: Óxido de zinco, Poli-Metil Metacrilato (PMMA), acetato de zinco e pigmentos. Líquido: 99,5% de eugenol e 0,5% de ácido acético.	Cimento de óxido de zinco com eugenol	Pó:260704 Liq:236872	Dentsply

Foram confeccionados 8 discos, em duplicata, de cada um dos materiais e como controle foram utilizados discos embebidos previamente em solução de digluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard, Colgate-Palmolive, São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Para os discos de material restaurador temporário com 2 mm espessura de espessura aferida por paquímetro digital (Digit CAL SM; Tesa Technology, Bugnon, Suíça) foram realizados os seguintes protocolos com o auxílio de matriz:

- *Ketac Molar Easymix/3M ESPE: Colocou-se uma colher de pó nivelado e foi dispendida uma gota de líquido. Foi realizada a aglutinação do pó ao líquido em no máximo duas porções iguais com espátula plástica e levou-se a superfície da raiz.*
- *Riva Light Cure/SDI: Condicionamento da superfície com ácido fosfórico a 37% por 5 segundos, lavagem com água e remoção dos excessos de água com papel absorvente. Foi dispendida uma medida de pó para duas gotas de líquido. O pó foi dividido em duas partes iguais e misturou-se uma parte de pó por 10 segundos com uma espátula de plástico, na sequência foi adicionada a outra parte por mais 15 segundos. Realizou-se a fotoativação segundo recomendação do fabricante.*
- *Coltosol/Coltene: Retirou-se o material com espátula de inserção nº1 em quantidade necessária de material e foi aplicar sobre a superfície da raiz. Para auxiliar no endurecimento do material foi realizada a lavagem da superfície do material por 15 segundos.*
- *IRM/Dentsply: O pó e a gota de líquido foram mantidos separados na placa de mistura até o momento da espatulação. A espatulação completa teve como duração aproximada 1 minuto e foi realizada por técnica que misturou 50% do pó ao líquido. O pó remanescente foi levado a mistura em 2 a 3 incrementos e foi esfregada rigorosamente por 5 a 10 segundos.*

Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos materiais restauradores temporários sobre 4 tipos de cepas de micro-organismos: *S. mutans* (ATCC 25175), *E. faecalis* (ATCC 4083), *E. faecalis* (cepa clínica isolada de participante da pesquisa) e *C. albicans* (ATCC 1023). As cepas pertencentes ao Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Sérgio Luiz de Souza Salvador.

As culturas bacterianas foram cultivadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion; Sigma-AldricH, MO, EUA) com 24h de crescimento de cada micro-organismo. As cepas bacterianas foram padronizadas em espectrofotômetro (Micronal AJX-1000; São Paulo, SP, Brasil) à 625nm, para atingir concentrações de $1,5x10^8$ UFC/mL.

Com as suspensões padronizadas foi adicionado individualmente, 1,0 mL de cada micro-organismo em Placas de Petri 90 x 15 mm com Muller Hinton ágar (Difco, Detroid, MI, EUA) pela técnica de inundação da superfície.

Posteriormente, com auxílio de pinça estéril, 2 discos foram distribuídos equidistantementes na superfície de Placas de Petri conforme Figura 3. As placas contendo *S. mutans* foram incubadas à 37ºC em atmosfera de microaeroflia (chama de vela), enquanto os demais micro-organismos foram incubados à 37ºC em atmosfera de aerobiose, por 48h. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Após 30 dias, os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados com o auxílio do paquímetro digital (Mitutoyo, Tóquio, Japão).

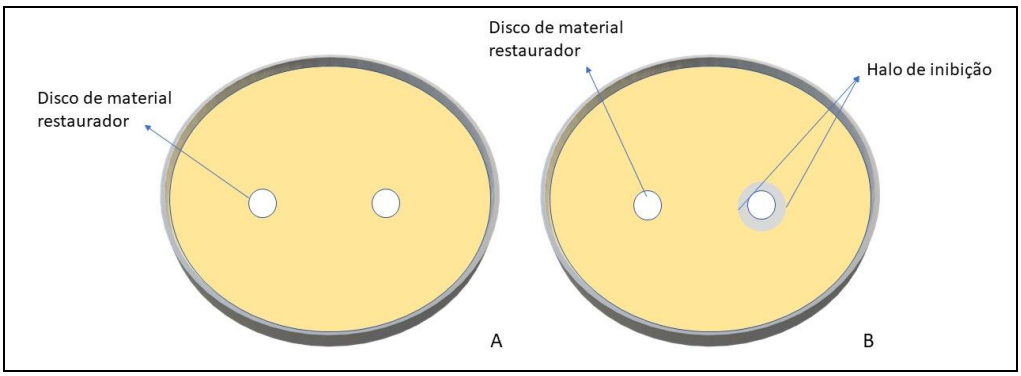

Figura 3 – Representação das amostras utilizadas na técnica do teste de difusão em ágar. A) Disposição dos materiais restauradores temporários. B) Comparação entre o disco de material e o halo formado ao redor do disco de material restaurador temporário.

3.3. Estudo in situ: quantificação do biofilme e micro-organismos presentes nos canais radiculares frente à desafio ácido

Cálculo amostral

Para o estudo *in situ* foi realizado o cálculo do tamanho amostral pelo programa Graphpad Statemate 2.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). O tamanho da amostra ideal para assegurar poder de 80% na análise estatística dos dados obtidos neste estudo foi calculado, considerando-se as diferenças das médias e desvios-padrões, baseado em estudo *in situ* anterior utilizando desafio cariogênico (HASS et al., 2016; SILVA-NETO et al., 2018) que considerou o desvio padrão de 3,4 e o erro máximo de 5%, portanto, obtendo o tamanho de amostra de 11

participantes. Adicionando 20% à amostra devido a possíveis perdas, foi estabelecida a amostra de 14 participantes.

Aspectos éticos e participantes

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil – FORP/USP (CAAE: 70730217.5.0000.5419) (ANEXO A) e foi conduzido de acordo com as regulamentações sobre pesquisas com seres humanos do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (Resolução n°466 de 12/12/2012).

Os participantes receberam as informações correspondentes à metodologia da pesquisa, seus riscos e benefícios, sendo também informados sobre seus direitos de desistirem da pesquisa em qualquer fase da execução da mesma. Recebidas as informações, os participantes assinaram um "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido", concordando em participar e colaborar com a realização do experimento (ANEXO B).

Os participantes em potencial foram submetidos à anamnese e exame clínico para que sejam checados os critérios de inclusão e exclusão (QUADRO 1) (SILVA-NETO et al., 2018).

Quadro 1 – Critérios de inclusão e exclusão aplicados para a seleção dos participantes da pesquisa.

Critérios de inclusão	**Critérios de exclusão**
• Idade entre 18 e 35 anos;	• Histórico de problemas neurológicos centrais e/ou periféricos;
• Apresentar saúde bucal adequada;	• Distúrbios de ordem digestiva;
• Não apresentarem histórico de quaisquer sinais e sintomas de reações alérgicas aos produtos utilizados;	• Tratamento ortodôntico com aparelho fixo;
• Disponibilidade de tempo para comparecer ao local da pesquisa;	• Presença de próteses fixas e removíveis;
• Disposição para cumprir as determinações.	• Uso de medicação controlada;
• Fluxo salivar.	• Grávidas e lactantes;
	• Fumantes.

Análise do fluxo e pH da saliva dos participantes

Para medir o fluxo salivar, os participantes permaneceram sentados e relaxados por alguns minutos na cadeira odontológica. Em seguida, foram instruídos

a mascar um pedaço de parafina (51 por 48 mm) sem sabor por 30 segundos e desprezar a primeira quantidade de saliva, expelindo-a.

A partir deste momento, a saliva estimulada foi coletada em tubo de ensaio graduado em 5 mL, com auxílio de funil de vidro, durante 5 minutos. Após o repouso da saliva por 1 minuto, o volume foi medido e a taxa do fluxo salivar foi calculada em mL/min. O pH inicial da saliva foi medido utilizando-se um pHmetro digital calibrado (Jenway 3510 pH-meter; Barloworld Scientific, Essex, Reino Unido). A leitura do aparelho foi realizada com o eletrodo submerso na amostra, sendo convertida para escala de pH.

Para participarem do estudo, os participantes deveriam ter fluxo salivar normal entre 1,0 a 3,0 mL por minuto e pH da saliva entre 5,0 a 6,9 (SILVA-NETO et al., 2018).

Confecção dos dispositivos intra-bucais

Cada participante selecionado teve suas arcadas (superior e inferior) moldadas com hidrocolóide irreversível de presa rápida (Tropicalgin; Zhermack, Badia Polesine, Rovigo, Itália). Os moldes foram vazados em gesso pedra (Velmix; Sybron Kerr, São Paulo, SP, Brasil), obtendo-se os respectivos modelos de trabalho. Foram confeccionados dispositivos palatinos em resina acrílica autopolimerizável transparente (Ortoclass; Belo Horizonte, MG, Brasil) com 5 nichos (2 no lado esquerdo, 2 no lado direito e 1 na região central) da superfície externa medindo 12 x 6 x 5 mm, para a fixação das raízes (SILVA-NETO et al., 2018).

Preparo dos dentes

Setenta incisivos centrais inferiores humanos hígidos, recém-extraídos, provenientes do Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto foram armazenados em solução de timol 0,1% a 9°C. Os dentes foram lavados em água corrente por 24 h para remoção dos traços da solução e, em seguida, submetidos à raspagem para remoção de restos de tecido periodontal ou ósseo e limpeza com pedra pomes e água. Os dentes foram analisados por meio de lupa estereoscópica (Nikon Inc. Instrument Group, Melville, NY, EUA) a fim de comprovar a ausência de defeitos estruturais e formação completa da raiz. Foram também radiografados para verificar a presença de único canal radicular e ausência de reabsorções internas ou calcificações.

Secção dos dentes

Os dentes foram seccionados na junção amelo-cementária com discos acoplados à máquina de corte (Isomet 1000; Buehler Ltda, Lake Bluff, IL, EUA), sob refrigeração, de modo a separar as porções coronárias e radiculares. Foi realizado um bisel na junção amelo-cementária com disco diamantado dupla face (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em baixa rotação (Kavo, Joinvile, SC, Brasil), com a finalidade de expor a área de contato da raiz ao biofilme bacteriano. O comprimento radicular foi padronizado em 10 mm e foi checado com paquímetro de precisão (Digit CAL SM; Tesa Technology, Bugnon, Suíça). Na Figura 4, tem-se a representação esquemática do estudo.

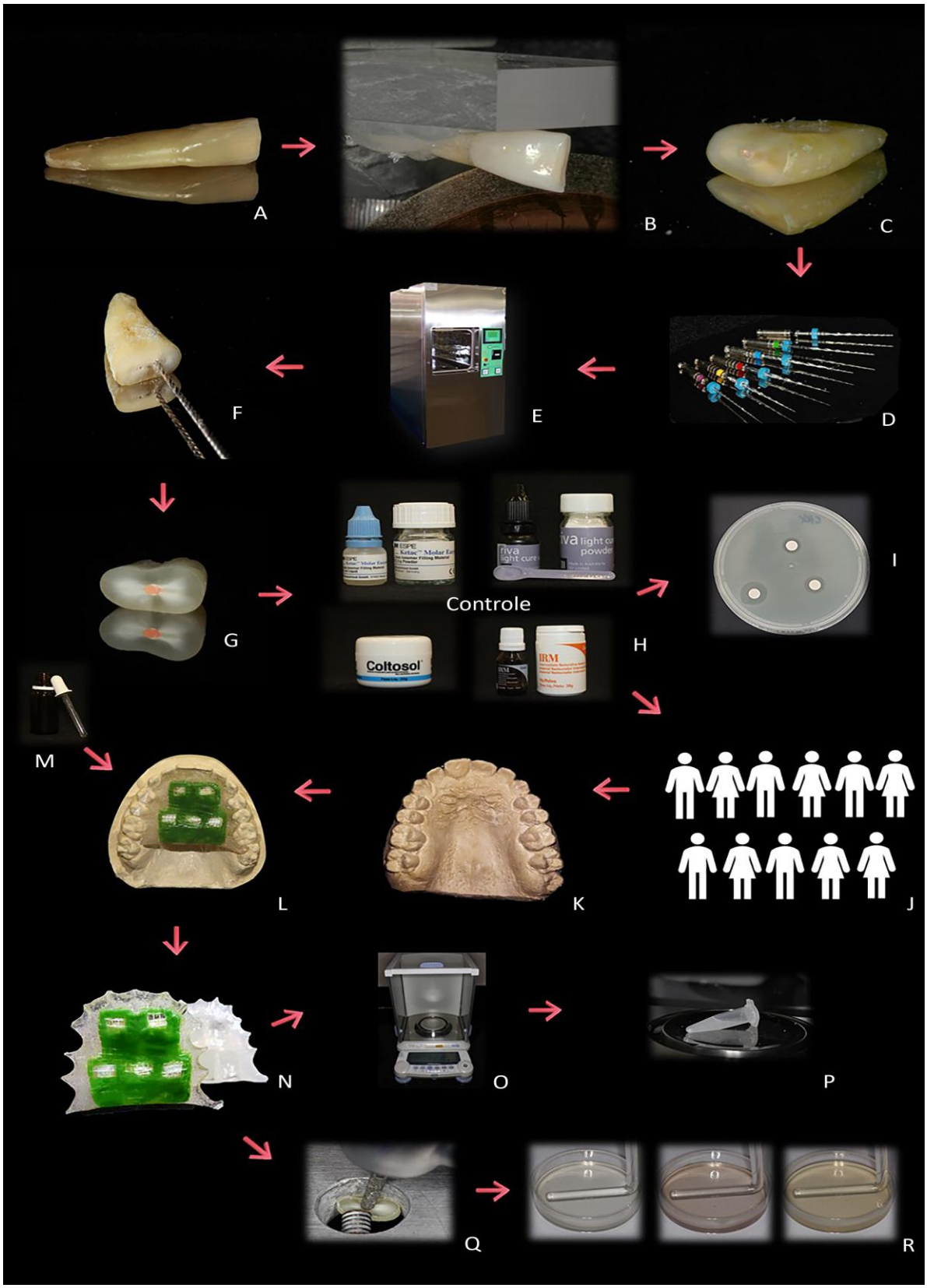

Figura 4 – A) Incisivos inferiores humanos; B) Dentes levados a cortadeira de precisão; C) Raízes padronizadas em 10 mm; D) Preparo biomecânico; E) Raízes esterilizadas em autoclave; F) Verificação do comprimento de trabalho após a esterilização com lima K #40; G) Obturação das raízes; H) Grupos experimentais; I) Teste de difusão; J) Seleção dos participantes; K) Moldagem dos participantes; L) Confecção dos dispositivos acrílico; M) Fase intraoral; N) Remoção das raízes dos dispositivos; Q) Pesagem do biofilme; P) Congelamento da amostra; Q) Coleta das raspas de dentina; R) Análise microbiológica.

Tratamento dos canais radiculares

A exploração dos canais radiculares foi feita com lima manual tipo K número 10 (Dentsply Sirona, Filadélfia, PA, EUA), sendo introduzida no interior do canal até que a ponta coincida com o terço apical. O comprimento de trabalho (CT) foi determinado recuando-se 1,0 mm do comprimento da raiz. A fim de se evitar a desidratação, as raízes foram mantidas em gazes estéreis umedecidas durante toda a instrumentação.

O preparo biomecânico foi realizado pela técnica de instrumentação por movimento rotatório e reciprocante, realizando o preparo cervical com LA Axxess para remoção de interferências e instrumentação por movimento reciprocante com o sistema Reciproc (VDW GmbH, Munique, Alemanha) com o instrumento R25 no motor elétrico VDW Silver X Smart (VDW GmbH, Munique, Alemanha), complementada com o instrumento #40.02 do sistema MTWO (VDW GmbH, Munique, Alemanha) e irrigação com hipoclorito de sódio a 1% (Cloro Rio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os canais foram irrigados com 2 mL de hipoclorito de sódio a 1% após o uso do instrumento de cada instrumento. A agulha foi inserida o mais próximo possível do comprimento de trabalho sem travar. Após o preparo biomecânico, realizou-se sulcos com discos diamantados nos terços cervical, médio e apical com objetivo de facilitar a secção dos slices após a fase intraoral.

Esterilização das raízes dentais

As raízes dentais submetidas ao preparo biomecânico foram colocadas em béqueres contendo água destilada estéril e foram individualmente levadas à autoclave. A esterilização dos fragmentos dentais foi realizada em autoclave a 121°C durante 15 minutos (CASELLATTO et al., 2006; JACOB et al., 2010; SILVA-NETO et al., 2018), imersos em água destilada. Após a esterilização, os espécimes foram analisados em *Microscópio* Confocal a *Laser* (LEXT, 3D Measuring *Laser* Microscope OLS 4000, Tóquio, Japão) e nova seleção foi realizada e aquelas que apresentaram trincas ou fissuras foram excluídas e repostas. Ao final, 70 raízes foram selecionadas.

Obturação das raízes

Para a obturação, foi introduzido manualmente o instrumento #40 estéril até o comprimento de trabalho. Em seguida, foi realizada a aplicação de 2 mL de ácido

etilenodiaminotetracético (EDTA) a 17% por 3 minutos, irrigação final com 2 mL hipoclorito de sódio a 1% e na sequência, 2 mL de água deionizada por 1 minuto. A secagem do canal radicular foi realizada com cones de papel absorvente estéril 40 (Dentsply Sirona, Filadélfia, PA, EUA).

A técnica de obturação selecionada foi a técnica de condensação lateral, utilizando o cimento à base de resina epóxica (AH Plus; Dentsply Sirona, Filadélfia, PA, EUA). O cimento foi proporcionado e manipulado de acordo com as instruções do fabricante.

O AH Plus (Dentsply Sirona, Filadélfia, PA, EUA) é um cimento composto por duas pastas à base de resina epóxica. As pastas foram misturadas em partes iguais de volume (1:1) até se obter consistência homogênea. O tempo mínimo de trabalho é de 4 horas e o tempo de endurecimento é de 8 horas (MARÍN-BAUZA et al., 2012; CHANG et al., 2015).

Após a mistura, o cimento foi utilizado em conjunto com cone de guta-percha. O excesso de material obturador foi removido da entrada do canal com condensador *Fine Medium* (Sybron Endo, Glendora, CA, EUA) previamente acoplado ao dispositivo de geração de calor (Denjoy Dental Co. Ltda., Changsha, Hunan, China).

A seguir, com a guta-percha ainda plastificada, foi realizada a condensação vertical com o condensador manual nº 2 (Sybron Endo, Glendora, CA, EUA) a frio, com pressão leve e firme em direção apical por 5 segundos. Após o procedimento de obturação foi realizada a limpeza da cavidade com pequenos fragmentos de esponja embebidos em álcool 70°.

Divisão dos grupos experimentais

Setenta raízes foram divididas em 5 grupos. Catorze raízes que receberam obturação com cimento endodôntico e guta-percha e foram destinadas ao grupo controle. Cinquenta e seis raízes foram divididas em 4 grupos de 14 raízes e foram restauradas com: cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade (Ketac Molar EasyMix; 3M/ESPE, St.Paul, MN, EUA), ionômero de vidro fotoativado reforçado com resina composta (Riva Light Cure; SDI Limited, Bayswater, Austrália), cimento de óxido de zinco sem acréscimo de eugenol (Coltosol; Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e cimento de óxido de zinco com eugenol (IRM; Dentsply-Sirona, Filadélfia, PA, EUA).

Fase intraoral

O estudo foi inicialmente conduzido com 14 (catorze) participantes de ambos os sexos. Foi realizado o período de calibração (lead in) de 7 dias, no qual os participantes foram instruídos a utilizar a escova dental (Oral-B Indicator 35; Gillette do Brasil Ltda., Manaus, AM, Brasil) e o dentifrício (Gel Dental Colgate; Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil) fornecidos pelo pesquisador. Após este período, foi verificada a adaptação intraoral dos dispositivos, foram realizados os ajustes, quando necessários, e os dispositivos palatinos foram instalados nos participantes.

As raízes tiveram seus ápices protegidos com restauração com resina composta nanohíbrida (Filtek Z250XT; 3M/ESPE, St. Paul, MN, EUA) por meio de técnica incremental, seguindo as recomendações do fabricante. As raízes foram impermeabilizadas e fixadas com cera em cada dispositivo palatino: uma raiz do grupo controle negativo (sem material restaurador) e as demais obturadas com um dos materiais restauradores temporários analisados no estudo (Figura 5). Para a disposição das raízes no dispositivo foi realizado sorteio prévio para garantir a aleatorização em cada um dos nichos. A fixação destas raízes foi realizada 2 mm aquém da superfície do dispositivo. Sobre cada uma das raízes fragmentos, foi fixada uma tela plástica para facilitar o acúmulo de biofilme (CHIMELLO et al., 2008; SOUZA-GABRIEL et al., 2015; SILVA-NETO et al., 2018).

Figura 5 – Dispositivo acrílico pronto para a fase intraoral

O aparelho instalado foi utilizado por 28 dias e a aplicação de solução foi iniciada no segundo dia. Os participantes foram instruídos a remover o dispositivo e gotejar solução de sacarose 20% seis vezes ao dia, em cada uma das raízes às

8:00; 11:00; 15:00; 17:00; 19:00 e 21:00 horas (CHIMELLO et al., 2008; SOUZA-GABRIEL et al., 2015; SILVA-NETO et al., 2018). Cinco minutos depois, o dispositivo foi reinserido no ambiente bucal.

Durante o período experimental, os participantes puderam higienizar apenas a porção do dispositivo que permaneceu em contato com o palato. Ao término dos 28 dias, as 5 raízes foram removidas dos nichos e realizou-se as coletas de biofilme e raspas de dentina na luz do canal radicular em fluxo laminar no Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral do Departamento de Prótese e Materiais Dentários (DMPD) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP). Neste estudo concluíram o período experimental, o total de 11 participantes.

Coleta do biofilme dental

Na manhã (8:00 às 9:00 h) do 28º dia do início do uso do dispositivo em acrílico, as telas plásticas fixadas sobre as raízes dentais foram removidas no fluxo laminar com auxílio de lâmina de bisturi número 15, e o biofilme formado sobre cada uma das raízes foi cuidadosamente coletados com espátula plástica descartável. Os biofilmes foram transferidos para tubos *eppendorfs* pré-pesados em balança analítica com sensibilidade de 0,01mg e realizou-se nova pesagem. Após a segunda pesagem foram pipetadas 300 µL de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,6) em cada tubo *eppendorfs* e foram armazenadas a - 20º C.

Coleta das raspas de dentina para teste microbiológico

Ainda no interior da câmara de fluxo laminar, as raízes de cada grupo foram fragmentadas nos sulcos pré-delimitados com auxílio de martelo e cinzel em 3 blocos de 2 mm de espessura: cervical, médio e apical.

Cada espécime foi fixado em suporte de alumínio estéril com nichos confeccionado para a fixação e coleta de raspas de dentina na Oficina de Precisão da Universidade de São Paulo (USP-Ribeirão Preto) e realizou-se a remoção sequencial das raspas de dentina da superfície da luz do canal. As raspas de dentina foram removidas aumentando o diâmetro do canal em contra-ângulo (Kavo, Joinvile, SC, Brasil) utilizando-se brocas tronco-cônicas diamantadas estéreis (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) de diâmetro crescente 3080 (Broca 1), 3069 (Broca 2) e 4137 (Broca 3) em baixa rotação. As brocas foram colocadas e retiradas do canal 3 vezes.

As amostras obtidas com cada uma broca e, em cada um terço, foram imediatamente recolhidas e colocadas em eppendorfs pré-pesados. Após a coleta realizou-se nova pesagem e pipetou-se 1000 µL de fluido de transporte reduzido (RTF) (Tabela 2). As amostras foram armazenadas em caixa térmica de isopor com gelo e foram enviadas imediatamente ao Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) para processamento microbiológico e determinação do total de micro-organismos viáveis (meio MM_{10}), *S. mutans* (meio SB_{20}) *e E. faecalis* (meio m-Enterococcus).

Tabela 2 – Composição para 1000 mL de fluido de transporte reduzido (RTF)*, adaptado de Syed & Loesche (1972).*

Componentes	Quantidade (mL)
Solução mineral nº 1	75
Solução mineral nº 2	75
0,1M de EDTA	10
Água destilada	815
8% Na2CO3*	5
1% dithiothreitol*	20

*adicionar após autoclave a 120ºC a 20 minutos em ambiente asséptico. *Preparado com filtro de membrana estéril (tamanho do poro: 0,22 µm).*

3.4 Processamento microbiológico

Processamento das amostras

As amostras de raspas de dentina foram homogeneizadas em aparelho Mixtron (Toptronix, São Paulo, SP, Brasil) por 2 minutos, em velocidade máxima e foram submetidas à diluição decimal seriada (de 10^{-1} a 10^{-3}) utilizando como diluente RTF. Para cada diluição foram utilizadas alíquotas correspondentes a 0,1 mL (100 µL) da amostra inicial em RTF (900 µL por diluição)

Preparo dos meios de cultura

1. MM_{10}

O meio de cultura MM_{10} modificado, para contagem total de micro-organismos viáveis foi preparado como preconizado Syed e Loesche (1972), como ilustrado na Tabela 3. Os componentes foram dissolvidos em água destilada e realizou-se a autoclavagem a 120ºC, durante 20 minutos, sendo a autoclave aberta cuidadosamente, logo em seguida, para evitar a caramelização da sacarose. Após o resfriamento foram adicionadas 8% de Na_2CO_3, 0,05% de menadiona e 1% de

dithiothreitol e o meio foi então, distribuído assepticamente, em placas de Petri de 60 x 15 mm estéreis. Após a solidificação, as placas foram mantidas em refrigerador, a 4º C e utilizadas no período máximo de 7 dias.

Tabela 3 – Composição do meio de cultura MM_{10} modificado.

Componente	Fabricante	Quantidade
Tryptcase	BD BBl Sparks, MD, EUA	1,5 g
Extrato de levedura	Difco, Detroid, MI, EUA	0,375 g
Hemina	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha	0,75 mg
Lactato de sódio (50%)	Synth, Diadema, SP, Brasil	3,6 mL
Formiato de sódio	Merck KGaA, Darmtadt, Alemanha	0,75 g
Nitrato de potássio	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha	0,375 g
Solução mineral nº1	FCFRP-USP	2,85 mL
Solução mineral nº 2	FCFRP-USP	2,85 mL
Glicose	Synth, Diadema, SP, Brasil	0,75 g
Sacarose	Synth, Diadema, SP, Brasil	37,5 g
Ágar	Difco, Detroid, MI, EUA	11,25 g
Água destilada	FCFRP-USP	721,20 Ml
8% de Na_2CO_3*	Synth, Diadema, SP, Brasil	3,75 mL
0,05% de menadiona*	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha	0,75 mL
1% de dithiothreitol*	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha	15 mL

*adicionar após autoclave a 120ºC a 20 minutos em ambiente asséptico.

2. SB_{20}

O meio de cultura SB_{20} para contagem de estreptococcus do grupo mutans foi preparado como preconizado por (DAVEY & ROGERS, 1984), apresenta a composição, conforme a Tabela 4. Os componentes foram previamente pesados em balança de precisão, colocados em balão volumétrico e dissolvidos em água destilada por meio de homogeneização manual. Em seguida realizou-se a vedação dos balões com algodão e envolveu-se a embocadura do balão com papel kraft e realizou-se a autoclavagem a 120ºC, durante 20 minutos, sendo a autoclave aberta cuidadosamente, logo em seguida, para evitar a caramelização da sacarose. Após o resfriamento foram adicionadas 750 µL de solução de Bacitracina e o meio foi então, distribuído assepticamente, em placas de Petri de 60 x 15 mm estéreis. Após a solidificação, as placas foram mantidas em refrigerador, a 4º C e utilizadas no período máximo de 7 dias.

Tabela 4 – Composição do meio de cultura SB_{20} modificado.

Componente	Fabricante	Quantidade
L-cisteína	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha	1,5 g
Sulfito de sódio	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha	0,375 g
Acetato de sódio	Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha	0,75 mg
Extrato de levedura	Difco, Detroid, MI, EUA	3,6 mL
Casitone	Difco, Detroid, MI, EUA	0,75 g
Ágar- Ágar	Difco, Detroid, MI, EUA	0,375 g
Sacarose	Synth, Diadema, SP, Brasil	2,85 mL
Água destilada	FCFRP-USP	2,85 mL
Bacitracina*	FCFRP-USP	750 µL

*adicionar após autoclave a 120ºC a 20 minutos em ambiente asséptico.

3. m-Enterococcus

O meio de cultura m-Enterococcus, para contagem específica de micro-organismos foi preparado como ilustrado na Tabela 5. O componente foi previamente pesado em balança de precisão, colocados em balão volumétrico e dissolvidos em água destilada. Em seguida realizou-se o aquecimento do meio até a fervura e realizou-se a o meio foi então, distribuído assepticamente, em placas de Petri de 60 x 15 mm estéreis. Após a solidificação, as placas foram mantidas em refrigerador, a 4º C e utilizadas no período máximo de 7 dias.

Tabela 5 – Composição do meio de cultura m-Enterococcus modificado.

Componente	Fabricante	Quantidade
Enterococcus Ágar	Difco, Detroid, MI, EUA	31,5 g
Água destilada	FCFRP-USP	750 mL

Semeadura do material

Foram depositadas 0,05 mL (50 µL) de cada diluição no centro das placas de Petri (60 x 10 mm) contendo meio de cultura específicos para os micro-organismos. A semeadura foi feita em duplicata. Os meios de cultura utilizados foram: MM_{10} (SYED & LOESCHE, 1972) para contagem total de micro-organismos viáveis; SB_{20} modificado por Souki (1992), seletivo para estreptococos do grupo mutans e Ágar m-Enterococus ágar (Difco, Detroid, MI, EUA), seletivo para Enterococcus do grupo faecalis. Foi efetuada a distribuição uniforme com bastão angulado em L

previamente esterilizado. Foram realizadas também, semeaduras a partir do material homogeneizado e dispersado, sem ser diluído.

As placas que continham m-Enterococcus foram incubadas em estufa a 37ºC, em aerobiose durante 4 dias. As placas que continham MM_{10} em anaerobiose (Sistema GasPak EZ) e SB_{20} modificado foram incubadas em microaerofilia (chama de vela) por 6 dias.

Após o período de incubação, as colônias de micro-organismos foram contadas, determinando-se as unidades formadoras de colônias (UFC) (Figura 6). A fim de se determinar as UFC/mL, a contagem destas placas foi multiplicada por 20, já que foram plaqueadas 50 µL. A média das 2 placas foi utilizada como o valor final de contagem.

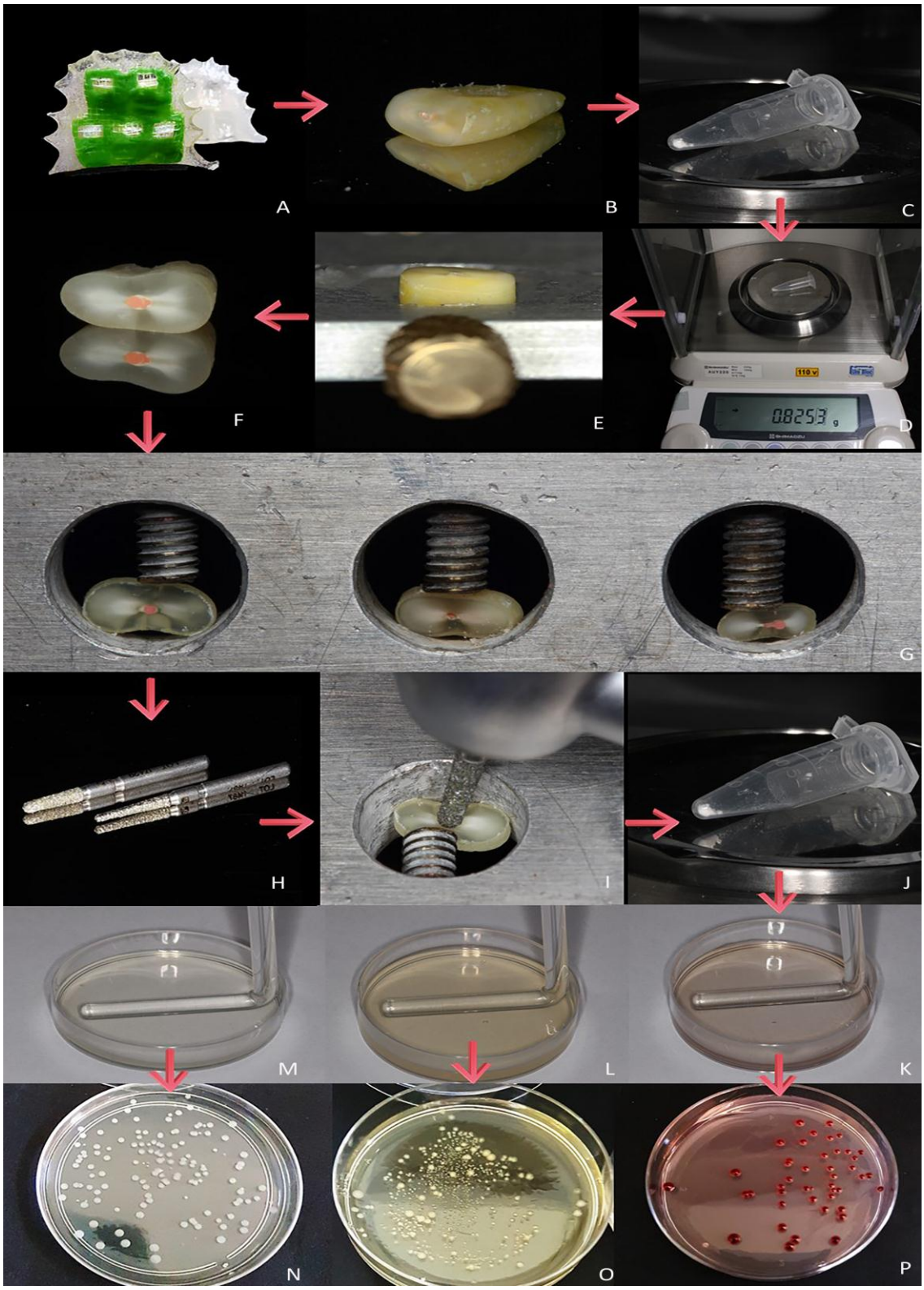

Figura 6 – A) Dispositivo após a fase intraoral; B) Remoção das raízes; C) Coleta de biofilme formado; D) Pesagem do biofilme em eppendorfs pré-pesados; E) Secção em terços radiculares; F) Raízes seccionadas em terços radiculares; G) Fixação para coleta de raspas de dentina (cervical, médio e apical); H) Seleção das brocas para a remoção das raspas de dentina; I) Aumento do diâmetro da luz do canal para coleta de raspas; J) Pesagem das raspas de dentina em eppendorfs pré-pesados; K) Semeadura em meio seletivo para *Enterococcus;* L) Semeadura em meio seletivo para *Streptococcus* (SB_{20}); M)Semeadura para contagem geral de micro-organismos viáveis (MM_{10}); N) Contagem geral de micro-organismos viáveis; O) Contagem específica para estreptococcus do grupo mutans*;* P) Contagem específica para *Enterococcus.*

Contagem das colônias

Decorrido o período de incubação foi efetuada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), com o auxílio de estereomicroscópio (Nikon, Tóquio, Japão). A identificação presuntiva foi realizada observando-se as características morfológicas específicas das colônias:

1. *EGM:* colônias branca-acinzentadadas ou creme-amareladas, superfície granular semelhante a vidro moído, pode apresentar ou não gotícula cintilante de polissacarídeo extracelular no topo. As colônias, algumas vezes mucoides pode também apresentar-se circundadas por halo incolor, visível a olho nu (DAVEY e ROGERS, 1984; SOUKI et al., 1992);
2. *E. faecalis:* células individuais ou arranjadas distribuídas em cadeias curtas ou em pares apresentando comumente morfologia ovoide e coloração rosa-avermelhada (GOMES et al., 2002).

3.4. Análise dos dados

A análise estatística dos dados desse estudo foi realizada por meio do software *Statistical Package for Social Science para Windows* (SPSS 25, SPSS Inc, Chicago, IL, EUA) com nível de significância 5%.

Os dados do teste de difusão em ágar e os referentes à quantificação do biofilme apresentaram distribuição não-normal (teste de Shapiro-Wilk, $p<0,05$), e desta forma, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e 0 pós teste de Dunn para comparações entre grupos em ambas as análises.

Os dados para contagem geral, contagem de *S. mutans* e *E. faecalis* apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk, $p>0,05$) e foram analisados separadamente por Análise de Variância a dois critérios (material temporário x terços radiculares) e teste complementar de Tukey.

Resultados

4.1. Estudo in vitro: teste de difusão em ágar

O teste de difusão em ágar mostrou que os materiais restauradores temporários apresentam atividade antimicrobiana distinta sobre os micro-organismos avaliados *S. mutans* (ATCC 25175)*, E. faecalis* (ATCC 4083), *E. faecalis* (cepa clínica isolada de participante da pesquisa), *e C. albicans* (ATCC 1023*)* (Tabela 6)*.*

Para os micro-organismos *S. mutans* e *E. faecalis* ATTC os maiores diâmetros dos halos de inibição foram verificados nas placas de Petri com discos de CHX (controle positivo) (p=0,000). Os menores halos de inibição foram encontrados nos discos de CIV foto, CIV AR, OZ e OZE, estatisticamente semelhantes entre si (p>0,05).

A zona de inibição para o *E. faecalis* do paciente, mostrou que o maior diâmetro do halo de inibição foi observado nas placas com OZE (p=0,000). Os discos de CIV foto, CIV AV e OZ apresentaram menor halo de inibição, semelhantes entre si (p>0,05). A CHX mostrou resultado intermediário.

Com relação a *C. albicans,* os discos com OZE apresentaram resultados similares ao discos com CHX (p>0,05). Os menores valores de zona de inibição foram encontrados nas placas CIV foto, CIV AV e OZ, sem diferença significante entre si (p>0,05).

A figura 7 apresenta os materiais restauradores temporários e os halos de inibição formados após 30 dias de incubação em estufa bacteriológica.

Tabela 6 – Valores de média e desvio-padrão (mm) do diâmetro dos halos de inibição dos materiais restauradores temporários, pela técnica de difusão em ágar (n=8).

	Clorexidina 0,12% controle (Colgate)	**CIV fotoativado (Riva/SDI)**	**CIV de alta viscosidade (Ketac Molar/3M Espe)**	**Óxido de zinco sem eugenol (Coltosol/ Coltene)**	**Óxido de zinco e eugenol (IRM/Dentsply)**	***P(sig.)***
S. mutans (ATCC 25175)	19,98 ± 5,88 **a***	1,86 ± 0,34 **b***	1,70 ± 0,25 **b***	2,07 ± 0,23 **b***	2,11 ± 0,22 **b***	p=0,000
E. faecalis (ATCC 4083)	13,23± 2,96 **a***	2,34 ± 0,38 **b***	2,07 ± 0,24 **b***	2,35 ± 0,35 **b***	2,22 ± 0,34 **b***	p=0,000
E. faecalis (paciente)	15,15 ± 4,34 **b***	2,18 ± 0,38 **c***	2,75 ± 0,40 **c***	2,62 ± 0,26 **c***	22,28 ± 0,91 **a***	p=0,000
C. albicans (ATCC 1023)	16,79 ± 3,05 **a***	2,42 ± 0,27 **b***	3,11 ±0,35 **b***	2,86 ± 0,18 **b***	19,79 ± 4,06 **a***	p=0,000
Média ± dp	**15,46 ± 5,76**	**2,21 ± 0,40**	**2,42 ± 0,63**	**2,49 ± 0,39**	**8,99 ± 0,39**	

*Letras iguais nas linhas representam valores estatisticamente semelhantes (p<0,05).

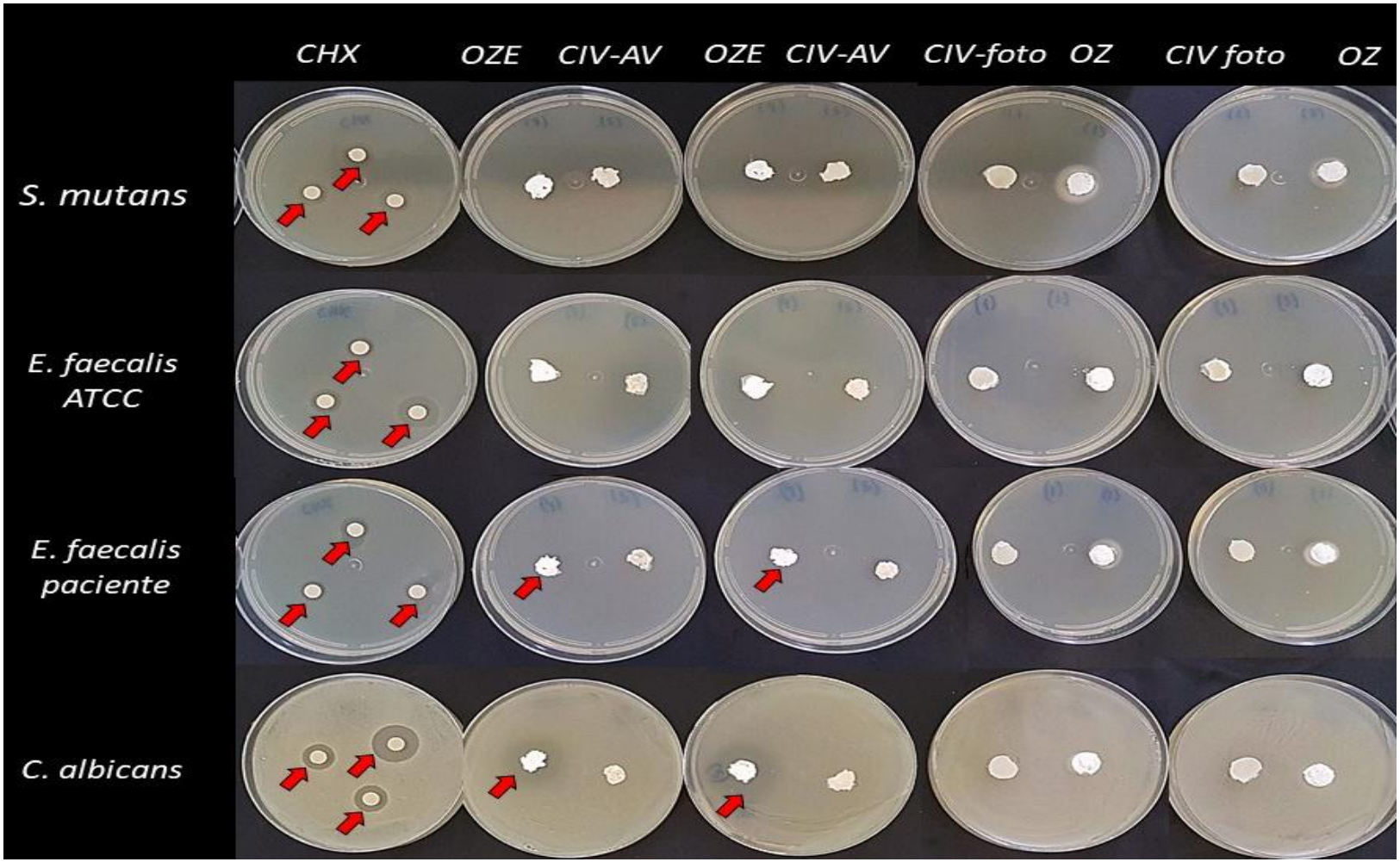

Figura 7 – Imagens da Placas de Petri após 30 dias de incubação dos micro-organismos. Setas vermelhas indicam zonas de inibição de micro-organismos.

4.2. Quantificação do biofilme formado sobre as raízes após desafio ácido

O teste não-paramétricos de Kruskal-Wallis aplicado aos valores de biofilme, mostrou haver diferença estatisticamente significante entre os materiais restauradores temporários (p=0,002). Não houve diferença para o acúmulo de biofilme sobre as raízes (p=0,342) e para a interação dos fatores (0,020).

O menor acúmulo de biofilme foi verificado nas raízes seladas com CIV foto (16mg a) e CIV AV (16mg a) (p<0,05), e ambos não difeririam estatisticamente do OZE (48mg ab) e OZ (41mg ab). As raízes sem material temporário apresentaram maior acúmulo de biofilme (90mg b) (p<0,05), também sem diferença do OZE e OZ.

A tabela 7 contém a quantidade de biofilme na superfície dos espécimes após o desafio ácido *in situ,* nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 7 – Valores originais e medianas do acúmulo de biofilme (mg) encontrado sobre as raízes dentais após a exposição em meio bucal, considerando-se os diferentes materiais restauradores temporários testados.

Partic.	**Sem material restaurador (controle)**	**CIV fotoativado (Riva Light Cure/SDI)**	**CIV de alta viscosidade (Ketac Molar/ 3M ESPE**	**Óxido de zinco sem eugenol (Coltosol/Coltene)**	**Óxido de zinco e eugenol (IRM/Dentsply)**
1	208,0	11,0	16,0	73,0	14,0
2	64,0	24,0	19,0	41,0	48,0
3	90,0	39,0	22,0	58,0	40,0
4	203,0	121,0	219,0	120,0	226,0
5	75,0	5,0	9,0	33,0	42,0
6	32,0	16,0	8,0	35,0	48,0
7	35,0	12,0	8,0	124,0	58,0
8	105,0	5,0	16,0	4,0	19,0
9	29,0	50,0	26,0	54,0	49,0
10	120,0	12,0	12,0	9,0	23,0
11	211,0	45,0	15,0	19,0	280,0
Mediana	**90,0 b**	**16,0 a**	**16,0 a**	**41,0 ab**	**48,0 ab**

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significante (Teste de Dunn, p<0,05).

4.3. Eficiência da restauração temporária e micro-organismos presentes nos canais radiculares

4.3.1 Contagem total dos micro-organismos viáveis (meio MM_{10})

A Análise de Variância a dois critérios (*materiais restauradores temporários x terço radicular*) demonstrou que houve diferença significante entre os terços radiculares (cervical, médio e apical) (p=0,000). Não houve diferença significante para o material restaurador temporário (p=0,472) bem como, para a interação destes fatores (p=0,586).

O teste complementar de Tukey mostrou o terço cervical com maior quantidade de micro-organismos viáveis (p<0,05), estatisticamente semelhante (p>0,05) ao terço médio. A menor quantidade de micro-organismo viáveis foi encontrada no terço apical (Tabela 8). A figura 8 mostra a diminuição dos micro-organismos nos terços cervical, médio e apical.

Tabela 8 – Valores de média e desvio padrão em (log10-UFC/mL) da contagem geral de micro-organismos, considerando-se os diferentes terços radiculares.

Terços radiculares	Médias ± Desvio padrão
Cervical	(2,44 ± 0,65) **b**
Médio	(2,11 ± 0,71) **b**
Apical	(1,52 ± 1,16) **a**

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significante (Teste de Tukey, p <0,05).

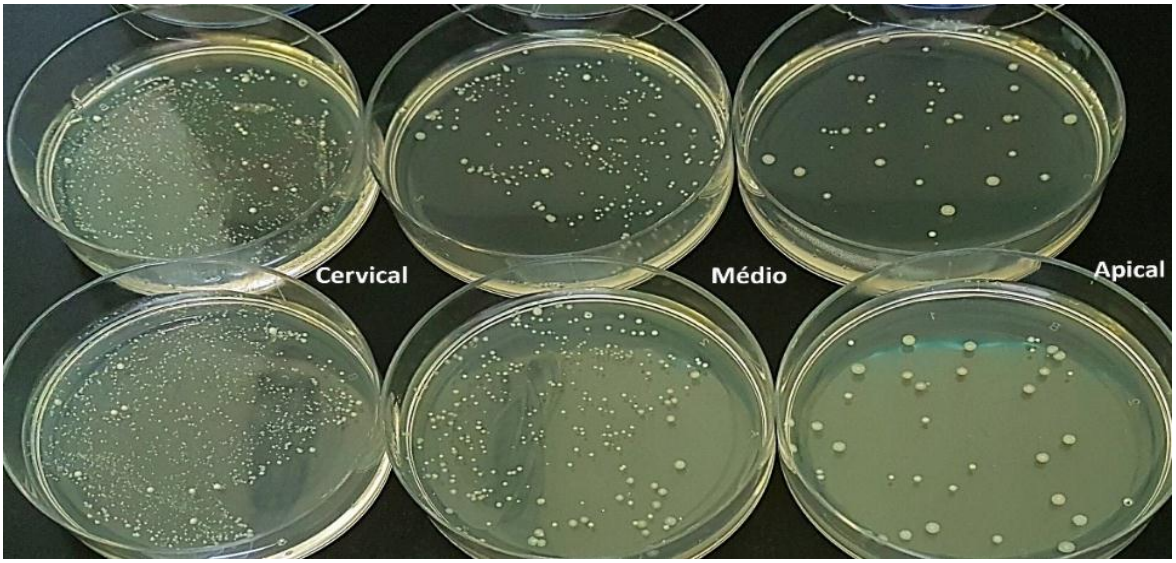

Figura 8 – Contagem geral, em meio $MM_{10,}$ de micro-organismos presentes nos terços cervical, médio e apical das raízes submetidas ao desafio ácido *in situ*.

4.3.2. Contagem de EGM (meio SB_{20})

A Análise de Variância a dois critérios (*materiais restauradores temporários x terços radiculares)* demonstrou haver diferença estatisticamente significante para o material restaurador temporário (p=0,021) e terços radiculares (p=0,012). Não houve diferença para a interação dos fatores (p=0,079).

O teste de Tukey mostrou que os espécimes restaurados com OZE apresentaram os menores valores de micro-organismos viáveis (p<0,05), estatisticamente similares ao CIV foto e o CIV AV (p>0,05). O OZ e as raízes sem material restaurador apresentaram a maior quantidade de biofilme (p<0,05) e não diferiram estatisticamente dos CIVs (Tabela 9).

Tabela 9 – Valores de média e desvio padrão da contagem de *S. mutans* em (log10-UFC/mL), considerando-se os diferentes materiais restauradores temporários.

Material	Médias ± Desvio padrão
Sem material restaurador (Controle)	(1,86 ± 1,11) **b**
CIV foto - CIV fotoativado (Riva Light Cure/SDI)	(1,65 ± 0,93) **ab**
CIV AV - CIV de alta viscosidade (Ketac Molar/3M Espe)	(1,53 ± 0,85) a**b**
OZ - Óxido de zinco sem eugenol (Coltosol/ Coltene)	(1,78 ± 0,92) **b**
OZE - Óxido de zinco e eugenol (IRM/Dentsply)	(1,06 ± 1,06) **a**

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significante (Teste de Tukey, p <0,05).

Na contagem de *S. mutans*, os micro-organismos diminuíram de cervical para apical (Tabela 10).

Tabela 10 – Valores de média e desvio padrão em mg/mL da contagem de *S. mutans* em (log10-UFC/mL) considerando-se os diferentes terços radiculares.

Terço radicular	Médias ± Desvio padrão
Cervical	(1,92 ± 1,01) **b**
Médio	(1,64 ± 0,97) **ab**
Apical	(1,28 ± 0,93) **a**

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significante (Teste de Tukey, p <0,05).

Na figura 9 tem-se a representação do comportamento dos materiais restauradores temporários no meio SB_{20}.

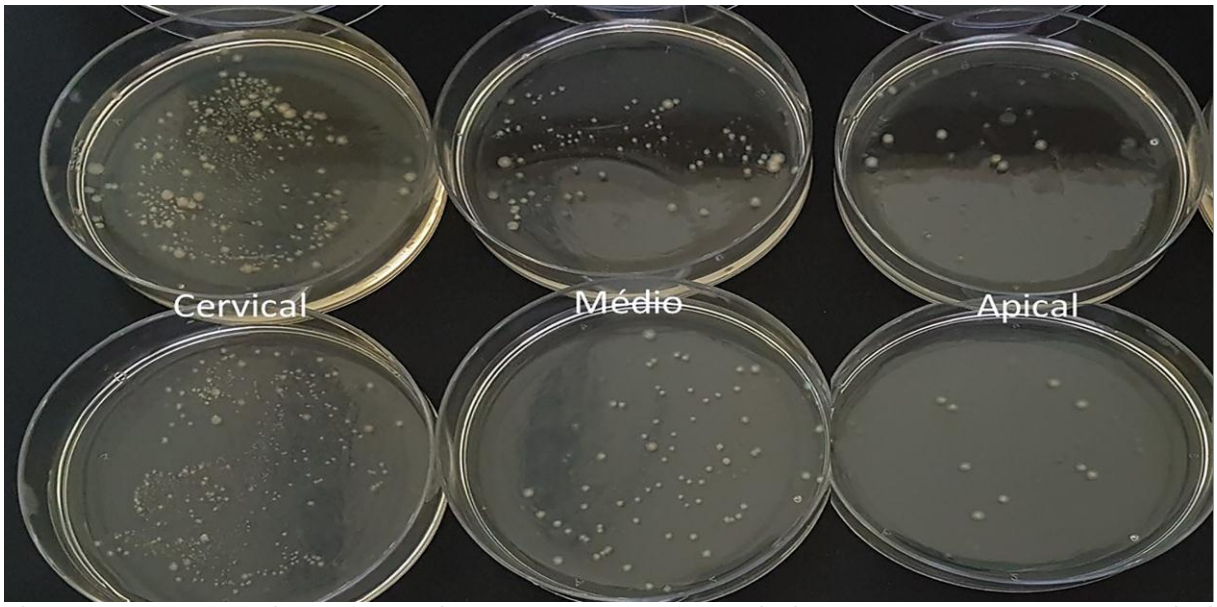

Figura 9 – Notar a maior presença de *S. mutans* no terço cervical e menor presença no terço apical no meio SB_{20}.

4.3.3 Contagem de E. faecalis

A Análise de Variância a dois critérios demonstrou haver diferença significante para o fator *material restaurador temporário* (p=0,003) e os *terços radiculares* (p=0,000)

A menor presença de *E. faecalis* foi encontrada no OZE (p<0,05) estatisticamente similar ao CIV foto, CIV AV e OZ, que foram similares entre si (p>0,05). As raízes sem material restaurador temporário apresentaram maior acúmulo de micro-organismo (p<0,05), sem diferença significante do CIV foto, CIV AV e OZ (p>0,05) (Tabela 11).

Tabela 11 – Valores de média e desvio-padrão em mg/mL da contagem de *E. faecalis* em (log10-UFC/mL) considerando os diferentes materiais restauradores temporários.

Material	Médias ± Desvio padrão
Sem material restaurador (Controle)	1,72 ± 1,21 **b**
CIV foto - CIV fotoativado (Riva Light Cure/SDI)	1,29 ± 1,11 **ab**
CIV AV - CIV de alta viscosidade (Ketac Molar/3M Espe)	1,27± 1,06 **ab**
OZ - Óxido de zinco sem eugenol (Coltosol/ Coltene)	1,00 ± 1,13 **ab**
OZE - Óxido de zinco e eugenol (IRM/Dentsply)	0,75 ± 0,70 **a**

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significante (Teste de Tukey, p <0,05).

O menor acúmulo de *E. faecalis* foi verificado no terço apical e médio (p<0,05), diferentes do terço cervical (Tabela 12).

Tabela 12 – Valores de média e desvio padrão em mg/mL da contagem de *E. faecalis* em (log10-UFC/mL), considerando-se os diferentes terços radiculares.

Terço radicular	Médias ± Desvio padrão
Cervical	(1,55 ± 1,30) **b**
Médio	(1,29 ± 1,24) **a**
Apical	(0,78 ± 0,92) **a**

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significante (Teste de Tukey, p <0,05).

A figura 10 apresenta a diminuição da contagem do E. faecalis nos diferentes terços radiculares.

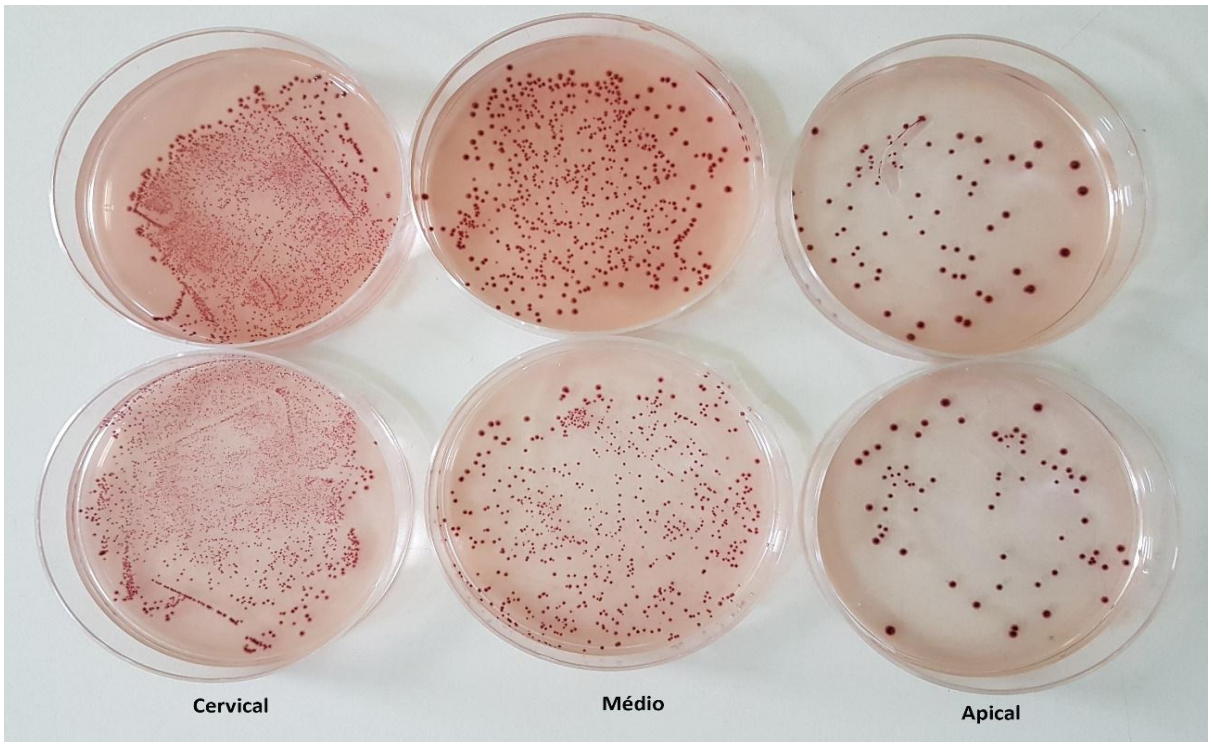

Figura 10 – Imagens das Placas de Petri com incubação *Enterococcus faecalis.* Notar a redução de micro-organismos nos terços radiculares (de cervical para apical).

Discussão

Os materiais restauradores temporários têm a função de melhorar a função dental, impedir a progressão da lesão cariosa e evitar a reinfecção dos canais radiculares (NASERI et al., 2012; MARKOSE et al., 2016; DEVIKA et al., 2016). A ação antimicrobiana dos materiais restauradores temporários é importante, pois reduz as bactérias residuais nos canais e, consequentemente, evita a formação de lesão periapical resistente (MONALEMZADEH et al., 2017; PERALTA et al., 2018).

A atividade antibacteriana dos materiais restauradores temporários pode ser avaliada por diversos métodos e o teste de difusão em ágar é considerado o teste padrão (HAJIFATTAHI et al., 2016; PERALTA et al., 2018). Esse teste é um método físico em que o micro-organismo é desafiado contra substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona a zona de inibição com a capacidade antimicrobiana do material testado (HEYDER et al., 2013; HAJIFATTAHI et al., 2016).

Para o teste de difusão em ágar, os resultados deste este estudo mostraram que independente do micro-organismo avaliado, a maior zona de inibição foi encontrada para os discos embebidos com clorexidina (controle) e nos discos de OZE, e as menores zonas de inibição foram encontradas para CIV foto, CIV AV e OZ.

Os bons resultados do cimento de óxido de zinco e eugenol pode ser explicado pela capacidade de hidrólise e difusão do eugenol, reconhecido em Endodontia por possuir efetiva atividade antimicrobiana e ainda pode justificar a eliminação tardia do *E. faecalis* (MUSHACHE et al., 2015; TENNERT et al., 2016; PERALTA et a., 2018). Esse material restaurador temporário é amplamente utilizado na prática clínica, devido a facilidade de manuseio, inserção na cavidade bucal e ao adequado selamento das cavidades (LAI et al., 2007; KOAGEL et al., 2008).

No entanto, O OZE não de adere a estrutura dental e apresenta risco crescente de fratura dentária devido à expansão tardia desse material (BELLO et al., 2014; TENNERT et al., 2016). Os resíduos de eugenol podem interferir na polimerização de materiais resinosos, além de alterar a cor da estrutura coronária (KOCH et al., 2013). Estudos demonstram resposta inflamatória significativa aos tecidos, instabilidade dimensional a variações térmicas (KOCH et al., 2013; MUSTACHE et al., 2015; TENNERT et al., 2016).

A baixa atividade antimicrobiana dos cimentos de ionômero de vidro, após 30 dias, condiz com resultados encontrados na literatura, que afirmam que a liberação

contínua de flúor tem diminuição progressiva e gradual após a primeira semana de exposição do material ao *S. mutans* (FÚCIO et al., 2016). Outro material que apresentou baixa atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos foi o OZ (óxido de zinco sem eugenol). O OZ encontrado comercialmente (Coltosol) apresenta facilidade de aplicação e remoção do material restaurador (TENNERT et al., 2016). Porém possui como desvantagem, desprender facilmente da cavidade, baixa ação antimicrobiana, a expansão tardia do material o que pode levar a ocorrência de trincas e fraturas do remanescente dental (TENNERT et al., 2016; MUSHASHE et al., 2015).

A exposição do tratamento endodôntico ao ambiente bucal, devido à falha do material restaurador temporário pode levar o contato com agentes químicos, físicos e biológicos da cavidade oral e, consequentemente, causar a recontaminação do material obturador por bactérias e ocasionar o insucesso do tratamento endodôntico (GILLEN et al., 2011; DU et al., 2015; SILVA-NETO et al., 2018). Nesta situação clínica pode ser necessária, a realização do retratamento endodôntico, o que pode causar maior desgaste do remanescente dental e perda de estrutura de tecido dentinário (BALTO et al., 2011; DE-DEUS et al., 2018).

Nenhum estudo prévio avaliou a eficiência da restauração temporária em dentes tratados endodonticamente frente ao desafio ácido *in situ* usando dispositivo acrílico intraoral. Os estudos *in situ* podem reproduzir a condição clínica, ao expor diretamente no ambiente bucal, os materiais usados no tratamento endodôntico (VIRTEJ et al., 2006; XUEREB et al., 2015; SILVA-NETO et al., 2018).

Os estudos *in situ* podem ser conduzidos com um pequeno número de participantes e ser realizado em curto intervalo de tempo (CHIMELLO et al., 2008; SOUZA-GABRIEL et al., 2015; SILVA-NETO et al., 2018). No presente estudo, algumas limitações foram identificadas como a seleção de participantes, dificuldade em utilizar o dispositivo no período de 28 dias, relatos de desconforto do uso do dispositivo acrílico intraoral. Para minimizar estas dificuldades foram realizados os ajustes oclusais necessários nos dispositivos (SOUZA-GABRIEL et al., 2015; HASS et al., 2016; SILVA-NETO et al., 2018).

Incisivos inferiores humanos foram selecionados por apresentarem pequena espessura o que possibilitou a inclusão no dispositivo intraoral de forma confortável aos participantes (SILVA-NETO et al., 2018). A solução de sacarose gotejada foi usada sobre as raízes, simulou alto risco cárie e objetivou reproduzir a frequente

variação de pH durante o dia, o que produziu a formação de ácidos orgânicos produzidos pela fermentação da sacarose (LI et al., 2014; ALI & TAHMASSEBI, 2014; SILVA-NETO et al., 2018).

Diante da necessidade do controle e validação do método empregado foi incluída as raízes dentais preparadas biomecanicamente, esterilizadas, obturadas e não restauradas (controle negativo) (SAHA et al., 2010; SIGNORETTI et al., 2013). Nestas raízes, também foram realizadas as análises microbiológicas para validação dos resultados encontrados nos materiais restauradores temporários experimentais.

Os materiais restauradores temporários selecionados para este estudo já foram avaliados em estudos laboratoriais de biocompatibilidade (PORENCZUK et al., 2019), citotoxicidade (PERALTA et al., 2018; PORENCZUK et al., 2019), atividade antimicrobiana (HEYDER et al., 2013; MONAJEMZADEH et al., 2017; DEBNATH et al., 2017) e capacidade de vedação (NASERI et al., 2012; MARKOSE et al., 2016).

No delineamento experimental, foi empregado o gotejamento de solução de sacarose a 20% para simular dieta cariogênica e estimular a formação de ácidos orgânicos provenientes da fermentação bacteriana (ácido lático, acético, propiônico, succínico e fórmico) que também são metabolizados para formar polissacarídeos extracelulares e intracelulares, a partir do biofilme bacteriano (LI et al., 2014; SOUZA-GABRIEL et al., 2015). O uso de telas sobre as raízes permitiu o acúmulo de biofilme originado pelo metabolismo bacteriano e evitou o deslocamento do biofilme formado sobre as raízes para posterior análises (CHIMELLO et al., 2008; SOUZA-GABRIEL et al., 2015; SILVA-NETO et al., 2018).

A coleta microbiológica foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, após o 28º dia da fase intraoral, foi realizada a coleta do biofilme formado sobre as raízes e realização imediata de análise do peso do biofilme. Optou-se por realizar a coleta após 28 dias por ter sido realizado estudo piloto que comparou os micro-organismos viáveis com diferentes intervalos de tempo (t0, t7, t14, t21 e t28 dias) e observou-se que a presença de *E. faecalis* é viável aproximadamente com 28 dias de exposição da dentina ao ambiente bucal. Na segunda etapa, as raspas de dentina foram coletadas nos terços cervical, médio e apical, conforme metodologia consolidada na literatura (BERBER et al., 2006). Com relação a análise da microbiota presente no biofilme e nas raspas de dentina, optou-se por metodologia aplicada em diversos trabalhos na literatura considerada segura e eficaz com resultados satisfatórios (BERBER et al., 2006; SAHA et al., 2010; SIGNORETTI et al., 2013).

O processamento das amostras foi realizado por meio do método de estimativa de Unidades Formadoras de Colônias (log 10-UFC/mL) por ser técnica mais consolidada em Microbiologia quando se pretende quantificar ou isolar diferentes grupos de micro-organismos, como os *E. faecalis*, uma das principais bactérias causadoras da infecção endodôntica (BARTHEL et al., 2002; VIRTEJ et al., 2006; BERBER et al., 2006; SHARMA et al., 2014).

O biofilme bacteriano é composto de microbiota complexa e diversificada, com centenas de diferentes espécies de micro-organismos e que exibem maior resistência a agentes antimicrobianos (KRETH et al., 2008; LI et al., 2014). No ambiente bucal, o biofilme maduro ou estabelecido pode se acumular em superfícies interproximais, sulcos e fissuras, além de se formar novos microambientes, a partir de falhas marginais na interface dente-restauração, contribuindo para a sensibilidade pós-operatória, cárie recorrente, inflamação e necrose pulpar (LI et al., 2014; FÚCIO et al., 2016).

A fermentação dos carboidratos provenientes da dieta alimentar é metabolizada pelos micro-organismos presentes no biofilme, que geram ácidos que degradam o tecido mineral e matriz colágena da dentina, além de solubilizarem a interface adesiva (BANTING et al., 2001; LI et al., 2014). Além disto, a saliva contém uma variedade de enzimas que podem ter contribuído para a diminuição da eficiência dos materiais restauradores temporários (ROTH et al., 2012). Diante disto, optou-se pela realização da medição do peso do biofilme formado nas raízes, afim de se identificar qual material restaurador temporário estudado apresenta maior poder antimicrobiano.

No presente estudo, os resultados do peso do biofilme evidenciaram diferença de atividade antimicrobiana dos materiais restauradores temporários. Verificou-se que o CIV, seja o de alta viscosidade ou o fotoativado, apresentam maior capacidade de inibir a formação de biofilme em relação aos demais materiais estudados.

Os CIVs apresentam liberação de flúor que pode ter inibido o acúmulo de biofilme e a penetração de micro-organismos e consequentemente, evitar a formação de lesões de cárie nas margens das restaurações (TAMILSELVAM et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2019). No entanto, os materiais contendo CIV são sensíveis à técnica e o controle de umidade é obrigatório (TAMILSELVAM et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2019). Neste contexto, o CIV fotoativado (Riva Light

Cure) pode ser benéfico pois diminui o contato da água na colocação ou no ajuste resulta na dissolução do material devido a presa rápida do material (DE OLIVEIRA et a., 2019).

O cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade (Ketac Molar Easymix) é uma versão melhorada de CIV, apresenta biocompatibilidade e alta viscosidade estabelecida com um aumento de potência-líquido com uma taxa de 25% em comparação com o CIV comumente utilizado (TAMILSELVAM et al., 2013; FÚCIO et al., 2016). Partículas vítreas foram inseridas na composição convencional do CIV para aumentar a resistência mecânica, o que proporciona melhor absorção de forças e dissipações de tensões e minimiza a microinfiltração na interface dente / restauração (BEIRUTI et al., 2006; TAMILSELVAM et al., 2013). A alta viscosidade possibilita diminuir o tempo de manipulação, pois possibilita maior molhabilidade do pó pelo componente líquido, apresenta fácil inserção na cavidade dentária, maior resistência à abrasão e resistência satisfatória aos esforços de mastigação (TAMILSELVAM et al., 2013). Um relato clínico de 5 anos verificou o desenvolvimento de lesão de baixa cárie em dentes selados com CIV de alta viscosidade (BEIRUTI et al., 2006).

Os resultados deste estudo, demonstraram que a presença de micro-organismos no interior dos canais radiculares, independentemente da contagem de micro-organismos, apresentou maior acúmulo de bactérias no terço cervical e menor quantidade de bactérias no terço apical. Estes resultados estão condizentes com estudos que mostram que a penetração de micro-organismos pode demorar até aproximadamente 70 dias para migrar do terço cervical para a porção apical (TORABINEJAD et al.,1990; NASERI et al., 2012). A contaminação de micro-organismos neste estudo, pode estar relacionada a infiltração bacteriana por meio da cera utilizada para a proteção das raízes que não dissolveu em volta das raízes. Além disto, esses micro-organismos tornam-se agentes etiológicos das periodontites apicais e podem comprometer o sucesso do tratamento endodôntico.

De modo geral, diante os micro-organismos *S. mutans* e *E. faecalis,* os materiais temporários OZE, CIV fotoativado e CIV de alta viscosidade apresentaram resultados similares entre si. O mecanismo antibacteriano do óxido de zinco envolve a interação direta das partículas com a superfície celular bacteriana, afetando a permeabilidade da membrana celular; então, essas micropartículas adentram a célula, induzindo oxidação, o que resulta na inibição do crescimento bacteriano e até

a morte celular (SABIR et al., 2014; PERALTA et al., 2018). Esse mecanismo está associado a um certo grau de citotoxicidade aos tecidos adjacentes (PERALTA et al., 2018).

Com relação ao efeito antimicrobiano dos CIVs, sabe-se que em ambiente bucal ácido, esse material libera íons de cálcio de vidro com ação tamponante à saliva. Os íons vítreos geram microporos na superfície do material temporário e, na sequência, há a liberação de fluoretos ao meio bucal (DE SOUSA-LIMA et al., 2019). A liberação dos fluoretos apresenta maior reatividade quando o CIV é exposto ao ambiente bucal (DEBNATH et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2019). Os íons de fluoreto liberados pelos CIVs aderem-se à superfície bacteriana e atuam como bactericida, especialmente nas células do *S. mutans* (FÚCIO et al., 2016).

De modo geral, nenhum dos materiais restauradores testados foi capaz de impedir a infiltração de micro-organismos na superfície das restaurações e a penetração no interior dos canais radiculares, após a exposição direta ao ambiente ácido do meio bucal. Além disto, a infiltração de micro-organismos pode estar relacionada a baixa adesão do material restaurador temporário ao remanescente dental (cemento/ esmalte). É importante ressaltar que comparações mais apropriadas não puderam ser realizadas em virtude do limitado número de trabalhos *in situ* em Endodontia.

O modelo experimental deste estudo permite que sejam realizadas novas investigações que correlacionem às demais características dos materiais restauradores temporários, a fim de evitar a recontaminação dos canais e necessidade de intervenção endodôntica. Há ainda a necessidade de análises microbiológicas mais específicas para determinar o comportamento de cada material a cada micro-organismo.

Conclusões

Diante da metodologia empregada e com base nos resultados obtidos neste estudo foi possível concluir que:

1) O cimento de óxido de zinco e eugenol apresentou zona de inibição de micro-organismos similar ao da clorexidina;
2) O cimento de ionômero de vidro (CIV) fotoativado e o CIV de alta viscosidade apresentam a capacidade de inibir o acúmulo de biofilme sobre as raízes dentais.
3) As restaurações temporárias com óxido de zinco e eugenol, CIV fotoativado e o CIV de alta viscosidade reduziram o crescimento de micro-organismos no interior dos canais quando expostos ao desafio ácido em meio bucal.

Referências bibliográficas

ALI, H.; TAHMASSEBI, J.F. The effects of smoothies on enamel erosion: an *in situ* study. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v.24, n.3, p.184-191, 2014.

ALIREZAEI, M.; BAGHERIAN, A.; SARRAF-SHIRAZI, A. Glass ionomer cements as fissure sealing materials: yes or no?: A systematic review and meta-analysis. **The Journal of the American Dental Association**, v.149, n.7, p.640-649, 2018.

AL-KHASAWNAH, Q.; HASSAN, F.; MALHAN, D.; ENGELHARDT, M.; DAGHMA, D.E.S.; OBIDAT, D.; LIPS, K.S.; EL KHASSAWNA, T.; HEISS, C. Nonsurgical Clinical Management of Periapical Lesions Using Calcium Hydroxide-Iodoform-Silicon-Oil Paste. **BioMed Research International**, v.12, n.8198795, 2018.

aASNAASHARI, M.; EBAD, L.T.; SHOJAEIAN, S. Comparison of Antibacterial Effects of 810 and 980- nanometer Diode Lasers on *Enterococcus Faecalis* in the Root Canal System -An in vitro study. **Laser Therapy**, v.25, p.209-214, 2016.

bASNAASHARI, M.; GODINY, M.; AZARI-MARHABI, S.; TABATABAEI, F.S.; BARATI, M. Comparison of the Antibacterial Effect of 810 nm Diode Laser and Photodynamic Therapy in Reducing the Microbial Flora of Root Canal in Endodontic Retreatment in Patients With Periradicular Lesions. **Lasers in Medical Science**, v.7, p.99-104, 2016.

BAKHSH, T.A.; SADR, A.; MANDURAH, M.M.; SHIMADA, Y.; ZAKARIA, O.; TAGAMI, J. *In situ* characterization of resin-dentin interfaces using conventional vs. cryofocused ion-beam milling. **Dental Materials**, v.31, n.7, p.833-844, 2015.

BALTO, K. Root-filled teeth with adequate restorations and root canal treatment have better treatment outcomes. **Journal of Evidence-Based Dental Practice**, v.12, n.3, p:72-73, 2011.

BANTING, D.W. The diagnosis of root caries. **Journal of Dental Education**, v.65, n.10, p.991-996, 2001.

BARATIERI, C.; MATTOS, C.T.; ALVES-JÚNIOR, M.; LAU, T.C.; NOJIMA, L.I.; DE-SOUZA, M.M.; ARAUJO, M.T.; NOJIMA, M.D.A. *In situ* evaluation of orthodontic elastomeric chains. **Brazilian Dental Journal**, v.23, n.4, p.394-398, 2012.

BARTHEL, C.R.; ZIMMER, S.; ZILLIGES, S.; SCHILLER, R.; GÖBEL, U.B.; ROULET, J.F. *In situ* antimicrobial effectiveness of chlorhexidine and calcium hydroxide: gel and paste versus gutta-percha points. **Journal of Endodontics**, v.28, n.6, p.427-430, 2002.

BEIRUTI, N.; FRENCKEN, J.E.; VAN 'T HOF, M.A., VAN PALENSTEIN HELDERMAN, W.H. Caries-preventive effect of resin-based and glass ionomer sealants over time: a systematic review. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v.34, n.6, p.403-409, 2006.

BELLO, Y.D.; BARBIZAM, J.V, ROSA V. Structural reinforcement and sealing ability of temporary fillings in premolar with class II mod cavities. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v.1, n.15, p.66-70, 2014.

BERBER, V.B.; GOMES, B.P.; SENA, N.T.; VIANNA, M.E.; FERRAZ, C.C.; ZAIA, A.A.; SOUZA-FILHO, F.J. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. **International Endodontic Journal**, v.39, n.1, p.10-17, 2006.

BURKE, F.J. Dental materials--what goes where? The current status of glass ionomer as a material for loadbearing restorations in posterior teeth. **Dental Update Publication**, v.40, n.10, p.840-844, 2013.

CASELLATTO, C.; WANDERLEY, M.T.; MARQUEZAN, M.; RAGGIO, D.P.; RODRIGUES, C.R.D. Effect of decontamination methods on the bond strength to dentin of primary teeth. **RPG. Revista de Pós-Graduação**, v.13, n.4, p.307-311. 2006.

CHANG, S.W.; LEE, Y.K.; ZHU, Q.; SHON, W.J.; LEE, W.C.; KUM, K.Y.; BAEK, S.H.; LEE, I.B.; LIM, B.S.; BAE, K.S. Comparison of the rheological properties of four root canal sealers. **International Journal of Oral Science**, v.23, n.1, p.56-61, 2015.

CHEETHAM, J.J.; PALAMARA, J.E.; TYAS, M.J.; BURROW, M.F. Evaluation of the interfacial work of fracture of glass-ionomer cements bonded to dentin. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v.29, p.427-437, 2014.

CHIMELLO, D.T.; SERRA, M.C.; RODRIGUES-JÚNIOR, A.L.; PÉCORA, J.D.; CORONA, S.A. Influence of cavity preparation with Er:YAG Laser on enamel adjacent to restorations submitted to cariogenic challenge *in situ*: a polarized light microscopic analysis. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.40, n.9, p.634-643, 2008.

CUNHA, C.T.M.C.; MIRANDA, B.F.S.; MORAIS, J.F.; DAMETTO, F.R.; NETO, A.F.; CHAVES, L.V.F.C. *In vitro*: Evaluation of Coronal Microleakage of Some Temporary Sealing Materials Used in Endodontic and Three Different Endodontic Sealers. **JSM Dentistry,** v.2, n.3, p.1031, 2014.

DE OLIVEIRA, B.M.B.; AGOSTINI, I.E.; BAESSO, M.L.; MENEZES-SILVA, R.; BORGES, A.F.S.; NAVARRO, M.F.L.; NICHOLSON, J.W.; SIDHU, S.K.; PASCOTTO, R.C. Influence of external energy sources on the dynamic setting process of glass-ionomer cements. **Dental Materials**, v.35, n.3, p.450-456, 2019.

DE SOUSA-LIMA, R.X.; DE LIMA, J.F.M.; SILVA DE AZEVEDO, L.J.; DE FREITAS CHAVES, L.V.; ALONSO, R.C.B.; BORGES, B.C.D. Surface morphological and physical characterizations of glass ionomer cements after sterilization processes. **Microscopy Research and Technique**, v.35, n.3, p.450-456, 2019.

DEBNATH, A.; KESAVAPPA, S.B.; SINGH, G.P.; ESHWAR, S.; JAIN, V.; SWAMY, M.; SHETTY, P. Comparative Evaluation of Antibacterial and Adhesive Properties of Chitosan Modified Glass Ionomer Cement and Conventional Glass Ionomer Cement: an *In vitro* Study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.11, n.3, p.75-78, 2017.

DE-DEUS G, CAVALCANTE DM, BELLADONNA FG, CARVALHAL J, SOUZA EM, LOPES RT, VERSIANI MA, SILVA EJNL, DUMMER PMH. Root dentinal

microcracks: a post-extraction experimental phenomenon? **International Endodontic Journal**, v.14, 2018 *In press*

DEVIKA, W.E.; JAYALAKSHMI, D. A review on temporary restorative materials. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research,** v.7, n.7, p.315-319, 2016.

DIAS, A.G.A.; MAGNO, M.B.; DELBEM, A.C.B.; CUNHA, R.F.; MAIA, L.C.; PESSAN, J.P. Clinical performance of glass ionomer cement and composite resin in Class II restorations in primary teeth: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Dentistry**, v.73, p.1-13, 2018.

DU, T.; WANG, Z.; SHEN, Y.; MA, J.; CAO, Y.; HAAPASALO, M. Combined Antibacterial Effect of Sodium Hypochlorite and Root Canal Sealers against *Enterococcus faecalis* Biofilms in Dentin Canals. **Journal of Endodontics**, v.41, n.8, p.1294-1298, 2015.

FERRACANE, J.L.; COOPER, P.R.; SMITH, A.J. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? **Odontology**, v.98, n.1, p.2-14, 2010.

FÚCIO, S.B.; PAULA, A.B.; SARDI, J.C.; DUQUE, C.; CORRER-SOBRINHO, L.; PUPPIN-RONTANI, R.M. *Streptococcus mutans* Biofilm Influences on the Antimicrobial Properties of Glass Ionomer Cements. **Brazilian Dental Journal**, v.27, n.26, p.681-687, 2016.

GARCIA-FONT, M.; DURÁN-SINDREU, F.; MORELLÓ, S.; IRAZUSTA, S.; ABELLA, F.; ROIG, M.; OLIVIERI, J.G. Postoperative pain after removal of gutta-percha from root canals in endodontic retreatment using rotary or reciprocating instruments: a prospective clinical study. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n.7, p.2623-2631, 2018.

GILLEN, B.M.; LOONEY, S.W.; GU, L.S.; LOUSHINE, B.A.; WELLER, R.N.; LOUSHINE, R.J.; PASHLEY, D.H.; TAY, F.R. Impact of the quality of coronal restoration versus the quality of root canal fillings on success of root canal treatment: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Endodontics**, v.37, n.7, p.895-902, 2011.

GOMES, B.P.; FERRAZ, C.C.; GARRIDO, F.D.; ROSALEN, P.L.; ZAIA, A.A.; TEIXEIRA, F.B.; SOUZA-FILHO, F.J. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. **Journal of Endodontics**, v.28, n.11, p 758-761, 2002.

HAFSHEJANI, T.M.; ZAMANIAN, A.; VENUGOPAL, J.R.; REZVANI, Z.; SEFAT, F.; SAEB, M.R.; VAHABI, H.; ZARRINTAJ, P.; MOZAFARI, M. Antibacterial glass-ionomer cement restorative materials: A critical review on the current status of extended release formulations. **Journal of Controlled Release**, v.262, p.317-328, 2017.

HAJIFATTAHI, F.; MORAVEJ-SALEHI, E.; TAHERI, M.; MAHBOUBI, A.; KAMALINEJAD, M. Antibacterial Effect of Hydroalcoholic Extract of Punica granatum Linn. Petal on Common Oral Microorganisms. **International Journal of Biomaterials**, 2016.

HASS, V.; DE-PAULA, A.M.; PARREIRAS, S.; GUTIÉRREZ, M.F.; LUQUE-MARTINEZ, I.; DE PARIS MATOS, T.; BANDECA, M.C.; LOGUERCIO, A.D.; YAO, X.; WANG, Y.; REIS, A. Degradation of dentin-bonded interfaces treated with collagen cross-linking agents in a cariogenic oral environment: An *in situ* study. **Journal of Dentistry**, v.49, n.1, p.60-67, 2016.

HEYDER, M.; KRANZ, S.; VÖLPEL, A.; PFISTER, W.; WATTS, D.C.; JANDT, K.D.; SIGUSCH, B.W. Antibacterial effect of different root canal sealers on three bacterial species. **Dental Materials**, v.29, n.5, p.542-549, 2013.

HOEDKE, D.; ENSELEIT, C.; GRUNER, D.; DOMMISCH, H.; SCHLAFER, S.; DIGE, I.; BITTER, K. Effect of photodynamic therapy in combination with various irrigation protocols on an endodontic multispecies biofilm ex vivo. **International Endodontic Journal**, v.51, n.1, p.23-34, 2018.

JACOB, A.P.; FRAGA, M.L.; MADEIRA, L. Evaluation of bond strength of human dentin subjected to different forms of storage. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v.7, n.3, p.297-302, 2010.

KHOROUSHI, M.; KESHANI, F. A review of glass-ionomers: From conventional glass-ionomer to bioactive glass-ionomer. **Dental Research Journal**, v.10, n.4, p.411-420. 2013.

KOAGEL, S.O.; MINES, P.; APICELLA, M.; SWEET, M. *In vitro* study to compare the coronal microleakage of Tempit UltraF, Tempit, IRM, and Cavit by using the fluid transport model. **Journal of Endodontics**, v.34, n.4, p.442-444, 2008.

KOCH, T.; PEUTZFELDT, A.; MALINOVSKII, V.; FLURY, S.; HÄNER, R.; LUSSI A. Temporary zinc oxide-eugenol cement: eugenol quantity in dentin and bond strength of resin composite. **European Journal of Oral Sciences**, v.121, n.4, p.363-369, 2013.

KRETH. J.; ZHU, L.; MERRITT, J.; SHI, W.; QI, F. Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, n.3. p.213-219, 2008.

LAI, Y.Y.; PAI, L.; CHEN C.P. Marginal leakage of different temporary restorations in standardized complex endodontic access preparations. **Journal of Endodontics**. 2007 v.33, n.7, p.875-878.

LI, Y.; CARRERA, C.; CHEN, R.; LI, J.; LENTON, P.; RUDNEY, J.D.; JONES, R.S.; APARICIO C, FOK A. Degradation in the dentin-composite interface subjected to multi-species biofilm challenges. **Acta Biomaterialia**, v.10, n.1, p.375-383, 2014.

LUSSI, A.; SCHLUETER, N.; RAKHMATULLINA, E.; GANSS, C. Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. **Caries Research**, v.45, n.1, p.2-12, 2011.

MA, J.; TONG, Z.; LING, J.; LIU, H.; WEI, X. The effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine irrigants on the antibacterial activities of alkaline media against *Enterococcus faecalis*. **Archives of Oral Biolog**, v.60, n.7, p.1075-1081, 2015.

MARÍN-BAUZA, G.A.; SILVA-SOUSA, Y.T.; DA CUNHA, S.A.; RACHED-JUNIOR, F.J.; BONETTI-FILHO, I.; SOUSA-NETO, M.D.; MIRANDA, C.E. Physicochemical properties of endodontic sealers of different bases. **Journal of Applied Oral Science**, v.20, n.4, p.455-461, 2012.

MARKOSE, A.; KRISHNAN, R.; RAMESH, M.; SINGH, S. A comparison of the sealing ability of various temporary restorative materials to seal the access cavity: An in vitro study. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v.8, n.1, p.42-44, 2016.

MOAZZEZ, R.; BARTLETT, D. Intrinsic causes of erosion. **Monographs in Oral Science**, v.25, n.1, p.180-196, 2014.

MONAJEMZADEH, A.; AHMADI ASOOR, S.; ASLANI, S.; SADEGHI-NEJAD, B. *In vitro* antimicrobial effect of different root canal sealers against oral pathogens. **Current Medical Mycology**, v.3, n.2, p7-12, 2017.

MORIYAMA, C.M.; RODRIGUES, J.A.; LUSSI, A.; DINIZ, M.B. Effectiveness of fluorescence-based methods to detect *in situ* demineralization and remineralization on smooth surfaces. **Caries Research**, v.48, n.6, p.507-514, 2014.

MUHAMMAD, O.H.; ROCCA, J.P.; FORNAINI, C.; MEDIONI, E. Evolution of the role of phototherapy during endodontic decontamination. **Laser Therapy**, v.24, n.4, p.291-302, 2015.

MUSHASHE, A.M.; GONZAGA, C.C.; TOMAZINHO, P.H.; DA CUNHA, L.F.; LEONARDI, D.P.; PISSAIA, J.F.; CORRER, G.M. Antibacterial Effect and Physical-Mechanical Properties of Temporary Restorative Material Containing Antibacterial Agents. **International Scholarly Research Notices**, v.29, n.697197, 2015.

NASERI, M.; AHANGARI, Z.; SHAHBAZI MOGHADAM, M.; MOHAMMADIAN, M. Coronal sealing ability of three temporary filling materials. **Iranian Endodontic Journal**, v.7, n.1, p.20-24, 2012.

OLCAY, K.; ATAOGLU, H.; BELLI S. Evaluation of Related Factors in the Failure of Endodontically Treated Teeth: A Cross-sectional Study. **Journal of Endodontics**, v.44, p.38-45, 2018.

OMURLU, H.; ARISU, H.D.; DALKILIC, E.E.; TAMER, U.; TORUL, H. Investigation of eluted monomers from resin-based root canal sealer by high-performance liquid chromatography analysis. **European Journal of Dentistry**, v.10, n.1, p.92-96, 2016.

PADOVANI, G.; FÚCIO, S.; AMBROSANO, G.; SINHORETI, M.; PUPPIN-RONTANI, R. *In situ* surface biodegradation of restorative materials. **Operative Dentistry**, v.39, n.4, p.349-360, 2014.

PAKDEETHAI, S.; ABUZAR, M.; PARASHOS, P. Fracture patterns of glass-ionomer cement overlays versus stainless steel bands during endodontic treatment: an ex-vivo study. **International Endodontic Journal**, v.46, n.12, p.1115-1124, 2013.

PANHÓCA, V.H.; FLOREZ, F.; BATISTA DE FARIA JÚNIOR, N.; RASTELLI, A.N.; TANOMARU, J.; KURACHI, C.; BAGNATO, V.S. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* biofilm *in situ*. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v.17, n.3, p.184-191, 2016.

PERALTA, S.L.; LELES, S.B.; DUTRA, A.L.; GUIMARÃES, V.B.D.S.; PIVA, E.; LUND, R.G. Evaluation of physical-mechanical properties, antibacterial effect, and cytotoxicity of temporary restorative materials. **Journal of Applied Oral Science**, v.26, n.e20170562, p.1-10, 2018.

PEREIRA, R.S.; RODRIGUES, V.A.A.; FURTADO, W.T.; GUEIROS, S.; PEREIRA, G.S.; AVILA-CAMPOS, M.J. Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. **Anaerobe**, v.27, n.48, p12-18, 2017.

PIERRO, V.S.; IORIO, N.L.; LOBO, L.A.; CABRAL, L.M.; DOS SANTOS, K.R.; MAIA, L.C. Effect of a sugar-free pediatric antibiotic on primary tooth enamel hardness when exposed to different sucrose exposure conditions *in situ*. **Clinical Oral Investigation**, v.18, n.5, p.1391-1399, 2014.

PORENCZUK, A.; GRZECZKOWICZ, A.; MACIEJEWSKA, I.; GOŁAŚ, M.; PISKORSKA, K; KOLENDA, A; GOZDOWSKI, D.; KOPEĆ-SWOBODA, E.; GRANICKA, L.; OLCZAK-KOWALCZYK, D. An initial evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a disinfection liquid containing silver nanoparticles alone and combined with a glass-ionomer cement and dentin bonding systems. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v.28, n. 1, p.75-83, 2019.

RODRIGUES, R.C.V.; ZANDI, H.; KRISTOFFERSEN, A.K.; ENERSEN, M.; MDALA, I.; ØRSTAVIK, D.; RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.F. Influence of the Apical Preparation Size and the Irrigant Type on Bacterial Reduction in Root Canal-treated Teeth with Apical Periodontitis. **Journal of Endodontics**, v.43, n.7, p.1058-1063, 2017.

ROTH, K.A.; FRIEDMAN, S.; LÉVESQUE, C.M.; BASRANI, B.R.; FINER, Y. Microbial biofilm proliferation within sealer-root dentin interface is affected by sealer type and aging period. **Journal of Endodontics**, v.38, n.9, p.1253-1256, 2012.

RUIZ-LINARES, M.; AGUADO-PÉREZ, B.; BACA, P.; ARIAS-MOLIZ, M.T.; FERRER-LUQUE, C.M. Efficacy of antimicrobial solutions against polymicrobial root canal biofilm. **International Endodontic Journal**, v.50, n.1, p.77-83, 2017.

SABIR, S.; ARSHAD, M.; CHAUDHARI, S. K. Zinc Oxide Nanoparticles for Revolutionizing Agriculture: Synthesis and Applications. **The Scientific World Journal**, v.2014, n.925494, p.1-8, 2014.

SAHA, S.; SAMADI, F.; JAISWAL, J.N, GHOSHAL, U. Antimicrobial activity of different endodontic sealers: an *in vitro* evaluation. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v.28, n.4, p.251-257, 2010.

SEELAN, R.G.; KUMAR, A.A.; EMIL SAM, R.J.; MAHESWARI, S.U. Antimicrobial efficacy of different root canal sealers by using real-time polymerase chain

reaction: An ex vivo study. **Journal of Conservative Dentistry**, v.18, n.6, p.474-478, 2015.

SHARAFEDDIN, F.; ALAVI, A.A.; ZARE, S. Fracture resistance of structurally compromised premolar roots restored with single and accessory glass or quartz fiber posts. **Dental Research Journal**, v.11, n.2, p.264-271, 2014.

SHARMA, D.; GROVER, R.; PINNAMENENI, P.S.; DEY, S.; RAJU, P.R. Evaluation of efficacy of combinations of five endodontic sealers with five antibiotics against Enterococcus Faecalis - An *in-vitro* study. **Journal of International Oral Health**, v.6, n.2, p.90-95, 2014.

SIDHU, S.K.; NICHOLSON, J.W. A Review of Glass-Ionomer Cements for Clinical Dentistry. **Journal of Functional Biomaterials**, v.28, n.7, 2016.

SIGNORETTI, F.G.; GOMES, B.P.; MONTAGNER, F.; JACINTO, R.C. Investigation of cultivable bacteria isolated from longstanding retreatment-resistant lesions of teeth with apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v.39, n.10, p.1240-1244, 2013.

SILVA-NETO RD, SOUSA-NETO MD, PÉCORA JD, PALMA-DIBB RG, SOUZA-GABRIEL AE. Wear profile of canal wall surfaces and bond strength of endodontic sealers after in situ acid challenge. **International Endodontic Journal**, v.51, n.3, p.364-374, 2018.

SLUTZKY-GOLDBERG, I.; SLUTZKY, H.; GORFIL, C.; SMIDT, A. Restoration of endodontically treated teeth review and treatment recommendations. **International Journal of Dentistry**, v.2009, n.150251, p.1-9, 2009.

SOHRABI, K.; SOORATGAR, A.; ZOLFAGHARNASAB, K.; KHARAZIFARD, M.J.; AFKHAMI, F. Antibacterial Activity of Diode Laser and Sodium Hypochlorite in Enterococcus Faecalis-Contaminated Root Canals. **Iranian Endodontic Journal**, v.11, n.1, p.8-12, 2016.

SOUSA-NETO, M.D.; SILVA-SOUSA, Y.C.; MAZZI-CHAVES, J.F.; CARVALHO, K.K.T.; BARBOSA, A.F.S.; VERSIANI, M.A.; JACOBS, R.; LEONI, G.B. Root canal preparation using micro-computed tomography analysis: a literature review. **Brazilian Oral Research**, v.18, n.32, p. 66, 2018.

SOUKI, B.Q.; AZEVEDO, R.V.; ITO, I.Y.; BATISTA, L.F.; GANHOTO, A.P.; MUSSOLINO, Z.M. The influence of gross caries removal and temporary filling of dental caries with a zinc oxide eugenol cement on the level of mutans streptococci in saliva. **Brazilian Dental Journal**, v.3, n.1, p.3-9. 1992.

SOUZA-GABRIEL, A.E.; TURSSI, C.P.; COLUCCI, V.; TENUTA, L.M.; SERRA, M.C.; CORONA, S.A. *In situ* study of the anticariogenic potential of fluoride varnish combined with CO_2 laser on enamel. **Archives of Oral Biology**, v.60, n.6, p.804-810, 2015.

SRIVASTAVA, P.K.; NAGPAL, A.; SETYA, G.; KUMAR, S.; CHAUDHARY, A.; DHANKER, K. Assessment of Coronal Leakage of Temporary Restorations in

Root Canal-treated Teeth: An *in vitro* Study. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v.18, n.2, p.126-130, 2017.

SYED, S.A.; LOESCHE, W.J. Survival of human dental plaque flora in various transport media. **Journal of Applied Microbiology**, v.24, n.4, p.638-644, 1972.

TAMILSELVAM, S.; DIVYANAND, M.J.; NEELAKANTAN, P. Biocompatibility of a conventional glass ionomer, ceramic reinforced glass ionomer, giomer and resin composite to fibroblasts: in vitro study. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry,** 2013, v.37, n.4, p.403-406.

TENNERT, C.; FISCHER, G.F.; VÂCH, K.; WOELBER, J.P.; HELLWIG, E.; POLYDOROU, O. A temporary filling material during endodontic treatment may cause tooth fractures in two-surface class II cavities in vitro. **Clinical Oral Investigation**, v.20, n.3, p.615-620, 2016.

TORABINEJAD, M.; UNG, B.; KETTERING, J.D. In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth**. Journal of Endodontics**, 1990.

TÜZÜNER, T.; DIMKOV, A.; NICHOLSON, J.W. The effect of antimicrobial additives on the properties of dental glass-ionomer cements: a review. **Acta Biomaterialia Odontologica Scandinavica**, v.5, n.1, p.9-21, 2019.

VIRTEJ, A.; MACKENZIE, C.R.; RAAB, W.H.; PFEFFER, K.; BARTHEL, C.R. Determination of the performance of various root canal disinfection methods after *in situ* carriage. **Journal of Endodontics**, v.33, n.8, p.926-929, 2006.

WIERICHS, R.J.; MEYER-LUECKEL, H. Systematic review on noninvasive treatment of root caries lesions. **Journal of Dental Research**, v.94, n.2, p.261-271, 2015.

XUEREB, M.; VELLA, P.; DAMIDOT, D.; SAMMUT, C.V.; CAMILLERI J. *In situ* assessment of the setting of tricalcium silicate-based sealers using a dentin pressure model. **Journal of Endodontics**, v.41, n.1, p.111-124, 2015.

ZANDI, H.; RODRIGUES, R.C.; KRISTOFFERSEN, A.K.; ENERSEN, M.; MDALA, I.; ØRSTAVIK, D.; RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.F. Antibacterial Effectiveness of 2 Root Canal Irrigants in Root-filled Teeth with Infection: A Randomized Clinical Trial. **Journal of Endodontics**, v.42, p.1307-1313, 2016.

Anexos

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP - FORP/USP

Continuação do Parecer: 2.186.120

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese: Não há diferença de comportamento das restaurações temporárias frente a desafio ácido in situ.

Objetivo Primário: O presente estudo tem como objetivo geral a análise microbiológica dos canais radiculares e a eficiência da restauração temporária frente ao desafio ácido in situ na dentina intrarradicular

Objetivo Secundário: O estudo possuirá os seguintes objetivos específicos: 1.Determinar o biofilme formado sobre as raízes expostas ao ambiente ácido; 2.Quantificar os micro-organismos Enterococcus faecalis e Streptococcus mutans presentes no interior dos túbulos dentinários em toda a extensão na luz do canal radicular pelo método da diluição seriada (UFC); 3.Analisar o perfil de desgaste da dentina/restauração temporária por meio de microscopia confocal de varredura a laser (MCVL).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O tratamento proporciona riscos mínimos, já que não machuca, não causa dor, sendo assim, não causa riscos para a sua saúde, nem danos aos seus dentes. Benefícios: Como benefício, receberá gratuitamente um kit contendo escova dental e creme dental e os resultados encontrados neste estudo poderão também ajudar a outras pessoas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, importante, bem fundamentada, pesquisadores com experiência na área, projeto bem estruturado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos adequados.

Recomendações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado conforme deliberado na 206ª Reunião Ordinária do CEP/FORP de 25/07/2017.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br

ANEXO B- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(Resolução nº466/2012 – Conselho Nacional de Saúde)

Nós, Reinaldo e Aline, pesquisadores responsáveis pelo projeto de pesquisa intitulado "**Eficiência das restaurações temporárias frente ao desafio ácido *in situ*: integridade da interface e penetração dos micro-organismos nos canais radiculares***"* convidamos o (a) Sr (a) _____ a participar desta pesquisa que foi realizada na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, sob a orientação da Profª Drª Aline Evangelista de Souza Gabriel. Este trabalho tem como objetivo avaliar o comportamento de alguns materiais utilizados após o tratamento de canal.

Você foi moldado (a) com um material mole que endurece aos poucos para copiar as arcadas superior e inferior da sua boca para que a placa de acrílico fique pronta. A placa de acrílico é feita com um material transparente (resina acrílica) que contém cinco aberturas com cinco raízes esterilizadas (sem bactérias) com material que preenche o canal e deverá ser utilizada em duas fases de 14 dias com intervalo de 7 dias entre cada fase.

A placa deverá retirada para comer e beber líquidos. Foi entregue a você, no início da pesquisa, orientações escritas e faladas sobre como utilizar a placa de acrílico que contém raízes esterilizadas (sem bactérias) com o material que preenche o canal.

Você receberá uma solução contendo água com açúcar para ser pingada em cada uma das raízes, seis vezes ao dia, nos seguintes horários às 8:00; 11:00; 15:00; 17:00; 19:00 e 21:00 horas. A limpeza da placa deverá ser feita com o creme dental e a escova de dentes fornecidas pelo pesquisador, escovando apenas parte que fica em contato com o "céu da boca".

Você está sendo esclarecido que este tratamento proporciona riscos mínimos, já que não machuca, não causa dor, sendo assim, não causa riscos para a sua saúde, nem danos aos seus dentes. Haverá desconforto da moldagem, na qual o material mole foi inserido mole em sua boca e irá endurecer em poucos minutos, copiando seus dentes para a confecção da placa de acrílico. Como benefício, você receberá gratuitamente um kit contendo escova dental e creme dental e os resultados encontrados neste estudo poderão também ajudar a outras pessoas. Não foi oferecido nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa, porém todas as despesas decorrentes de sua participação nesta pesquisa foram custeadas pelos pesquisadores responsáveis e todo seu atendimento foi gratuito. Você tem a garantia de que em qualquer momento terá o direito de pedir indenização por eventuais danos. Sua identidade e seus dados foram mantidos em segredo, mas participando desta pesquisa, você autoriza que os resultados obtidos sejam divulgados e publicados em revistas científicas e terá, por parte dos pesquisadores, a garantia do sigilo (segredo) que garantem a sua privacidade (sua identidade permanecerá anônima).

Você terá total liberdade para pedir maiores esclarecimentos antes, durante e após o desenvolvimento da pesquisa. Se tiver qualquer dúvida, você poderá ligar para o pesquisador

responsável para pedir qualquer informação sobre a pesquisa (PG. Reinaldo Dias da Silva Neto – Avenida do Café, S/N - Departamento de Odontologia Restauradora, Dentística - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Tel.: (16) 3315-4075/ (16) 98245-0997). Os dados obtidos a partir desta pesquisa não poderão ser usados para outros fins além dos previstos por este termo de consentimento livre e esclarecido. Suas reclamações e/ou insatisfações relacionadas à sua participação na pesquisa poderão ser comunicadas por escrito à Secretaria do CEP/FORP/USP, devendo conter seu nome que foi mantido em sigilo (segredo).

A sua participação não é obrigatória, e você poderá desistir a qualquer momento, retirando o seu consentimento (autorização). A não autorização deste trabalho não trará nenhum prejuízo, penalidade ou represália de qualquer natureza, em sua relação com os pesquisadores ou com a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

Este Termo foi confeccionado em duas vias de igual teor, foram assinadas na última página e rubricadas nas demais páginas pelos pesquisadores responsáveis e por você, participante da pesquisa, ficando uma via com os pesquisadores e outra via com você.

Eu_____, portador(a) do RG_____, CPF_____ residente à _____, nº_____, na cidade de _____, Fone:_____, Estado de _____. Declaro que li, compreendi e concordo com o presente Termo e, por isso, assino este documento de livre e espontânea vontade.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 201___.

_____
Assinatura do participante

Reinaldo D. da Silva Neto	Profª Drª Aline E. Souza Gabriel
(16) 98245-0997	(16)99102-0020
(16) 3315-4075	(16) 3315-4075
CPF 060.461.454-30	CPF: 282.928.788-66
Pesquisador responsável	Pesquisadora participante

Reinaldo Dias Da Silva Neto (pesquisador responsável)
E-mail: reinaldodiasneto@usp.br

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da FORP
Avenida do Café, s/n – Monte Alegre, Ribeirão Preto – SP – Brasil - CEP: 14040-904
Telefone: (16) 3315-0493.

ANEXO C – OFÍCIO DE AUTORIZAÇÃO DA INFRAESTRUTURA DA FORP/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

AUTORIZAÇÃO DA INFRA-ESTUTURA NECESSÁRIA PARA A REALIZAÇÃO DA PESQUISA

Declaramos, a fim de viabilizar a execução da pesquisa intitulada "**Eficiência das restaurações temporárias frente ao desafio ácido *in situ*: integridade da interface e penetração dos micro-organismos nos canais radiculares**" sob a responsabilidade do(s) pesquisador(es) Reinaldo Dias da Silva Neto e Aline Evangelista de Souza Gabriel que os Laboratórios de Dentística e Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo conta com a infra-estrutura necessária para a realização da referida pesquisa, bem como para atender eventuais problemas dela resultantes, atendendo plenamente a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, bem como as normas complementares do mesmo.

Declaramos, ainda que o (s) referido(s) pesquisador(es) está (ão) autorizado(s) a utilizar a infra-estrutura necessária para o desenvolvimento da pesquisa.

Ribeirão Preto/SP: 26 de junho de 2017

Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva
Chefe do Departamento de Odontologia Restauradora

AVENIDA DO CAFÉ S/Nº

14040-904 – RIBEIRÃO PRETO – S.P. – BRASIL