



UNESP- Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho"  
Faculdade de Odontologia



**ALANA PRISCILA SOUZA AGUIAR**

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICA E ANTIBACTERIANA  
DE MEDICAÇÕES INTRACANAL À BASE DE HIDRÓXIDO  
DE CÁLCIO E ÓXIDO DE ZINCO MICRO E  
NANOPARTICULADOS**

Araraquara

2014



UNESP- Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho"  
Faculdade de Odontologia



**ALANA PRISCILA SOUZA AGUIAR**

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICA E ANTIBACTERIANA  
DE MEDICAÇÕES INTRACANAL À BASE DE HIDRÓXIDO  
DE CÁLCIO E ÓXIDO DE ZINCO MICRO E  
NANOPARTICULADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria  
Guerreiro Tanomaru

Araraquara

2014

ALANA PRISCILA SOUZA AGUIAR

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICA E  
ANTIBACTERIANA DE MEDICAÇÕES  
INTRACANAL À BASE DE HIDRÓXIDO DE  
CÁLCIO E ÓXIDO DE ZINCO MICRO E  
NANOPARTICULADOS**

Comissão Julgadora para obtenção do título de Doutora em Odontologia:

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro  
Tanomaru

Profa. Dra Gisele Faria

Prof. Dr Idomeo Bonetti Filho

Prof. Dr Norberto Batista de Faria Júnior

Prof. Dr. Evandro Watanabe

Araraquara, 24 de novembro de 2014.

**DADOS CURRICULARES**  
**ALANA PRISCILA SOUZA AGUIAR**

Nascimento: 20 de maio de 1983 - Maceió- AL

Filiação: Maria do Socorro Souza Da Silva

Edvaldo Salustiano da Silva

**2000/2005** Graduação em Odontologia

Universidade Federal de Alagoas

**2006/2007** Especialização em Endodontia

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” / São José dos Campos.

**2007/2009** Mestrado em Odontologia Restauradora

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” / São José dos Campos.

**2010/2011** Aluna Especial da pós- graduação em Odontologia

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” / Araraquara

**2011/2014** Doutoranda em Odontologia

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” / Araraquara

## **DEDICATÓRIA**

### ***A DEUS***

que abençoou-me , protegeu, carregou-me nos braços quando pensei que não conseguiria, pelo presente da vida e pelos anjos enviados a mim.

### ***À minha FAMILIA***

que acreditou, apoiou- me, se doou, lutou valentemente, cuidou de cada sorriso, enxugou cada lágrima e se sacrificou pelo meu sonho e minha felicidade.

## **AGRADECIMENTOS**

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, na pessoa de seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Julio Cezar Durigan e vice-reitora Prof. Dra. Marilza Vieira Cunha Rudge.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, na pessoa de sua Diretora Profa. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon e vice-diretora Profa. Dra. Elaine M. Sgavioli Massucato.

Ao **Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, representado pelo Chefe de Departamento Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Vilella Berbert e vice-chefe Prof. Dr. Edson Alves de Campo.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia**, coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Rossa Junior.

À **CNPq** pela concessão da bolsa de Doutorado.

Ao **Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho**, pelos ensinamentos transmitidos pacientemente, humildemente, sabiamente, meticulosamente extraíndo o meu melhor de pesquisadora. Serei sempre uma discípula propagando a tua filosofia científica e humana.

À **Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, mais que minha orientadora, um anjo que esteve ao meu lado durante esta caminhada. A sua dedicação a Endodontia é fascinante. Ativa! Desde o pensamento do projeto à execução e conclusão da pesquisa. Soluciona as intercorrências naturalmente. Possui uma força interior, um coração bondoso, me ensinou ser uma pesquisadora, a ser uma pessoa melhor. Minha admiração e gratidão serão eternas.

À **Profa. Dra. Gisele Faria**, pelo exemplo a ser seguido de empenho a comunidade científica e pela amizade presenteada.

Ao **Prof. Dr. Milton Carlos Kuga** pelos momentos de descontração, indicações de literatura não específica e pelas aulas magníficas.

Ao **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho**, por sempre ser cativante com essa energia positiva e por contagiar com esse fervor pela Endodontia.

Ao **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Vilella Berbert** pelos conhecimentos transmitidos.

Ao **Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo** pela agradável convivência.

Aos meus grandes amigos da pós-graduação, **Paula, Flávia, Matheus Letícia, Camila Espir, Carol Venção, Carol Andolfato, Tiago, Guilherme, Adriana, Fernando, Kátia, Miriam, Keli, Juliana, Bernardo, Arnaldo, Rodrigo, Norberto, Rafael, Camila Nascimento, Arturo, Rodrigo, Guilherme, Loise, em especial à Roberta Bosso, Gisselle,**

**Ariete, Raqueli, Natália, Ana Livia, Elisandra e Adinael** que tornaram meus dias tão felizes, com tantas novidades, me ajudaram, me apoiaram, foram companheiros em todos os momentos. Momentos inesquecíveis. Vocês são os maiores responsáveis por esta saudade imensa que carrego em meu coração.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora, **Creusa, Diva, Conceição, Cida, Marinho, Denise, Nelly, Vanderlei, Rosângela, Priscila, Marlene, Aninha e Lucinha** pelo carinho e agradável convivência.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Mara, Alexandre, Sergio e Fábio**, por me ajudarem prontamente de forma tão gentil.

Aos funcionários da Biblioteca, **Ceres, Marley, Adriano, Inês, Silvia, Eliane e Disleide**, por serem solícitos.

A todos que contribuíram para realização desta pesquisa e conclusão do Doutorado.

*"A cada dia que vivo, mais me convence de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade. A dor é inevitável. O sofrimento é opcional."*

*Carlos Drummond de Andrade*

Aguiar APS. Propriedades físico-química e antibacteriana de medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio e óxido de zinco micro e nanoparticulados [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

## RESUMO

*Enterococcus faecalis* apresenta elevada resistência às medicações intracanal. O emprego de substâncias nanoparticuladas e a associação à clorexidina podem interferir na efetividade da medicação. O objetivo deste estudo foi avaliar pH e atividade antibacteriana de pastas à base de hidróxido de cálcio (HC) e óxido de zinco (ZnO) microparticulados (micro) ou nanoparticulados (nano) associados ou não à clorexidina 0,4% frente ao *Enterococcus faecalis*. Foram analisadas as pastas: HC/ZnO micro; HC/ZnO nano; HC/ZnO micro + Clorexidina a 0,4%; HC/ZnO nano + Clorexidina a 0,4%. O polietilenoglicol 400 foi usado como veículo. A atividade antibacteriana frente ao *Enterococcus faecalis* foi avaliada por três estudos *in vitro*: Estudo de Difusão em Ágar, Teste de Contato Direto em Células Planctônicas e por meio de Biofilme Induzido em Canais Radiculares de Dentes Humanos. A análise do pH foi determinada por meio da Difusão em Dentes Bovinos e por Dissociação em Tubos de Polietileno. Os resultados dos estudos obtidos foram submetidos aos testes estatísticos ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn, com nível de significância de 5%. Os resultados dos testes Difusão em Ágar mostraram que a medicação HC/ZnO nano e pastas com clorexidina 0,4% foram mais efetivas. No Contato Direto as pastas com clorexidina mostraram maior atuação após 30 segundos e todas eliminaram *Enterococcus faecalis* após 1 minuto. O teste de Difusão em Dentina Bovina mostrou maior aumento de pH para as medicações nanoparticuladas nos períodos de 1 e 7 dias ( $p < 0,05$ ). Todas as pastas promoveram aumento do pH de forma similar ( $p > 0,05$ ) no Teste com Tubos de Polietileno. A avaliação em canais radiculares demonstrou que as pastas foram efetivas na coleta após a sua remoção, mas na coleta final as medicações com clorexidina apresentaram maior redução bacteriana ( $p < 0,05$ ). Conclui-se que as nanopartículas de hidróxido de cálcio e óxido de zinco promovem maior difusão dentinária permitindo um pH alcalino nos períodos iniciais e a atuação das pastas sobre *Enterococcus faecalis* é favorecida pela associação com clorexidina.

**PALAVRAS-CHAVES:** Nanopartículas, hidróxido de cálcio, óxido de zinco.

Aguiar APS. Physicochemical and antimicrobial properties of intracanal medication based on calcium hydroxide and zinc oxide micro and nanoparticles [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

## ABSTRACT

*Enterococcus faecalis* presents high resistance to intracanal medications. The use of nanoparticulate substances and the association with chlorhexidine may interfere with the effectiveness of the medication. The aim of this study was to evaluate pH and antibacterial activity of medications based microparticulate (micro) or nanoparticles (nano) calcium hydroxide (CH) and zinc oxide (ZnO) associated or without chlorhexidine 0.4% against *Enterococcus faecalis*. Medications were analyzed: HC / ZnO micro; HC / ZnO nano; HC / ZnO micro + Chlorhexidine 0.4%; HC / ZnO nano + Chlorhexidine 0.4%. Polyethylene glycol 400 was used as vehicle. The antibacterial activity against *E. faecalis* was evaluated by three in vitro studies: Study of Diffusion in Agar, Testing of Direct Contact in planktonic cells and through induced biofilm in root canals of human teeth. The analysis of pH was determined using bovine teeth of diffusion and dissociation of polyethylene tubes. The results of studies obtained were submitted to ANOVA and Tukey or Kruskal-Wallis and Dunn, with a significance level of 5%. The results of the agar diffusion test showed that the HC / ZnO nano and with 0.4% chlorhexidine medication were more effective. In Direct Contact medication with chlorhexidine showed increased activity after 30 seconds are all eliminated *Enterococcus faecalis* after 1 minute. The diffusion test for bovine dentin showed higher pH increase for nanoparticulate medication in periods 1 and 7 days ( $p < 0.05$ ). All medications pH increase promoted similarly ( $p > 0.05$ ) in test tubes of polyethylene. The evaluation showed that in root canals medication so effective in collecting after their removal, but the final collection medications with chlorhexidine showed higher bacterial reduction ( $p < 0.05$ ). It is concluded that the nanoparticles of calcium hydroxide and zinc oxide promote greater dentinal diffusion and high pH in the initial periods and action of medications on *Enterococcus faecalis* is enhanced by association with chlorhexidine.

KEYWORDS: Nanoparticles, calcium hydroxide, zinc oxide.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>PROPOSIÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 1- Atividade antibacteriana e pH de pasta á base de hidróxido de cálcio e óxido de zinco nanoparticulados associados à clorexidina.</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Resumo</b>	<b>19</b>
<b>3.2</b>	<b>Introdução</b>	<b>20</b>
<b>3.3</b>	<b>Material e Método</b>	<b>21</b>
<b>3.4</b>	<b>Resultados</b>	<b>25</b>
<b>3.5</b>	<b>Discussão</b>	<b>27</b>
<b>3.6</b>	<b>Referências</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 2- pH e atividade antimicrobiana sobre <i>Enterococcus faecalis</i> de medicações à base de hidróxido de cálcio e óxido de zinco micro ou nanoparticulados associados à clorexidina</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Resumo</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Introdução</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Material e Método</b>	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>Resultados</b>	<b>40</b>
<b>4.5</b>	<b>Discussão</b>	<b>42</b>
<b>4.6</b>	<b>Referências</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO FINAL</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO FINAL</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>ANEXO</b>	<b>59</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Espécies microbianas podem formar uma estrutura organizada envolvida por substâncias protetoras, denominada biofilme microbiano. Os biofilmes microbianos são notavelmente resistentes às substâncias químicas utilizadas durante a terapia endodôntica (Paz et al.<sup>30</sup>, 2010; Wilson et al.<sup>41</sup>, 2014). Em condições favoráveis do meio, micro-organismos sobreviventes à terapia endodôntica são capazes de recolonizar o sistema de canais radiculares, um dos fatores determinantes para o insucesso do tratamento endodôntico (Johnson et al.<sup>13</sup>, 2006; Paz<sup>30</sup>, 2007; Blome et al.<sup>2</sup>, 2008, Ozbek et al.<sup>28</sup>, 2009; Morgental et al.<sup>24</sup>, 2011).

Entre os micro-organismos, *Enterococcus faecalis* apresenta fatores de virulência e polimorfismo que dificulta sua eliminação. Estudos demonstram que podem ser encontrados em infecções primárias e secundárias, podendo ser responsável pela manutenção da lesão periapical. Apresenta elevada resistência a medicamentos e consegue sobreviver em meio alcalino e com deficiência ou ausência de nutrientes (Sedgley et al.<sup>34</sup>, 2004; Sedgley et al.<sup>33</sup>, 2005; Ozbek et al.<sup>28</sup>, 2009; Karygianni et al.<sup>14</sup>, 2012).

O hidróxido de cálcio é a medicação intracanal mais utilizada na Endodontia principalmente pelo alto pH, que está relacionado à ampla ação antimicrobiana. Apresenta capacidade de neutralizar endotoxinas, podendo ter sua ação potencializada quando associado à clorexidina (Guerreiro-Tanomaru et al.<sup>11</sup>, 2003; Oliveira et al.<sup>27</sup>, 2012; Sinha et al.<sup>37</sup>, 2013; Mohammadi et al.<sup>22</sup>, 2014). A associação do hidróxido de cálcio à

clorexidina aumenta sua eficiência sobre *E. faecalis* (Evans et al.<sup>8</sup>, 2003) e mantém elevado pH.

Vianna et al.<sup>40</sup> (2008), identificaram 40 espécies bacterianas e quantificaram o número total de bactérias em amostras colhidas de canais radiculares infectados antes do tratamento, após o preparo biomecânico e após 7 dias de medicação intracanal com hidróxido de cálcio ou hidróxido de cálcio/clorexidina 2% usando técnica de hibridização DNA-DNA e pela contagem das unidades formadoras de colônias, para avaliar as mudanças microbianas após procedimentos endodônticos. Verificaram que *E. faecalis* foi encontrado em todas as fases do tratamento. E que a redução de micro-organismo foi maior no grupo que utilizou a associação do hidróxido de cálcio/clorexidina quando comparado com o grupo hidróxido de cálcio somente.

Lima et al.<sup>18</sup> (2012) avaliaram a eficácia antimicrobiana de medicações intracanaís à base de hidróxido de cálcio nos períodos 7 e 14 dias frente *E. faecalis* em biofilme induzido em canais radiculares e certificaram que a medicação intracanal que continha clorexidina em sua formulação foi mais eficiente quando comparada com pasta Calen sem associação.

Duarte et al.<sup>5</sup> (2009), estudaram pastas a base de hidróxido de cálcio associado à clorexidina em concentrações 1% e 2 % e nas formas gel e solução através da metodologia em canais simulados em acrílico. Constataram que a adição de clorexidina não prejudica o pH, pois em todas

as formulações e períodos estudados o pH se manteve alcalino semelhantemente.

Além do pH e da ação antimicrobiana, a radiopacidade é uma propriedade importante na medicação intracanal para acompanhamentos clínicos. O óxido de zinco confere radiopacidade adequada (Duarte et al.<sup>6</sup>, 2009), podendo ser adicionado às medicações intracanal com esta finalidade.

Um dos maiores desafios é expor diretamente o efeito antimicrobiano das substâncias no interior do biofilme e com isso romper a integridade da membrana celular, levando a morte celular. Sugere-se que o alto peso e tamanho molecular das substâncias são fatores consideráveis para a dificuldade de transposição das substâncias ao biofilme. Uma abordagem para superar essa limitação pode ser a redução do tamanho de partícula para aumentar a área de superfície, assim, com mais ligações de sítio ativo de superfície melhorar o efeito das substâncias, como o aumento da liberação de íons (Sepulveda et al.<sup>35</sup>, 2002) e a biocompatibilidade (Cornélio et al.<sup>3</sup>, 2011).

O uso de nanopartículas atuando sobre células-alvo de cânceres e doenças do sistema nervoso central é realizado em distúrbios neurovascular e doenças neurodegenerativas. As nanopartículas exploram caminhos biológicos para realizar a entrega da carga para alvos celulares e intracelulares, incluindo o transporte da barreira cérebro-sangue (Ping Xu et al.<sup>31</sup>, 2006, Faraji et al.<sup>9</sup>, 2009).

Na Endodontia, as nanopartículas estão sendo adicionadas a pastas, selantes e cimentos. (Kishen et al.<sup>16</sup>, 2008; Shrestha et al.<sup>36</sup>, 2010; Mohn et al.<sup>23</sup>, 2010; Cornélio et al.<sup>3</sup>, 2011) A propriedade antimicrobiana e o método de entrega utilizado para dispersar as nanopartículas potencializam o sucesso da aplicação para terapia do sistema de canais radiculares (Mohammadi et al.<sup>22</sup>, 2014).

O óxido de zinco nanoparticulado pode reduzir biofilmes bacterianos, mas sua efetividade depende da concentração e tempo de interação (Sheresta et al.<sup>36</sup>, 2010). Moghadas et al.<sup>19</sup> (2012) verificaram que solução de nanopartículas de prata apresentaram resultados semelhantes ao hipoclorito de sódio frente ao *E. faecalis* e *S. aureus* nos períodos 3, 5 e 15 minutos. Motshekga et al.<sup>26</sup> (2013) também confirmaram as atividades antibacterianas de nanopartículas de óxido de zinco e nanopartículas de prata frente *Escherichia coli* e *E. faecalis* pelo método de difusão em ágar.

Entretanto, não existem relatos neste momento de estudos com hidróxido de cálcio nanoparticulado aplicado como medicação intracanal.

Diante do exposto, esta pesquisa visa avaliar o efeito da nanotecnologia aplicada ao hidróxido de cálcio e ao óxido de zinco, assim como a associação à clorexidina, nas propriedades de medicações intracanal.

## 2 PROPOSIÇÃO

Avaliar pH e a atividade antibacteriana de nanopartículas de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ )/ óxido de zinco (ZnO) associados ou não à clorexidina 0,4%, utilizando o polietilenoglicol 400 como veículo por meio dos estudos:

- 1- Difusão em Dentina Bovina, Difusão em Ágar, Teste de Contato Direto em Células Planctônicas.
- 2- Tubos de Polietileno e Desinfecção de Biofilme Induzido em Canais Radiculares de Dentes Humanos.

# *3 Capítulo 1*

**\*Atividade antibacteriana e pH de pasta á base de hidróxido de cálcio e óxido de zinco nanoparticulados associados á clorexidina**

\*Artigo nas normas da revista Clinical Oral Investigation.

### 3.1 RESUMO

Objetivos: Avaliar o pH e a propriedade antibacteriana de pastas à base de hidróxido de cálcio (HC) e óxido de zinco (ZnO) microparticulados (micro) ou nanoparticulados (nano) associados ou não à clorexidina 0,4% frente ao *Enterococcus faecalis*.

Material e métodos: Foram analisadas as pastas: HC/ZnO micro; 2) HC/ZnO nano; 3) HC/ZnO micro + Clorexidina a 0,4%; 4) HC/ZnO nano + Clorexidina a 0,4%. A atividade antibacteriana frente ao *Enterococcus faecalis* foi avaliada pelo teste de Difusão em Ágar, sendo usada solução de clorexidina a 2% como controle. O teste de Contato Direto sobre células planctônicas de *E. faecalis* foi realizado por 30 e 60 segundos. Solução salina foi usada como controle. O pH foi avaliado após preenchimento de canais radiculares de dentes bovinos nos períodos 1, 7, 14, 21, 30 e 60 dias. Os dados obtidos foram submetidos aos testes estatísticos ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn, com nível de significância de 5%.

Resultados: Os resultados dos testes Difusão em Ágar mostraram que a medicação HC/ZnO nano e pastas com clorexidina 0,4% foram mais efetivas. No Contato direto as pastas com clorexidina mostraram maior atuação após 30 s. Todas as pastas eliminaram *E. faecalis* após 60 s. Todas as pastas promoveram aumento do pH. Maior aumento de pH foi observado para as medicações nanoparticuladas nos períodos de 1 e 7 dias ( $p < 0,05$ ). Após este período as pastas apresentaram aumento similar de pH.

Conclusões: Conclui-se que as nanopartículas de hidróxido de cálcio e óxido de zinco promovem maior alcalinização inicial e a atuação das pastas sobre *E. faecalis* é favorecida pela associação com clorexidina.

Relevância clínica: A atuação sobre *E. faecalis* das pastas à base de hidróxido de cálcio é favorecida pela associação com clorexidina.

PALAVRAS-CHAVES: Antibacteriano, clorexidina, hidróxido de cálcio, nanopartículas, óxido de zinco, pH.

### 3.2 INTRODUÇÃO

O efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio está relacionado à liberação de seus íons hidroxila, que difundem através de túbulos dentinários até a superfície externa radicular [1, 2]. A dissociação do hidróxido de cálcio promove a formação de íons de hidroxila e cálcio, promovendo aumento do pH [3]. Os íons hidroxila são radicais livres com alto poder de reatividade [2, 4, 5], destruindo componentes da membrana celular das bactérias e diminuindo sua atividade biológica [6].

O hidróxido de cálcio é capaz de dissolver tecido orgânico [7], inibir reabsorção dentária, induzir formação de tecido duro [8], estimular proliferação de osteoblastos e inativar LPS bacteriano [9]. Apresenta ação antimicrobiana sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos encontrados em canais radiculares [10, 11]. Porém, o hidróxido de cálcio apresenta dificuldade na atuação sobre *Enterococcus faecalis*, micro-organismo resistente encontrado em infecções primárias e/ou secundárias [12-14]. Tem sido proposta a associação do hidróxido de cálcio a outros antimicrobianos, como paramonoclorefenol canforado ou clorexidina com objetivo de ampliar seu efeito antimicrobiano [12, 15-17].

A associação do hidróxido de cálcio/clorexidina promove redução efetiva de micro-organismos, sendo proposta como medicação intracanal em dentes com necrose pulpar [18]. Lima et al. [17], em 2012, avaliaram a ação antibacteriana de pastas a base de hidróxido de cálcio frente ao *Enterococcus faecalis* em canais radiculares de dentes humanos e verificaram que a associação com clorexidina 0,4% promove maior redução bacteriana quando comparada à pastas apenas com hidróxido de cálcio.

O tamanho e o peso molecular dos compostos químicos utilizados na composição das medicações intracanal como hidróxido de cálcio e óxido de zinco podem interferir em suas propriedades físicas e biológicas. A radiopacidade da pasta é favorecida pela presença de Óxido de Zinco [19-21]. A forma de nanopartículas de óxido de zinco pode ainda promover efeito antimicrobiano [22]. Sheresta et al. [23], em 2010, verificaram que o óxido de zinco

nanoparticulado reduziu biofilme de *Enterococcus faecalis* mantendo sua ação antibacteriana por 90 dias e que sua efetividade foi dependente da concentração e tempo de contato. Gómez-Ortiz et al. [24] (2013), verificaram a ação antifúngica *in vitro* de hidróxido de cálcio associado ao óxido de zinco nanoparticulado frente *Penicillium oxalicum* e *Aspergillus niger* por meio de microscopia eletrônica de varredura (SEM) e de difração de raios-X (XRD). Desta forma, o emprego de substâncias nanoparticuladas poderia permitir maior e mais rápida penetrabilidade nos túbulos dentinários, favorecendo o efeito químico e antimicrobiano no sistema de canais radiculares [22, 25, 26].

O objetivo deste estudo foi avaliar o pH e a propriedade antibacteriana de nanopartículas de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ )/ óxido de zinco (ZnO) associados ou não à clorexidina 0,4% sobre *Enterococcus faecalis*.

### **3.3 MATERIAL E MÉTODO**

Para avaliação antibacteriana e do pH foram utilizadas medicações intracanal em forma de pastas manipuladas no momento do uso. Foram analisados 4 grupos experimentais de acordo com a medicação intracanal: 1) Hidróxido de cálcio (Merck, USA) / óxido de zinco (Merck, USA) microparticulados; 2) Hidróxido de cálcio/ óxido de zinco nanoparticulados (Instituto de Física, USP, São Carlos, Brasil); 3) Hidróxido de cálcio / óxido de zinco microparticulado; + Clorexidina a 0,4% (Sigma); 4) Hidróxido de cálcio / óxido de zinco nanoparticulados + Clorexidina a 0,4%. As nanopartículas utilizadas apresentavam 100-200 Nm em estado sólido, obtidas a partir do processo de adsorção sequencial de polieletrólitos. A proporção entre os componentes nas medicações intracanal foi: 2,5 g de hidróxido de cálcio para 0,5 g de óxido de zinco para 2,0 mL de polietilenoglicol 400 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

Para os grupos que associavam a clorexidina, inicialmente era manipulada a pasta de hidróxido de cálcio/óxido de zinco que ao ser pesada em balança de precisão era calculado seu volume e adicionada a clorexidina até que a concentração final na pasta fosse de 0,4%.

### 3.3.1 Teste de Difusão em Ágar

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em triplicata e ambiente asséptico, dentro de câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda, Campinas, SP, Brasil). Para o teste de Difusão em Ágar foi utilizada suspensão ( $3 \times 10^7$  cel/mL) de *E. faecalis* (ATCC 29212), padronizada por meio de espectrofotômetro. Em seguida, 20  $\mu$ L desta suspensão foram semeados em placas de petri 20 x 100 mm, contendo meio de cultura m-Enterococcus Agar (n=3). Posteriormente, cinco poços equidistantes, de 4 mm de diâmetro, foram confeccionados com auxílio de dispositivo metálico esterilizado e, imediatamente preenchidos com as medicações intracanal avaliadas. Um dos cinco poços se destinou ao grupo controle e foi preenchido com clorexidina 2% (Arte & Ciência, Araraquara, Brasil).

As placas foram mantidas à temperatura ambiente por 2 horas para pré-difusão das medicações intracanal, e em seguida incubadas a 37 °C por 24 horas em microaerofilia. Os halos de inibição e difusão foram medidos utilizando um paquímetro digital. Os dados do estudo de difusão em agar foram submetidos aos testes de Kurskall-Wallis e Dunn, com nível de significância de 5%.

### 3.3.2 Contato Direto sobre células planctônicas

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em triplicata e ambiente asséptico, dentro de câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda, Campinas, SP, Brasil). Foi pesado 250 mg de cada medicação intracanal manipulada em tubo falcon e foi adicionado 10 mL de água destilada para obtenção de uma suspensão de medicação intracanal com concentração de  $25 \text{mg/mL}^{-1}$ . A suspensão foi agitada e permaneceu em repouso por 24 horas à temperatura ambiente.

Foi utilizada uma suspensão culturas jovens de *E. faecalis* (ATCC 29212) obtidas em placas de TSa (*Tryptic Soy Agar*, Difco, Detroit, MI, EUA), por meio de semeadura por esgotamento, 12 horas antes de cada teste. A pureza do inóculo foi observada pela morfologia macroscópica e microscópica (Coloração de Gram). O ajuste da concentração bacteriana foi

realizado em espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil). A suspensão bacteriana foi empregada no prazo máximo de 60 minutos após o ajuste correspondente a  $3 \times 10^7$  UFC/mL, padronizada em espectrofotômetro. Como controle negativo foi utilizada solução fisiológica esterilizada, que serviu para confirmação do número inicial de UFC/mL<sup>-1</sup>.

Por meio de pipetas automáticas, 1,45 mL de cada suspensão da medicação intracanal foram levados a tubos de polietileno. A seguir, uma alíquota de 50 µL da suspensão de *E. faecalis* foi adicionada ao tubo e agitada por 5 segundos em vortex (Vortex AP 56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil). Os tempos de contato foram 30 segundos e 1 minuto.

Decorrido esse período, foram realizadas diluições decimais seriadas até  $10^{-4}$ . Nesta etapa, alíquotas de 100 µL da mistura foram transferidas para um segundo tubo contendo 0,9 mL de agente neutralizante. Para as medicações intracanal a base de hidróxido de cálcio, o neutralizante utilizado foi ácido cítrico a 0,5%. Nos grupos contendo clorexidina, foram utilizados os neutralizantes: ácido cítrico 0,5% e a lecitina de soja preparada com Tween 80. Estes neutralizantes estiveram presentes nos dois primeiros tubos da diluição, os outros dois tubos continham 0,9mL de salina, com a finalidade de evitar o efeito *carry-over* das medicações intracanal.

Ao final da diluição decimal seriada até a 4<sup>a</sup> diluição, alíquotas de 20 µL de cada uma das diluições foram semeadas em triplicata na superfície de placas de TSA e foram incubadas a 37°C por 48 horas em microaerofilia. A leitura dos resultados de cada placa resultou da média do número de UFC das três áreas de crescimento bacteriano, sempre na diluição da amostra que cresce menos com número entre 5 e 50 UFC/mL<sup>-1</sup>. A partir destas médias foi calculado o número de UFC/mL<sup>-1</sup> após cada um dos tempos de contato entre a suspensão das medicações intracanal e a suspensão bacteriana.

Os valores obtidos foram transformados em log, através da fórmula  $\log_{10} \text{UFC/mL}^{-1} = X$ , e submetidos ao teste estatístico ANOVA e Tukey com nível de significância de 5%.

### 3.3.2 Difusão de Íons Hidroxila

Para avaliação da liberação de íons  $\text{OH}^-$  das pastas foram utilizados 72 dentes bovinos ( $n=12$ ). As coroas dentárias foram removidas próximo à junção amelocementária mantendo um comprimento radicular de aproximadamente 15 mm. As raízes foram mantidas por 48 horas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% e posteriormente em água destilada. Os canais radiculares foram instrumentados 1 mm aquém do comprimento total da raiz até instrumento K#110 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça). O preparo do canal radicular nos terços cervical e médio foi realizado por meio de broca de Gates-Glidden número 5 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça).

A irrigação dos canais radiculares, durante todo o preparo biomecânico, foi realizada com solução de hipoclorito de sódio 2,5% (Instituto de Química, Araraquara, UNESP – Brasil). Cinco mL foram empregados no início e final do preparo e 3 mL a cada troca de instrumento. Ao final, os canais radiculares foram preenchidos com solução de EDTA 17% (Odahcam Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) por três minutos. Em seguida, foi realizada uma irrigação final com solução salina fisiológica.

As raízes foram armazenadas em um frasco contendo água destilada por 14 dias a  $37^\circ\text{C}$ , a fim de estabilizar possíveis perdas iônicas da própria estrutura dental. Após este período, cavidade de 4 mm de comprimento, 2 mm de largura e 0,5 mm de profundidade foi confeccionada na superfície radicular proximal, entre 5 e 9 mm do ápice com fresa diamantada nº 1052 (KG Sorensen Ind. e Com. Ltda, São Paulo, Brasil). Esta cavidade foi realizada em todos os espécimes para padronizar a superfície e espessura da dentina exposta ao meio externo. Em seguida, a abertura coronária e a superfície externa radicular foram impermeabilizadas com uma camada de adesivo epóxi (Brascola, Joinville, SC, Brasil), complementado por uma camada de esmalte para unhas, exceto na área de preparo da cavidade. O fechamento total só ocorreu somente depois do preenchimento do canal com a maedicação. Os dentes do grupo controle negativo receberam impermeabilização total, incluindo a área da cavidade. O outro grupo controle não continha

medicação. Os espécimes foram mensurados e radiografados para garantir uma mesma espessura de dentina entre a parede da cavidade e o canal radicular.

As pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  foram introduzidas nos canais radiculares com o auxílio de uma seringa plástica de 3 mL BD (Benton, Dickinson and Company, Juiz de Fora, MG, Brasil) com agulha 1,20x40 (Benton, Dickinson and Company, Juiz de Fora, MG, Brasil). Em seguida, as amostras foram imersas em frascos com tampa, contendo 10 mL de água destilada. Estes frascos foram tampados e levados à estufa a 37°C. Nos períodos de 1, 7, 14, 21, 30 e 60 dias, a água de cada frasco foi analisada quanto ao pH, na temperatura de 25°C. A leitura do pH foi realizada com aparelho Digimed DM-21 (Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil). Para isto, o aparelho foi calibrado previamente com substâncias tampão com os pHs conhecidos de 4, 7 e 10.

Os resultados obtidos foram registrados e submetidos à análise estatística, utilizando o teste de análise de variância ANOVA e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

### **3.4 RESULTADOS**

Os resultados do teste de Difusão em Ágar (Tabela 1) mostraram que as medicações intracanal foram efetivas sobre *E. faecalis*. A medicação HC/ZnO nano e pastas com clorexidina 0,4% apresentaram maiores halos de inibição que HC/ZnO micro ( $p < 0,05$ ). No teste de Contato Direto sobre células planctônicas de *E. faecalis*, todas as pastas avaliadas eliminaram completamente o *E. faecalis* com tempo de contato de 1 minuto. Para o tempo de contato de 30 segundos, somente as pastas com clorexidina na formulação eliminaram completamente o *E. faecalis*. As demais pastas apresentaram redução quando comparadas ao grupo controle (Tabela 2).

Tabela 1 - Valores dos halos de inibição em Difusão em Ágar frente ao *E.faecalis*

Medicação Intracanal	Média de valores dos halos (mm)
1) Hidróxido de cálcio/ óxido de zinco microparticulados	8,64 <sup>b</sup>
2) Hidróxido de cálcio/ óxido de zinco nanoparticulados	11,00 <sup>a,b</sup>
3) Hidróxido de cálcio/ óxido de zinco microparticulado + Clorexidina a 0,4%;	18,83 <sup>a,b</sup>
4) Hidróxido de cálcio/ óxido de zinco nanoparticulados + Clorexidina a 0,4%	18,52 <sup>a,b</sup>
5) Grupo controle: solução de Clorexidina 2%	26,08 <sup>a</sup>

\*letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística (p<0,05)

Tabela 2- Resultados em log10 do Teste de Contato Direto das suspensões das medicações intracanal sobre *E.faecalis* com tempos de contato de 30 segundos e 1 minuto.

Medicação Intracanal	Valores de UFC/mL em Log10 após 30 seg de contato	Valores de UFC/mL em Log10 após 1 min de contato
1) Hidróxido de cálcio/ óxido de zinco microparticulados	4,00 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
2) Hidróxido de cálcio/ óxido de zinco nanoparticulados	3,72 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
3) Hidróxido de cálcio/ óxido de zinco microparticulado + Clorexidina a 0,4%;	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>
4) Hidróxido de cálcio/ óxido de zinco nanoparticulados + Clorexidina a 0,4%	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>
5) Salina	7,69 <sup>a</sup>	7,58 <sup>a</sup>

\*letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística (p<0,05)

Os dados obtidos no estudo de difusão de íons hidroxila pela dentina bovina (Tabela 3) mostraram que todas as medicações estudadas aumentaram o pH da superfície externa radicular. As medicações nanoparticuladas apresentaram maior pH após 1 e 7 dias em relação às demais pastas ( $p < 0,05$ ). Nos demais períodos houve aumento de pH de maneira similar entre os diferentes grupos experimentais.

TABELA 3- Comparação dos valores de pH das medicações em diferentes períodos (Médias e desvios-padrão).

Período	Medicações intracanal				
	Ca(OH) <sub>2</sub> /Zn O Micro	Ca(OH) <sub>2</sub> /Zn O Nano	Ca(OH) <sub>2</sub> /Zn O Micro+ Clorexidina	Ca(OH) <sub>2</sub> /Z nO Nano + Clorexidina	Controle
1 dia	7.11(0.09) <sup>b</sup>	7.38(0.14) <sup>a</sup>	7.09(0.07) <sup>b</sup>	7.49(0.08) <sup>a</sup>	6.41(0.13) <sup>c</sup>
7 dias	7.16(0.13) <sup>b</sup>	7.39(0.14) <sup>a</sup>	7.01(0.31) <sup>b</sup>	7.42(0.07) <sup>a</sup>	6.38(0.10) <sup>c</sup>
14 dias	7.56(0.35) <sup>a</sup>	7.82(0.40) <sup>a</sup>	7.57(0.28) <sup>a</sup>	7.82(0.34) <sup>a</sup>	6.42(0.12) <sup>b</sup>
21 dias	7.76(0.39) <sup>a</sup>	7.64(0.50) <sup>a</sup>	7.85(0.60) <sup>a</sup>	7.61(0.27) <sup>a</sup>	6.43(0.15) <sup>b</sup>
30 dias	7.84(0.27) <sup>a</sup>	7.73(0.22) <sup>a</sup>	7.89(0.22) <sup>a</sup>	7.74(0.33) <sup>a</sup>	6.48(0.24) <sup>b</sup>
60 dias	8.31 (0.36) <sup>a</sup>	8.13(0.35) <sup>a</sup>	8.18(0.27) <sup>a</sup>	8.04(0.25) <sup>a</sup>	6.76(0.24) <sup>b</sup>

\*letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística ( $p < 0,05$ )

### 3.5 DISCUSSÃO

Dentes bovinos foram utilizados para avaliação da difusão de íons hidroxila pela dentina. Camargo et al. [27], em 2006, verificaram que dentes humanos e bovinos são semelhantes para realização de análises de pH. Os resultados do presente estudo por meio da dissociação iônica através da dentina bovina mostram que medicações com substâncias nanoparticuladas

promoveram maior alcalinização do meio externo da raiz nos períodos menores de avaliação (1 e 7 dias).

Os íons hidroxila devem promover o pH alcalino, sobrepondo o efeito tampão da dentina [28, 29], e desta foram atingir a superfície externa radicular. As substâncias nanoparticuladas favoreceram a difusão mais rápida dos íons hidroxila provavelmente por permitir uma alta concentração de partículas por volume, determinando uma elevada disponibilidade de íons hidroxila e favorecendo a penetração nos túbulos dentinários, aumentando o pH do meio externo da superfície radicular em menor tempo[30]. Komabayashi et al. [31], em 2009, descreveram as dimensões das partículas de hidróxido de cálcio microparticulado a possibilidade de penetração direta da partícula de hidróxido de cálcio nos túbulos dentinários. As nanopartículas que foram utilizadas neste estudo apresentam dimensão entre 100 a 200 Nm, cerca de 1000 vezes menores que a micropartícula de hidróxido de cálcio. Desta forma, as nanopartículas favoreceram a alcalinização mais rápida da dentina.

Aos 14 dias e nos períodos maiores (até 60 dias), todas as pastas de hidróxido de cálcio foram semelhantes, com potencial de alcalinização, independente do tamanho de partícula e da associação à clorexidina. Estes resultados concordam com Duarte et al. [32] (2009), que verificaram em estudo *in vitro* que pastas à base de hidróxido de cálcio e clorexidina promovem liberação de íons cálcio e hidroxila nos períodos estudados.

O veículo utilizado na composição da pasta influencia na sua dissociação em íons hidroxila e íons cálcio. O polietilenoglicol 400, usado no presente estudo, permite a dissociação progressiva do hidróxido de cálcio, mesmo em períodos maiores [33, 34]. Freire et al. [3] (2010) mostraram pH elevado para pastas de hidróxido de cálcio associadas ao polietilenoglicol e/ou clorexidina mesmo na presença de dentina pelo período de 21 dias, concordando com resultados do presente estudo.

O hidróxido de cálcio apresenta dificuldade de atuação no *E. faecalis*. Este micro-organismo é comumente encontrado em lesões periapicais e apresenta capacidade de sobreviver às adversidades do meio, incluindo deficiência de nutrientes [35- 37]. A associação do hidróxido de cálcio à clorexidina aumenta a sua propriedade antibacteriana frente ao *E. faecalis* sem

comprometer a alcalinidade do meio [38, 39]. Estes fatos também foram observados no presente estudo.

Alguns fatores podem interferir nos resultados do teste de difusão em Ágar, como o tipo de meio de cultura utilizado, o tamanho, a difundibilidade, a solubilidade da partícula avaliada. No presente estudo, os grupos que continham apenas hidróxido de cálcio e óxido de zinco foram os que apresentaram menores valores de halo de inibição. Entretanto, a associação hidróxido de cálcio/óxido de zinco tanto microparticulado quanto nanoparticulado com a clorexidina 0,4% apresentou maior halo de inibição do crescimento de *E. faecalis*. Estes resultados podem estar relacionados à atividade antibacteriana e a melhor capacidade de difusão da clorexidina no meio Agar. Evans et al. [40], estudando o mecanismo de resistência de *E. faecalis* ao hidróxido de cálcio em dentina bovina, verificaram que o micro-organismo se torna sensível frente a associação do hidróxido de cálcio com clorexidina. A clorexidina necessita de curto tempo para desempenhar sua ação antibacteriana sobre *E. faecalis* devido ao seu mecanismo de ação [41]. Sua molécula catiônica interage com a carga negativa dos grupos fosfatos presentes na membrana celular bacteriana, ocasionando dano ao metabolismo e conseqüentemente morte bacteriana [42].

De um modo geral, as nanopartículas de hidróxido de cálcio e óxido de zinco proporcionaram pastas com maior potencial de alcalinização nos períodos menores (até uma semana). Porém, a atuação das pastas sobre *E. faecalis* mostrou ser favorecida pela associação com clorexidina.

### 3.6 REFERÊNCIAS

1. Andreasen J, Jensen L, Christensen SSA (2006) Relationship between calcium hydroxide Ph levels in the root canals and periodontal healing after replantation of avulsed teeth. *Endod Top* 14: 93-101.
2. Sirén EK, Kerosuo E, Lavonius E, Meurman JH, Haapasalo M (2014) Ca(OH)<sub>2</sub> application modes: in vitro alkalinity and clinical effect on bacteria. *Intl Endod J* 47(7): 628–638.
3. Freire LG, Carvalho CN, Ferrari PH, Siqueira EL, Gavini G (2010) Influence of dentin on pH of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone or in combination. *Dent Traumatol* 26(3): 276-80.
4. Tanomaru-Filho M, Saçaki JN, Faleiros FB, Guerreiro-Tanomaru JM (2011) pH and calcium ion release evaluation of pure and calcium hydroxide-containing Epiphany for use in retrograde filling. *J Appl Oral Sci* 19(1): 1-5.
5. dos Santos LGP, Felipe WT, Teixeira CS, Bortoluzzi EA, Felipe MCS (2014) Endodontic re-instrumentation enhances hydroxyl ion diffusion through radicular dentine. *Int Endod J* 47(8): 776–783.
6. Zmener O, Pameijer CH, Banegas G (2007) An in vitro study of the pH of three calcium hydroxide dressing materials. *Dent Traumat* 23: 21-5.
7. Turkün M, Cengiz T (1997) The effects of sodium hypochlorite and calcium hydroxide on tissue dissolution and root canal cleanliness. *Int Endod J* 30: 335-42.
8. Mizuno M & Banzai Y (2008) Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. *Int Endod J* 41(11): 933-8.
9. Tanamoru JMG, Leonardo MR, Tanamoru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LAB (2003) Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J* 36: 733-9.
10. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BP (2008) Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol.* 23(4): 282-90.

11. Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S (2008) Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 23(5): 384-90.
12. Mozayeni MA, Haeri A, Dianat O, Jafari AR (2014) Antimicrobial effects of four intracanal medicaments on enterococcus faecalis: an in vitro study. *Iran Endod J* 9(3): 195-8
13. Wilson CE, Cathro PC, Rogers AH, Briggs N, Zilm PS (2014) Clonal diversity in biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in response to environmental stress associated with endodontic irrigants and medicaments. *Intl Endod J* 2014. Early View.
14. Tenner C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, Hellwig E, Al-Ahmad A (2014) New Bacterial Composition in Primary and Persistent/Secondary Endodontic Infections with Respect to Clinical and Radiographic Findings. *J Endod* 40(5): 670-677
15. Baik JE, Ryu H, Han JY, Im J, Kum K, Yun C, et al. (2008) Lipoteichoic acid partially contributes to the inflammatory responses to *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 34(8): 975-82.
16. Lee J-K, Baik JE, Yun C-H, Lee K, Han H, Lee W, et al. (2009) Chlorhexidine gluconate attenuates the ability of lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* to stimulate toll-like receptor 2. *J Endod.* 35(2): 212-5.
17. Lima RKP, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M (2012) Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 45: 311–316.
18. Nagata JY, Soares AJ, Souza-Filho FJ, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP (2014) Microbial evaluation of traumatized teeth treated with triple antibiotic paste or calcium hydroxide with 2% chlorhexidine gel in pulp revascularization. *J Endod* 40(6): 778-83.
19. Aguilar FG, Garcia Lda F, Rossetto HL, Pardini LC, Pires-de-Souza Fde C (2011) Radiopacity evaluation of calcium aluminate cement containing different radiopacifying agents. *J Endod* 37(1) :67-71.
20. Camilleri J, Gandolfi MG (2010) Evaluation of the radiopacity of calcium silicate cements containing different radiopacifiers. *Int Endod J* 43: 21–30.

21. Pelgrift RY, Friedman AJ (2013) Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Rev* 65(13): 1803-1815.
22. Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG (2008) An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *J Endod* 34: 1515-20.
23. Shrestha A, Shi Z, Neoh KG, Kishen A (2010) Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *J Endod* 36: 1030–1035
24. Gómez-Ortiz N, De la Rosa-García S, González-Gómez W, Soria-Castro M, Quintana P, Oskam G, Ortega-Morales B (2013) Antifungal coatings based on Ca(OH)<sub>2</sub> mixed with ZnO/TiO<sub>2</sub> nanomaterials for protection of limestone monuments. *ACS Appl Mater Interfaces* 5(5): 1556-65.
25. Palanikumar L, Ramasamy SN, Balachandran C (2014) Size-dependent antimicrobial response of zinc oxide nanoparticles. *IET Nanobiotechnol* 8(2): 111-7.
26. Reddy LS, Nisha MM, Joice M, Shilpa PN (2014) Antimicrobial activity of zinc oxide (ZnO) nanoparticle against *Klebsiella pneumoniae*. *Pharm Biol* 15: 1-10.
27. Camargo CHR, Bernardineli N, Valera MC (2006) Vehicle influence on calcium hydroxide pastes diffusion in human and bovine teeth. *Dent Traumatol* 22: 302–6.
28. Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TMT, Orstavik D, Haapasalo MPP (2000) Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J* 33: 126–31.
29. Ardeshtna SM, Qualtrough AJE, Worthington HV (2002) An in vitro comparison of pH changes in root dentine following canal dressing with calcium hydroxide points and a conventional calcium hydroxide paste. *Intl Endod J* 35(3): 239–244.
30. Mohn D, Zehnder M, Imfeld T, Stark WJ (2010) Radio-opaque bioactive glass for potential root canal application: evaluation of radiopacity, bioactivity and alkaline capacity. *Int Endod J* 43: 210–217. Brändle N, Zehnder M, Weiger R, Waltimo T (2008) Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. *J Endod* 34(5): 579-82.
31. Komabayashi T, D'souza RN, Dechow PC, Safavi KE, Spångberg LSW (2009) Particle Size and Shape of Calcium Hydroxide. *Journal of Endodontics* 35(2): 284-287.

32. Duarte MA, Midea RZ, Zeferino MA, Vivan RR, Weckwerth PH, Dos Santos F, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M (2009) Evaluation of pH and calcium ion release of calcium hydroxide pastes containing different substances. *J Endod* 35(9): 1274-7.
33. Guerreiro-Tanomaru JM, Chula DG, de Pontes Lima RK, Berbert FL, Tanomaru-Filho M (2012) Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. *Dent Traumatol*. 28(4): 320-3.
34. Ximenes M, Cardoso M (2012) Assessment of diffusion of hydroxyl and calcium ions of root canal filling materials in primary teeth. *Pediatr Dent* 34(2): 122-6.
35. Poptani B, Sharaff M, Archana G, Parekh V (2013) Detection of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in previously root-filled teeth in a population of Gujarat with polymerase chain reaction. *Contemp Clin Dent* 4(1): 62-6.
36. Brändle N, Zehnder M, Weiger R, Waltimo T (2008) Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. *J Endod* 34(5): 579-82.
37. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK (2005) Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J* 38(10): 735-42.
38. Mohammadi Z, Shalavi S (2012) Is chlorhexidine an ideal vehicle for calcium hydroxide? A microbiologic review. *Iran Endod J* 7(3): 115-22.
39. Sirén EK, Haapasalo MP, Waltimo TM, Ørstavik D (2004) In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci* 326–331.
40. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D (2002) Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide *Int Endod J* 35: 221–228.
41. Zaugg LK, Zitzmann NU, Hauser-Gerspach I, Waltimo T, Weiger R, Krastl G (2014) Antimicrobial activity of short- and medium-term applications of polyhexamethylene biguanide, chlorhexidine digluconate and calcium hydroxide in infected immature bovine teeth in vitro. *Dent Traumatol* 30(4): 326-31.
42. Mohammadi Z, Abbot V (2009) The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J* 42(4): 288-302.

## *4 Capítulo 2*

**\* pH e atividade antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* de medicações à base de hidróxido de cálcio e óxido de zinco micro ou nanoparticulados associados a clorexidina**

\*Artigo nas normas para publicação na International Endodontic Journal.

#### 4.1 RESUMO

**Objetivo:** Avaliar atividade antibacteriana frente *Enterococcus faecalis* e pH de medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio (HC)/ óxido de zinco (ZnO) microparticulados (micro) ou nanoparticulados (nano) associados ou não à clorexidina (CLX) 0,4%.

**Metodologia:** Canais radiculares de sessenta dentes unirradiculados humanos foram preparados, inoculados com *E. faecalis* (ATCC 29212) e incubados por 21 dias. Os espécimes foram distribuídos (n=10) de acordo com a medicação intracanal: HC/ZnO micro; HC/ZnO nano; HC/ZnO micro + Clorexidina a 0,4%; HC/ZnO nano + Clorexidina a 0,4%. No grupo controle os canais radiculares permaneceram sem medicação. Após coleta microbiológica inicial, os canais radiculares foram preenchidos com as medicações por 7 dias. Novas coletas microbianas foram realizadas imediatamente após remoção da medicação e depois de 7 dias. Foi utilizada a técnica de contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL<sup>-1</sup>). O pH foi mensurado após imersão de tubos de polietileno preenchidos com as medicações em 10 mL de água, nos períodos: 3, 7, 14 e 28 dias. Os dados obtidos foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey com nível de significância de 5%.

**Resultados:** Todas as medicações intracanal promoveram eliminação de *E. faecalis* logo após a remoção da medicação. No entanto, aumento dos valores de UFC/mL<sup>-1</sup> foi observado após 5 dias da remoção da medicação. As medicações com clorexidina apresentaram maior redução bacteriana ( $p < 0,05$ ). Todas as pastas promoveram aumento do pH de forma similar ( $p > 0,05$ ).

**Conclusão:** As medicações que associam hidróxido de cálcio e óxido de zinco micro ou nanoparticulados à clorexidina promoveram maior redução de *E. faecalis* do sistema de canais radiculares mantendo o pH elevado em todas formulações.

**Palavras-chaves:** Antibacteriana, clorexidina, hidróxido de cálcio, nanopartículas, óxido de zinco e pH.

## 4.2 INTRODUÇÃO

O hidróxido de cálcio é utilizado como medicação em dentes com necrose pulpar com o objetivo de promover redução dos micro-organismos do canal principal, istmos, ramificações apicais e túbulos dentinários, favorecendo o sucesso do tratamento endodôntico (Sheehy e Roberts 1997; Javidi et al., 2011; Vera et al., 2012). O hidróxido de cálcio apresenta ampla ação antimicrobiana devido a dissociação em íons  $\text{Ca}^+$  e  $\text{OH}^-$ , promovendo pH alcalino e interação com a parede celular dos micro-organismos, além de inativar subprodutos bacterianos como endotoxinas (Tanomaru et al., 2003; Mohammadi 2011; dos Santos et al., 2014).

Algumas substâncias nanoparticuladas estão sendo adicionadas a medicações intracanaís e cimentos endodônticos. As nanopartículas podem aumentar a liberação de íons e a atividade antibacteriana por possuírem maiores ligações de sítio ativo de superfície (Sepulveda et al., 2002; Kishen et al., 2008; Gomes et al., 2011). O óxido de zinco nanoparticulado aplicado sobre a superfície dentinária pode inibir a formação de biofilme e a re-colonização bacteriana (Kishen et al., 2008). Até o momento não há relatos de estudos de nanopartículas de hidróxido de cálcio e óxido de zinco para Endodontia. Entretanto, esta composição já é aplicada em outras áreas, como a Construção Civil. A associação de hidróxido de cálcio com óxido de zinco nanoparticulado é utilizado na preservação de monumentos de pedra calcária por desempenhar atividade antimicrobiana (Gómez-Ortiz et al., 2013).

A associação do hidróxido de cálcio à clorexidina é indicada em infecções primárias e secundárias, com o objetivo de aumentar a atividade antimicrobiana sobre micro-organismos resistentes ao mecanismo de ação do hidróxido de cálcio, como *E. faecalis* (Ercan et al., 2006; Athanassiadis et al., 2007; Mohammadi e Abbott, 2009; Lima et al., 2012). Mohammadi et al. (2012) constataram que a associação do hidróxido de cálcio à clorexidina aumenta sua ação antibacteriana sobre *E. faecalis*. Delgado et al. (2010) verificaram em dentes unirradiculados contaminados por *E. faecalis* que a associação de hidróxido de cálcio e clorexidina 2% foi mais efetiva quando comparada com uso somente de hidróxido de cálcio.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar pH e propriedade antibacteriana de nanopartículas de hidróxido de cálcio e óxido de zinco associados ou não à clorexidina 0,4% sobre *E. faecalis*. A hipótese nula é a que o emprego de substâncias nanoparticuladas e associação com clorexidina não promovam ação sobre *E. faecali* superior as formulações de microparticulas.

#### **4.3 MATERIAL E MÉTODO**

Foram avaliadas 4 medicações intracanal:

- Hidróxido de cálcio (Merck, New Jersey, USA) / óxido de zinco (Merck, New Jersey, USA) microparticulados.

- Hidróxido de cálcio / óxido de zinco nanoparticulados (Instituto de Física, USP, São Carlos, Brasil).

- Hidróxido de cálcio / óxido de zinco microparticulado + Clorexidina a 0,4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

- Hidróxido de cálcio / óxido de zinco nanoparticulados + Clorexidina a 0,4%.

As nanopartículas utilizadas apresentavam 100-200 Nm em estado sólido. A proporção entre os componentes para preparo das medicações seguiu a proporção: 2,5 g de hidróxido de cálcio para 0,5 g de óxido de zinco para 2,0 mL de polietilenoglicol 400 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Para os grupos que associavam a clorexidina, inicialmente era manipulada a pasta de hidróxido de cálcio/óxido de zinco que ao ser pesada em balança de precisão era calculado seu volume e adicionada a clorexidina até que a concentração final na pasta fosse de 0,4%.

##### **4.3.1 Teste em canais radiculares de dentes humanos**

###### *Preparo dos espécimes*

Foram utilizados 60 dentes humanos unirradiculados do Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, aprovado pelo Comitê de Ética (Anexo). Os dentes selecionados apresentavam canal radicular único e anatomia radicular similar. Os dentes foram radiografados para comprovação da presença de canal radicular único e reto. As coroas dentais foram seccionadas com disco diamantado em máquina de corte Isomet (Buehler, Ontario, Canadá), padronizando o comprimento radicular em 15 mm.

O preparo inicial dos canais radiculares foi realizado 0,5 mm além do forame apical até a lima K #25 para padronização do diâmetro foraminal. A irrigação foi realizada com 3 mL de solução salina a cada troca de instrumento. Em seguida, o canal radicular foi preparado 1 mm aquém do forame apical até lima K #50. A irrigação foi realizada com 2 mL de NaOCl a 1%, a cada troca de instrumento, com seringa plástica e agulha Endo-Eze Tips 30 G (Ultradent, Indaiatuba, Brasil). Após o preparo, os canais radiculares foram inundados com solução de EDTA 17% por 3 minutos e receberam irrigação final com 5 mL de solução salina fisiológica. Os espécimes foram imersos em água destilada para remoção de NaOCl durante 5 dias.

Os canais foram secos com pontas de papel absorvente de diâmetro 50 e o selamento da região apical foi realizado com resina composta fotopolimerizável. As superfícies radiculares foram impermeabilizadas com duas camadas de adesivo epóxi (Brascola, Joinville, SC, Brasil), exceto a região cervical de entrada do canal. Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente nas placas de cultura celular de 24 poços, com 12 raízes em cada placa e fixados com resina acrílica. Em seguida, foram encaminhadas para esterilização por óxido de etileno.

#### Contaminação dos espécimes

Os canais radiculares foram contaminados com 20 L de suspensões de *E. faecalis* (ATCC 29212) de  $1 \times 10^8$  UFC/mL<sup>-1</sup>, diluídas em meio *Tryptic Soy Broth* - TSb (Difco, Detroit, MI, EUA). Os espécimes foram mantidos em estufa a 37°C, por 21 dias. A cada 2 dias, foi adicionado meio de cultura esterilizado (TSb) no interior dos canais radiculares.

Após o período de contaminação, foi realizada a coleta inicial (C1) dos canais radiculares para confirmação da contaminação dos canais radiculares. Além das medicações intracanaís em estudo, foi realizado controle negativo, que recebeu meio de cultura esterilizado nos canais radiculares, para confirmação da esterilização. Outro controle foi realizado em que os canais radiculares não receberam medicação intracanal, confirmando a viabilidade bacteriana durante o experimento.

#### Coleta e análise microbiológica

Os canais radiculares foram preenchidos com solução salina fisiológica esterilizada e em seguida foram introduzidas duas pontas de papel absorvente esterilizadas # 50, mantidas no canal radicular por 1 minuto. Em seguida, as pontas de papel foram inseridas em tubos de polietileno contendo 1mL de salina estéril. Para realização da análise microbiológica, os tubos de polietileno foram agitados em vortex por 1 minuto. A seguir, foram realizadas diluições decimais seriadas e alíquotas de 20 µL foram semeadas, em triplicata, em placas de Petri, contendo Tryptic Soy Ágar (TSA-Difco). As placas foram incubadas em microaerofilia a 37°C por 48 horas. O crescimento microbiano foi determinado pela contagem do número de unidades formadoras de colônia-UFCmL<sup>-1</sup>.

Depois da coleta de inicial (C1), os canais radiculares receberam repasse dos instrumentos K #25 até o forame apical e, em seguida do instrumento K #50, no comprimento de trabalho. A irrigação foi realizada com solução salina esterilizada. Os canais foram inundados com solução de EDTA 17%, por 3 minutos, e novamente irrigados com 5 mL de solução salina fisiológica esterilizada. Após secagem com pontas de papel esterilizadas #50, os canais radiculares foram preenchidos com as medicações em estudo.

As medicações foram colocadas no interior dos canais radiculares por meio de broca lântulo (Dentsply Maillefer, Balaigues, Swiss). Em seguida, uma mecha de algodão esterilizada foi colocada nas entradas dos canais radiculares e as raízes foram incubadas a 37°C em microaerofilia, por 7 dias. Após os 7 dias, a medicação intracanal foi removida e uma nova coleta realizada (C2 – coleta pós-curativo). Para esta coleta, a medicação foi removida com instrumento K #50, e

irrigação foi realizada com 10 mL de solução salina fisiológica esterilizada. Em seguida, foi realizada irrigação com 1 mL de neutralizante específico para cada medicamento para evitar ação residual das medicações. Para clorexidina foi empregado tween 80 e lecitina de soja. Para o hidróxido de cálcio foi usado ácido cítrico 0,5%. Após irrigação com 1 mL de solução salina fisiológica esterilizada foram coletados 2 cones de papel de cada espécime. Os procedimentos foram realizados de maneira similar ao descrito para a C1. Após a C2, os canais radiculares foram preenchidos com solução salina esterilizada e uma mecha de algodão estéril foi colocada na entrada do canal radicular. Os espécimes foram incubados em microaerofilia a 37°C por mais 7 dias.

Decorridos 7 dias da C2, foi realizada a coleta final (C3) da mesma forma que as duas anteriores. Os valores obtidos foram transformados em log, por meio da fórmula  $\log_{10} \text{UFC/mL}^{-1} = X$ , e submetidos ao teste estatístico ANOVA e Tukey com nível de significância de 5%.

#### **4.3.2 Determinação do pH**

As medicações foram inseridas em tubos de polietileno medindo 1 cm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro interno. Em seguida, foram imersos em frascos plásticos contendo 10 ml de água destilada. Os frascos foram fechados e mantidos em estufa a 37 °C. Depois de 3 dias de imersão, os tubos foram removidos e colocados em novos frascos com 10 ml de água destilada. A solução resultante de cada frasco foi empregada para determinar o pH e o procedimento foi repetido nos períodos de 7, 14 e 28 dias.

O pH da solução foi determinado com o pHmetro Digimed DM-21 (Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil). Esse aparelho foi calibrado previamente com soluções tampões com os pH de 4, 7 e 10. Estes mesmos tampões foram utilizados para verificar a calibragem do aparelho durante todo o experimento. As medições de pH foram realizadas a uma temperatura ambiente de 25 °C. Os dados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA e Tukey com nível de significância de 5%.

#### **4.4 RESULTADOS**

A coleta inicial demonstrou que as medicações intracanal foram efetivas na eliminação de *E. faecalis*. Entretanto, as bactérias remanescentes no sistema de canais radiculares proporcionaram uma recontaminação do canal principal após 7 dias da remoção da medicação, conforme observado na 3ª coleta. Nesta coleta a maior efetividade antimicrobiana no sistema de canais radiculares ocorreu para as medicações que associam a clorexidina 0,4% (Tabela 1).

Todas as medicações avaliadas promoveram aumento do pH de forma similar durante todos os períodos, com pH maior que o controle sem medicação ( $p < 0,05$ ) conforme demonstra a Tabela 2.

Tabela 1- Comparação das médias de valores de UFC/mL, (desvio- padrão), das medicações em diferentes períodos frente ao *E. faecalis*.

Período	Medicação intracanal				
	Ca(OH) <sub>2</sub> /ZnO Micro	Ca(OH) <sub>2</sub> /ZnO Nano	Ca(OH) <sub>2</sub> /ZnO Micro+ Clorexidina	Ca(OH) <sub>2</sub> /ZnO Nano + Clorexidina	Controle (sem Medicação intracanal)
Coleta inicial	6.31 <sup>a</sup> (0.28)	6.54 <sup>a</sup> (0.27)	6.31 <sup>a</sup> (0.32)	6.35 <sup>a</sup> (0.26)	6.35 <sup>a</sup> (0.21)
7 dias de Medicação intracanal	0.0 <sup>a</sup> (0.00)	0.0 <sup>a</sup> (0.00)	0.0 <sup>a</sup> (0.00)	0.0 <sup>a</sup> (0.00)	6.57 <sup>b</sup> (0.00)
7 dias após remoção da Medicação intracanal	2.20 <sup>a</sup> (0.23)	2.15 <sup>a</sup> (0.23)	1.81 <sup>b</sup> (0.19)	1.86 <sup>b</sup> (0.18)	6.91 <sup>c</sup> (0.20)

\*As letras representam diferenças estatísticas entre os grupos de mesmos períodos.

Tabela 2- Comparação das médias de valores de pH, (desvio- padrão), das medicações em diferentes períodos.

Período	Medicação intracanal				
	Ca(OH) <sub>2</sub> /ZnO Micro	Ca(OH) <sub>2</sub> /ZnO Nano	Ca(OH) <sub>2</sub> /ZnO Micro+ Clorexidina	Ca(OH) <sub>2</sub> /ZnO Nano + Clorexidina	Controle (sem Medicação)
3 dias	10.22 <sup>a</sup> (0.56)	10.63 <sup>a</sup> (0.51)	10.55 <sup>a</sup> (0.35)	10.70 <sup>a</sup> (0.13)	6.72 <sup>b</sup> (0.23)
7 dias	10.87 <sup>a</sup> (0.35)	10.70 <sup>a</sup> (0.21)	10.94 <sup>a</sup> (0.17)	10.71 <sup>a</sup> (0.14)	6.79 <sup>b</sup> (0.31)
14 dias	11.08 <sup>a</sup> (0.13)	10.93 <sup>a</sup> (0.22)	11.08 <sup>a</sup> (0.03)	10.96 <sup>a</sup> (0.07)	6.97 <sup>b</sup> (0.21)
28 dias	11.05 <sup>a</sup> (0.17)	10.91 <sup>a</sup> (0.25)	11.07 <sup>a</sup> (0.26)	11.00 <sup>a</sup> (0.08)	6.80 <sup>b</sup> (0.12)

\*As letras representam diferenças estatísticas entre os grupos de mesmos períodos.

#### 4.5 DISCUSSÃO

A utilização da medicação intracanal entre sessões visa atuação sobre micro-organismos remanescentes após o preparo biomecânico. O hidróxido de cálcio promove a destruição da membrana citoplasmática bacteriana, desnaturação das proteínas e destruição do DNA microbiano em função de seu elevado pH (Estrela et al., 1998; Siqueira e Lopes, 1999; Mohammadi et al, 2012).

A avaliação do pH demonstra a liberação de íons hidroxila que proporciona a alcalinização do meio, fundamental para o mecanismo antibacteriano do hidróxido de cálcio (Guerreiro-Tanomaru et al., 2012). O tamanho das partículas (micro ou nanoparticuladas) não interferiu nos valores de pH até 28 dias, uma vez que a ação das medicações à base de hidróxido de cálcio/óxido de zinco microparticulados e nanoparticulados foram similares. Da mesma forma, a presença da clorexidina não diminuiu o poder de dissociação do hidróxido de cálcio mantendo a alcalinidade do meio concordando com Duarte et al. (2009).

O biofilme de *E. faecalis* induzido em canais radiculares por 21 dias permite propagação dos micro-organismos pelos túbulos dentinários e sistema de canais radiculares. Desta forma, esta

metodologia permite a avaliação da ação antibacteriana das medicações frente aos micro-organismos no sistema de canais radiculares (Lima et al., 2012). As medicações estudadas foram efetivas na eliminação do *E. faecalis* do canal principal conforme demonstrado imediatamente após a sua remoção. Entretanto, a eliminação de *E. faecalis* do sistema de canais radiculares foi parcial, uma vez que a recolonização do canal principal radicular foi observada após 5 dias de remoção da medicação. O menor número de UFC/mL nas medicações associadas à clorexidina ( $p < 0,05$ ) foi demonstrado em comparação às medicações sem associação com clorexidina.

de Lucena et al. (2013) verificaram em canais radiculares contaminados por *E. faecalis* pelo período de 8 semanas, por meio da contagem de UFC/mL e da porcentagem de viabilidade bacteriana pela microscopia fluorescente, que o hidróxido de cálcio não foi eficaz na eliminação e ainda teve aumentada a porcentagem de viabilidade bacteriana (PVB) de 26,3 % para 55,8 % durante o estudo. Entretanto, a clorexidina foi eficaz com redução de 40% na PVB.

Estudos comprovam que a associação do hidróxido de cálcio à clorexidina aumenta a ação antimicrobiana reduzindo o tempo necessário quando comparada ao uso somente do hidróxido de cálcio frente a fungos e bactérias resistentes colonizadoras do sistema de canais radiculares (Gomes et al., 2003; Ercan et al., 2006; Silveira et al., 2011; Lima et al., 2012; Delgado et al., 2013).

Os resultados do presente estudo demonstram que a associação com a clorexidina favorece a atividade antibacteriana do hidróxido de cálcio sobre *E. faecalis*. Estes resultados podem estar relacionados com a diminuição da adesão de *E. faecalis* à dentina (Love, 2001; Chivatxaranukul et al., 2008) e à sua sensibilidade à clorexidina (Jhamb et al., 2010; Lima et al., 2012; de Lucena et al., 2013; Wilson et al., 2014).

A interação eletrostática entre as nanopartículas carregadas positivamente e células bacterianas carregadas negativamente tem sido associado ao aumento da permeabilidade da membrana e perda da função da membrana bacteriana (Stohs et al., 1995; Rabea et al., 2003). Sheresta et al. (2010) avaliaram nanopartículas de óxido de zinco e quitosano, frente ao biofilme de *E. faecalis*, e observaram que o óxido de zinco conseguiu reduzir e desestruturar o biofilme, sendo sua eficiência dependente da concentração e do tempo de interação. O óxido de zinco esteve presente na

composição das pastas utilizadas neste estudo pelas propriedades radiopacificadora e antibacteriana. Leonardo et al. (2000) verificaram atividade antibacteriana de pasta de óxido de zinco. Nayaranam et al. (2012) constataram que a atividade antibacteriana de óxido de zinco nanoparticulado é proporcional a sua concentração. No entanto, os resultados do presente estudo não demonstraram maior efeito antimicrobiano das nanopartículas em relação às substâncias convencionais. Estudos adicionais com diferentes concentrações podem ser sugeridos para complementar os resultados deste estudo.

Menor número de micro-organismo após tratamento endodôntico está diretamente relacionado ao reparo periapical. Ricucci et al. (2009) analisaram 51 dentes extraídos tratados endodonticamente e observaram que os casos que permaneciam com sinais de inflamação apresentavam grande número de micro-organismos na região apical radicular. A avaliação aqui realizada após 5 dias da remoção da medicação intracanal demonstra que *E. faecalis* foi capaz de proliferar e recolonizar o canal a partir do sistema de canais radiculares. No entanto, as medicações que apresentavam hidróxido de cálcio/ óxido de zinco associado à clorexidina 0,4% foram as mais efetivas contra o biofilme de *E. faecalis* presente no sistema de canais radiculares.

#### 4.6 REFERÊNCIAS

Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ (2007) The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J* 52, S64–82.

Chivatxaranukul P, Dashper SG e Messer HH (2008) Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 41, 873–882.

Cornélio ALG, Salles LP, Paz MC, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M (2011) Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod* 37(2), 203-10.

da Silva RA, Leonardo MR, da Silva LA, Faccioli LH, de Medeiros AI (2008) Effect of a calcium hydroxide-based paste associated to chlorhexidine on RAW 264.7 macrophage cell line culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106(5), e44-51.

de Lucena JMVM, Decker EM, Walter C, Boeira LS, Löst C, Weiger R (2013) Antimicrobial effectiveness of intracanal medicaments on *Enterococcus faecalis*: chlorhexidine versus octenidine. *Int Endod J* 46,53–61.

Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, Bramante CM, Campanelli AP, Bernardineli N (2010) Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis* *J Endod* 36(8), 1389-93.

Delgado RJR, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, Duarte MAH, Bramante CM, Torres SA, Garlet GP, Campanelli AP, Bernardineli N (2013) Antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on intratubular *Candida albicans*. *Int J Oral Sci* 5(1), 32–36.

dos Santos LGP, Felipe WT, Teixeira CS, Bortoluzzi EA, Felipe MCS (2014) Endodontic re-instrumentation enhances hydroxyl ion diffusion through radicular dentine. *Int Endod J* 47, 776–783.

Duarte MA, Midena RZ, Zeferino MA, Vivan RR, Weckwerth PH, Dos Santos F, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M (2009) Evaluation of pH and calcium ion release of calcium hydroxide pastes containing different substances. *J Endod* 35(9),1274-7.

Ercan E, Dalli M, Dülgergil CT (2006) In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surgery, Oral Med, Oral Pathol, Oral Rad and Endod* 102,e27–31.

Estrela C, Pécora JD, Silva RS (1998) pH analysis of vehicles and calcium hydroxide pastes. *Braz Endod J* 3, 41–47.

Evans M, Davies JK., Sundqvist G e Figdor D (2002) Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 35, 221–228.

Faraji AH e Wipf P (2009) Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem* 2950-62.

Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC et al. (2003) Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J* 36, 267–275.

Gómez-Ortiz N, De la Rosa-García S, González-Gómez W, Soria-Castro M, Quintana P, Oskam G, Ortega-Morales B (2013) Antifungal coatings based on Ca(OH)<sub>2</sub> mixed with ZnO/TiO<sub>2</sub> nanomaterials for protection of limestone monuments. *ACS Appl Mater* 5(5),1556-65.

- Guerreiro-Tanomaru JM, Chula DG, de Pontes Lima RK, Berbert FL, Tanomaru-Filho M (2012) Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. *Dent Traumatol* 28(4),320-3.
- Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. (2004) Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol In Vitro* 18(5),703-10.
- Hamouda IM (2012) Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *J Biomed Res* 26(3),143-151.
- Javidi M, Zarei M, Afkhami F (2011) Antibacterial effect of calcium hydroxide on intraluminal and intratubular enterococcus faecalis. *Iran Endod J* 6(3),103-6.
- Jhamb S, Nikhil V , Singh V (2010) An in vitro study of antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on Enterococcus faecalis. *Ind J Dent Res* 21, 512–4.
- Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neob KG (2008) An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *J Endod* 34,1515-20.
- Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT (2008) Influence of irrigation regimens on the adherence of Enterococcus faecalis to root canal dentin. *J Endod* 34(7), 850–4.
- Leonardo MR, da Silva LA, Tanomaru Filho M, Bonifácio KC, Ito IY (2000) In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *J Endod* 26(7), 391-4.
- Lima RKP, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M (2012) Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against Enterococcus faecalis. *Int Endod J* 45, 311–316.
- Love RM (2001) *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 34, 399–405.
- Mohammadi Z, Dummer PMH (2011) Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J* 44, 697–730.
- Mohammadi Z, Shalavi S, Yazdizadeh M (2012) Antimicrobial activity of calcium hydroxide in endodontics: a review. *Chonnam Med J* 48(3), 133-40.
- Mohammadi, Z. and Abbott, P. V. (2009), The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J* 42, 288–302.

- Mohn D, Zenhnder M, Imfeld T, Stark WJ (2010) Radio-opaque bioactive glass for potential root canal application: evaluation of radiopacity, bioactivity and alkaline capacity. *Int Endod J* 43, 210–217.
- Narayanan P, Wilson W, Abraham A, Sevanan M (2012) Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles Against Human Pathogens. *BioNanoScience* 2(4), 329-335.
- Ping Xu Z, Zeng QG, Qing Lu G, Bing Yu A (2006) Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chem Eng Scien* 61, 1027-40.
- Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smaghe G, Steurbaut W (2003) Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4(6), 1457–65.
- Ricucci D, Lin LM, Spångberg LSW (2009) Wound healing of apical tissues after root canal therapy: a long-term clinical, radiographic, and histopathologic observation study. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod* 108(4), 609-621.
- Sepulveda P, Jones JR, Hench LL (2002) In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses. *J Biomed Mat Res* 61, 301–11.
- Sheehy EC e Roberts GJ (1997) Use of calcium hydroxide for apical barrier formation and healing in non-vital immature permanent teeth: a review. *Braz Dent J* 183(7), 241-6.
- Shrestha A, Zhilong S, Gee NK, Kishen A (2010) Nanoparticulates for Antibiofilm Treatment and Effect of Aging on Its Antibacterial Activity. *J Endod* 36(6), 1–6.
- Silveira CFM, Cunha RS, Fontana CE, Martin AS, Gomes BPFA, Motta RHL, Bueno CES (2011) Assessment of the Antibacterial Activity of Calcium Hydroxide Combined with Chlorhexidine Paste and Other Intracanal Medications against Bacterial Pathogens. *Eur J Dent* 5(1), 1–7.
- Siqueira JF e Jr Lopes HP (1999) Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 32, 361–369.
- Stohs SJ, Bagchi D (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18(2), 321–36.
- Tanamoru JMG, Leonardo MR, Tanamoru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LAB (2003) Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J* 36,733-9.

Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, Cruz AG (2012) One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod* 38(8),1040-52.

Wilson CE, Cathro PC, Rogers AH, Briggs N, Zilm PS (2014) Clonal diversity in biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in response to environmental stress associated with endodontic irrigants and medicaments. *Int Endod J*. Early View

Young FM, Phungtamdet W, Sanderson BJ (2005) Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS. *Toxicol In Vitro* 19(8), 1051-9.

## 5 DISCUSSÃO FINAL

O emprego de medicação intracanal durante o tratamento endodôntico promove redução significativa de micro-organismos no sistema de canais radiculares (Vianna et al.<sup>40</sup>, 2008; Lima et al.<sup>18</sup>, 2012) contribuindo para reparação periapical (Ricucci et al.<sup>32</sup>, 2009). Entretanto, poucos estudos utilizam medicações intracanal com substâncias nanoparticuladas.

Shrestha et al.<sup>36</sup> (2010) constataram que as nanopartículas de óxido de zinco e quitosana apresentam atividade antibacteriana sobre *Enterococcus faecalis*, conseguindo reduzir e desestruturar o biofilme e eliminar totalmente células planctônicas. Estas nanopartículas conseguiram manter seu efeito após 90 dias.

Mortazavi et al.<sup>25</sup> (2010) constataram que nanopartículas de vidro bioativo não apresentam citotoxicidade em fibroblasto de rato e possuem atividade bactericida/ bacteriostática de acordo com as formulações 58S, 63S e 72S sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus*. Os autores sugerem sua utilização em tratamentos de defeitos ósseos e desinfecção do canal radicular.

Kesler Shvero et al.<sup>15</sup> (2013) verificaram que nanopartículas de polietilenimina amônio quaternário 2% adicionadas a cimentos endodônticos conferem significativa e estável ação antibacteriana sobre *E.*

*faecalis* por meio de estudos de difusão em agár, contato direto e microscopia eletrônica de varredura.

Abbaszadegan et al.<sup>1</sup> (2014) verificaram que as nanopartículas de prata apresentam atividade antibacteriana sobre *E. faecalis*, são menos citotóxicas para fibroblasto quando comparadas ao hipoclorito de sódio e clorexidina e que o pó de dentina não inativa o efeito do hipoclorito de sódio e das nanopartículas de prata após 24 horas.

Javidi et al.<sup>12</sup> (2014) comprovaram que o hidróxido de cálcio associado a nanopartículas de prata promove ação antibacteriana efetiva sobre a *E. faecalis* por 1 ou 7 dias quando comparado ao hidróxido de cálcio somente, após contaminação de canais radiculares.

As micropartículas de hidróxido de cálcio conseguem se difundir pelos túbulos dentinários e elevar o pH na superfície externa da raiz (Komabayashi et al.<sup>17</sup>, 2009). Espera-se que nanopartículas de hidróxido de cálcio promovam maior difusão pelos túbulos dentinários em menor tempo, elevando o pH local mais rapidamente. No presente estudo, as nanopartículas favoreceram a elevação do pH nas 24 horas iniciais e 7 dias quando comparadas com as micropartículas. Entretanto, a partir deste período, os resultados de pH se tornaram equivalentes para nanopartículas ou micropartículas. Outro resultado mostrado foi que a associação entre o hidróxido de cálcio à clorexidina não reduziu seu

poder de dissociação e conseguiu manter o meio alcalino (Mohammadi et al.<sup>21</sup>, 2012; Sirén et al.<sup>38</sup>, 2004).

O processo de obtenção de nanopartículas é difícil, oneroso, necessita de processamento laboratorial e maior tempo. Ainda, são necessários aperfeiçoamento para obtenção de pasta homogênea das nanopartículas.

Visando aumentar a ação antimicrobiana e diminuir a citotoxicidade das medicações intracanal, são propostas associações a diferentes substâncias, concentrações e tamanhos de partículas.

Uma possibilidade de associação ao hidróxido de cálcio é a clorexidina. A associação do hidróxido de cálcio à clorexidina objetiva aumentar a ação antimicrobiana sobre *E. faecalis* e *Candida albicans*, aumentando seu efeito residual, inibindo a proliferação e propagação de micro-organismos resistentes ao preparo biomecânico (Evans et al.<sup>7</sup>, 2002; Mohammadi e Abbot 2009; Duarte et al.<sup>5</sup>, 2009; Lima et al.<sup>18</sup>, 2012; Zaugg et al.<sup>42</sup>, 2014).

É importante evidenciar que a clorexidina favoreceu a ação antibacteriana em todas as metodologias aqui estudadas corroborando com outras pesquisas. Gomes et al.<sup>10</sup> (2009) avaliaram a ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio somente, associado à clorexidina e óxido de zinco ou somente clorexidina sobre *E. faecalis*, *C. albicans*, *Actinomyces viscosus* and *Porphyromonas gingivalis* por meio da

superfície externa radicular e difusão em agár. Verificaram que os medicamentos contendo clorexidina 2% são mais efetivos na difusão da dentina e superfície externa da raiz exercendo a ação antimicrobiana, classificados do mais forte para o mais fraco da seguinte forma: clorexidina 2%, hidróxido de cálcio + clorexidina 2%, hidróxido de cálcio + clorexidina 2% + óxido de zinco, hidróxido de cálcio + solução salina.

Delgado et al.<sup>4</sup> (2010) avaliaram a ação antibacteriana intratubular do hidróxido de cálcio e clorexidina 2% sobre *E. faecalis*. e constataram que hidróxido de cálcio associado à clorexidina mostrou uma atividade antimicrobiana equivalente a clorexidina sozinha. Ambas foram mais eficientes que somente o hidróxido de cálcio.

Sousa et al.<sup>39</sup> (2014) mostraram que o hidróxido de cálcio associado a clorexidina 2% como medicamento intracanal, por 30 dias, reduz significativamente as endotoxinas de canais radiculares associados com abscessos apicais agudos. Corroborando, Oliveira et al.<sup>27</sup> (2012) verificaram que a associação do hidróxido de cálcio à clorexidina 2% neutraliza de 99% a 100% de efeitos citotóxicos.

Diante do exposto, utilização do hidróxido de cálcio associado à clorexidina pode ser uma opção como medicação intracanal eficiente sobre *E. faecalis*, porém mais estudos devem ser realizados para viabilização do emprego de nanopartículas.

## 6 CONCLUSÃO FINAL

- 1- As nanopartículas de hidróxido de cálcio e óxido de zinco promovem maior alcalinização inicial e a atuação das medicações intracanal sobre *E. faecalis* é favorecida pela associação à clorexidina.
- 2- As medicações intracanal que associam hidróxido de cálcio e óxido de zinco micro ou nanoparticulado à clorexidina promovem maior redução de biofilme induzido de *E. faecalis* em canais radiculares de dentes humanos.

## 7 REFERENCIAS\*

1. Abbaszadegan A, Nabavizadeh M, Gholami A, Aleyasin ZS, Dorostkar S, Saliminasab M, et al. Positively charged imidazolium-based ionic liquid-protected silver nanoparticles: a promising disinfectant in root canal treatment. *Int Endod J*. 2014 sep 2 [Epub ahead of print].
2. Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(5): 384-90.
3. Cornélio ALG, Salles LP, Paz MC, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod*. 2011; 37(2): 203-10.
4. Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, et al. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2010; 36(8): 1389-93.
5. Duarte MA, Midena RZ, Zeferino MA, Vivan RR, Weckwerth PH, Dos Santos F, et al. Evaluation of pH and calcium ion release of calcium hydroxide pastes containing different substances. *J Endod*. 2009; 35(9): 1274-7.
6. Duarte MAH, El Kadre GDO, Vivan RR, Tanomaru JMG, Tanomaru Filho M, de Moraes IG. Radiopacity of portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod*. 2009; 35(5): 737-40.
7. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide *Int Endod J*. 2002; 35(3): 221–8.
8. Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul S, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod*. 2003; 29(5): 338–9.
9. Faraji AH, Wipf P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem*. 2009; 17(8):2950-62.

\*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site:

<http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

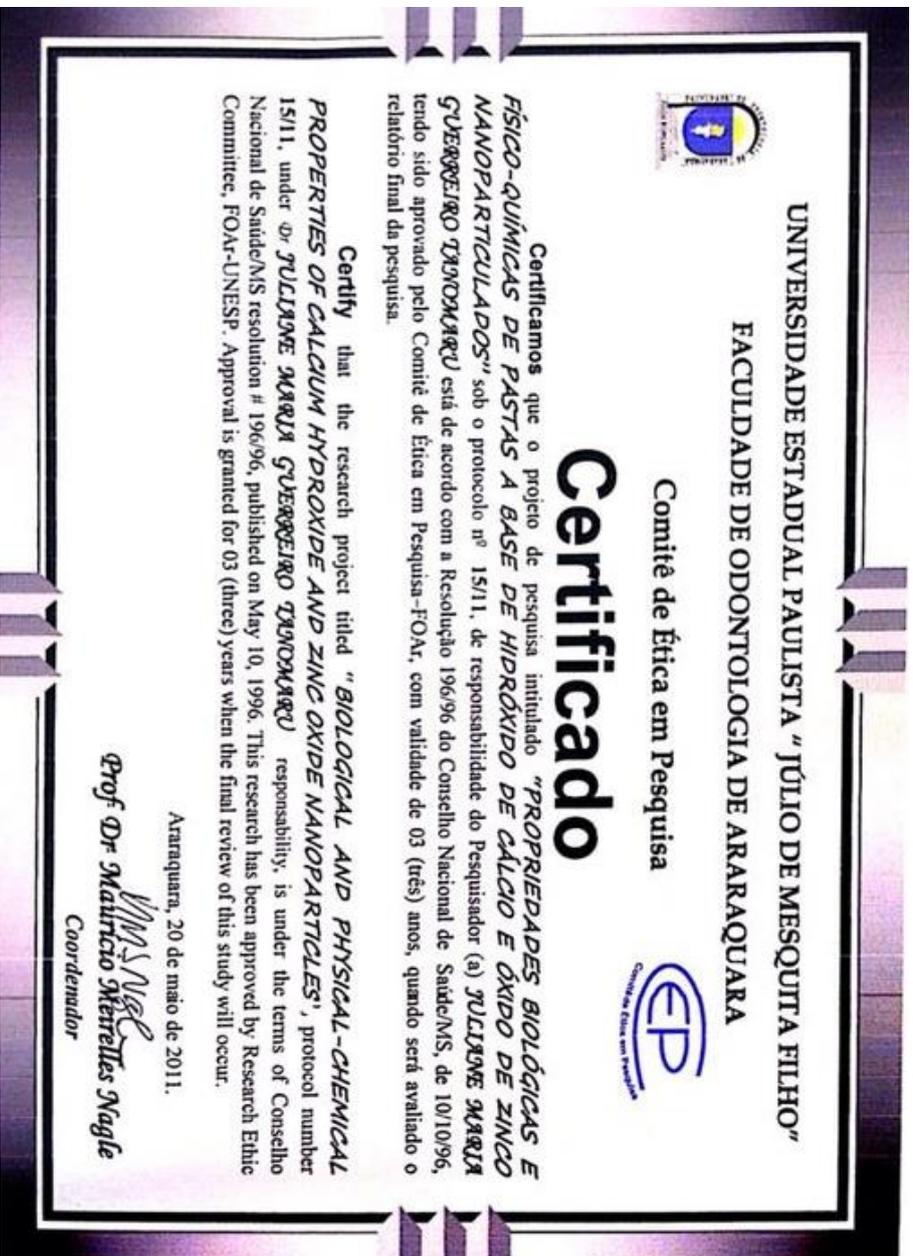
10. Gomes BP, Montagner F, Berber VB et al. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent.* 2009; 37(1): 76–81.
11. Guerreiro-Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J.* 2003; 36(11): 733-9.
12. Javidi M, Afkhami F, Zarei M, Ghazvini K, Rajabi O. Efficacy of a combined nanoparticulate/calcium hydroxide root canal medication on elimination of *Enterococcus faecalis*. *Aust Endod J.* 2014; 40(2): 61-5.
13. Johnson EM, Flannagan SE, Sedgley CM. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontites. *J Endod.* 2006; 32(10): 946-50.
14. Karygianni L, Wiedmann-Al-Ahmad M, Finkenzeller G, Sauerbier S, Wolkewitz M, Hellwig E, et al. *Enterococcus faecalis* affects the proliferation and differentiation of ovine osteoblast-like cells. *Clin Oral Investig.* 2012; 16(3): 879-87.
15. Kesler Shvero D, Abramovitz I, Zaltsman N, Perez Davidi M, Weiss EI, Beyth N. Towards antibacterial endodontic sealers using quaternary ammonium nanoparticles. *Int Endod J.* 2013; 46(8): 747-54.
16. Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *J Endod.* 2008; 34(12): 1515–20.
17. Komabayashi T, D'souza RN, Dechow PC, Safavi KE, Spångberg LSW. Particle Size and Shape of Calcium Hydroxide. *J Endod.* 2009; 35(2): 284-7.
18. Lima RKP, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2012; 45(4): 311–6.
19. Moghadas L, Shahmoradi M, Narimani T. Antimicrobial activity of a new nanobased endodontic irrigation solution: in vitro study. *Dent Hypotheses.* 2012; 3(4):142-6.

20. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J.* 2009; 42(4): 288–302.
21. Mohammadi Z, Shalavi S. Is chlorhexidine an ideal vehicle for calcium hydroxide? A microbiologic review. *Iran Endod J.* 2012; 7(3):115-22.
22. Mohammadi Z, Soltani MK, Shalavi S. An update on the management of endodontic biofilms using root canal irrigants and medicaments. *Iran Endod J.* 2014; 9(2):89-97.
23. Mohn D, Zenhnder M, Imfeld T, Stark WJ. Radio-opaque bioactive glass for potential root canal application: evaluation of radiopacity, bioactivity and alkaline capacity. *Int Endod J.* 2010; 43(3): 210–7.
24. Morgental RD, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Jr N, Duarte MAH, Kuga MC, Tanomaru-Filho M. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112(3): 396-400.
25. Mortazavi V, Nahrkhalaji MM, Fathi MH, Mousavi SB, Esfahani BN. Antibacterial effects of sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle on aerobic bacteria. *J Biomed Mater Res A.* 2010; 94(1):160-8.
26. Motshekga SC, Ray SS, Onyango MS, Momba MN. Microwave-assisted synthesis, characterization and antibacterial activity of Ag/ZnO nanoparticles supported bentonite clay. *J Hazard Mater.* 2013; 15(262): 439-46.
27. Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves Jde S, Valera MC, Jorge AO. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. *J Endod.* 2012; 38(8):1053-7.
28. Ozbek SM, Ozbek A, Erdorgan AS. Analysis of *Enterococcus faecalis* in samples from Turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR SYBR green method. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17(5): 370-4.
29. Paz LC, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod.* 2010; 36 (1): 70-7.
30. Paz LC. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod.* 2007; 33(6): 652–62.

31. Ping Xu Z, Zeng QG, Qing Lu G, Bing Yu A. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chem Eng Sci*. 2006; 61: 1027-40.
32. Ricucci D, Lin LM, Spångberg LSW. Wound healing of apical tissues after root canal therapy: a long-term clinical, radiographic, and histopathologic observation study. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod*. 2009; 108(4): 609-21.
33. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J*. 2005; 38(10): 735-42.
34. Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19(2):95-101.
35. Sepulveda P, Jones JR, Hench LL. In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses. *J Biomed Mat Res*. 2002; 61: 301–11.
36. Shrestha A, Shi Z, Neoh KG, Kishen A. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *J Endod*. 2010, 36(6): 1030–5.
37. Sinha N, Patil S, Dodwad PK, Patil AC, Singh B. Evaluation of antimicrobial efficacy of calcium hydroxide paste, chlorhexidine gel, and a combination of both as intracanal medicament: an in vivo comparative study. *J Conserv Dent*. 2013; 16(1):65-70.
38. Sirén EK, Haapasalo MP, Waltimo TM, Ørstavik D. In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci*. 2004; 112(4): 326–31.
39. Sousa EL, Martinho FC, Nascimento GG, Leite FR, Gomes BP. Quantification of endotoxins in infected root canals and acute apical abscess exudates: monitoring the effectiveness of root canal procedures in the reduction of endotoxins. *J Endod*. 2014; 40(2): 177-81.
40. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BP. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(4): 282-90.

41. Wilson CE, Cathro PC, Rogers AH, Briggs N, Zilm PS. Clonal diversity in biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in response to environmental stress associated with endodontic irrigants and medicaments. *Int Endod J*. 2014 Apr 21. [Epub ahead of print]
42. Zaugg LK, Zitzmann NU, Hauser-Gerspach I, Waltimo T, Weiger R, Krastl G. Antimicrobial activity of short- and medium-term applications of polyhexamethylene biguanide, chlorhexidine digluconate and calcium hydroxide in infected immature bovine teeth in vitro. *Dent Traumatol*. 2014; 30(4): 326-1.

## 8 ANEXO



Não Autorizo a reprodução deste trabalho até 24 /11/ 2016

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 24 de novembro de 2014.

**ALANA PRISCILA SOUZA AGUIAR**