



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



RODRIGO ARRUDA VASCONCELOS

ESTUDO DO pH E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE
Enterococcus faecalis **DE MEDICAÇÃO INTRACANAL À BASE DE**
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADA AO ÓLEO DE MELALEUCA,
CLOREXIDINA OU FARNESOL

Araraquara

2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



RODRIGO ARRUDA VASCONCELOS

ESTUDO DO pH E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE
Enterococcus faecalis **DE MEDICAÇÃO INTRACANAL À BASE DE**
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADA AO ÓLEO DE MELALEUCA,
CLOREXIDINA OU FARNESOL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

Araraquara

2016

Vasconcelos, Rodrigo Arruda

Estudo do pH e atividade antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* de medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio associada ao óleo de melaleuca, clorexidina ou farnesol / Rodrigo Arruda Vasconcelos.-

- Araraquara: [s.n.], 2016.

65 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

1. Clorexidina 2. Endodontia 3. *Enterococcus faecalis*
4. Hidróxido de cálcio 5. Óleo de melaleuca I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

RODRIGO ARRUDA VASCONCELOS

ESTUDO DO pH E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE
Enterococcus faecalis DE MEDICAÇÃO INTRACANAL À BASE DE
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADA AO ÓLEO DE MELALEUCA,
CLOREXIDINA OU FARNESOL

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Comissão julgadora

Presidente e Orientador: Prof.^a Dr.^a Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

2º Examinador: Prof.^a Dr.^a Denise M. Spolidorio

3º Examinador: Prof.^a Dr.^a Flaviana Bombarda de Andrade

Araraquara, 30 de março de 2016

DADOS CURRICULARES

RODRIGO ARRUDA VASCONCELOS

NASCIMENTO	03/04/1988 Salvador - Bahia
FILIAÇÃO	Luiz Antônio Figueiredo Vasconcelos Maria Lúcia Brito Arruda Vasconcelos
2008 - 2013	Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP
2014 – 2016	Especialização em Endodontia Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2014 – 2016	Mestrado em Odontologia – Área de Endodontia Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedico este trabalho a **Deus**, por
conceder saúde, força de vontade e
proteção em todos os momentos.

Aos meus pais, **Luiz Antônio Figueiredo Vasconcelos** e **Maria Lúcia Brito Arruda Vasconcelos**, que sempre acreditaram em meu potencial e, ao meu lado, batalharam para tornar possível a realização dos meus sonhos. Nada seria possível sem o apoio de vocês. Fico muito feliz por sermos tão unidos. Amo vocês.

Ao meu irmão, **Luiz Antônio Brito Arruda Vasconcelos**, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos. Por ser minha referência desde sempre. Você é a minha inspiração, não apenas profissional, sempre se esforçando para conquistar os seus objetivos, mas como ser humano. Tenha certeza que além de irmão, você é o meu melhor amigo.

À minha orientadora, **Prof.^a Dr.^a Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, por toda a dedicação, disponibilidade, atenção, paciência e conhecimento, tornando possível a realização deste trabalho.

Espero ter correspondido às suas expectativas.

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP**, na figura da diretora, **Prof.^a Dr.^a Elaine Maria Sgavioli Massucato**, pela infraestrutura necessária para a execução deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho**, pelo acolhimento inicial, paciência, convivência harmoniosa e todos os ensinamentos transmitidos durante este período que tive a oportunidade de trabalhar ao seu lado. Espero que possamos estabelecer parcerias futuras.

À banca de qualificação de Mestrado, **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho, Prof.^a Dr.^a Gisele Faria e Prof.^a Dr.^a Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, pela análise criteriosa e importantes sugestões atribuídas a este trabalho.

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP, **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert, Prof.^a Dr.^a Gisele Farias, Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho, Prof.^a Dr.^a Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho, Prof. Dr. Milton Carlos Kuga, Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo**, este tempo foi muito importante para o meu crescimento profissional.

Aos colegas de mestrado da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP, **Aline Silva Andrade, Derik Damasceno Barbosa, Fernanda Ferrari Esteves Torres, Gabriela Mariana Castro Núñez, Kenia Scapin Viola, Larissa Torres de Almeida, Lauriê Garcia Belizário, Roberto Almela Roshino e Wilfredo Escalante Otarola**, por todo esse tempo de convivência.

Aos colegas de doutorado da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP, **Ana Carolina Venção, Ariele Patrícia Rabello, Bernardo Cesar Costa, Camila Almeida Nascimento, Camila Galletti Espir, Gisselle Moraima Chávez Andrade, Juliana Alcarás Saraiva, Natália Guimarães Kalatzis Sousa e Tiago Silva da Fonseca**, pela boa convivência.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro na forma de concessão de bolsa de Mestrado.

À **Prof.^a Dr.^a Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, pela amizade, dedicação, conversas, conselhos, oportunidades. Por despertar o interesse e o amor a pesquisa e Endodontia. Por todo o incentivo desde a iniciação científica. Fico muito feliz por sempre acreditar no meu potencial e por ter mantido contato mesmo estando afastado por este período.

Ao amigo, **Marlos Barbosa Ribeiro**, por se fazer presente em todos os momentos. Obrigado por acreditar em meu potencial e sempre propor novos desafios e parcerias. Obrigado pelas oportunidades. Tenha certeza que os conselhos dados sempre foram levados em consideração. Fico muito feliz por você ser um grande ser humano e um excelente profissional. Agradeço também pela parceria nos trabalhos acadêmicos. Durante as reuniões sociais surgem as melhores ideias. As boas parcerias nunca podem acabar.

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, **Prof.^a Dr.^a Adriana de Jesus Soares**, **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**, **Prof.^a Dr.^a Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, **Prof. Dr. Caio Cesar Randi Ferraz**, **Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida**, por ter despertado o interesse pela Endodontia. Tenham a certeza de que cada um contribuiu para que eu pudesse me tornar um profissional de qualidade.

Aos amigos de Piracicaba, **Moisés Nogueira**, **Ivan Solani Martins**, **Ricardo Armini Caldas**, **Vinicius Nakamura**, **Priscila Amanda Francisco**, **Ana Carolina Correia Laurindo Cerqueira Neto**, **Maicon Passini** e **Augusto Rodrigues** por estarem presentes.

Aos meus amigos da Bahia, **George Fontes Leal**, **Michel Fontes Leal**, **Túlio Fontes Leal** e seus pais **Sidney** e **Jorge leal**, por todos esses anos de amizade, companheirismo, parceria e por sempre me acolherem em suas casas. Fico feliz em também fazer parte desta família. Obrigado por torcerem por mim. As melhores férias sempre são com vocês.

A amiga, **Aline Silva Andrade**, por todos os momentos juntos, pelo bom humor contagiante. Obrigado por sempre estar disposta a fazer companhia e tomar uma gela, mesmo quando os dias não eram tão bons assim. Não sei se por ser do mesmo estado que eu, mas eu senti uma energia muito boa em você. Foi muito especial te conhecer, Rob.

Ao amigo, **Derik Damasceno Barbosa**, que apesar de demonstrar um desespero natural em todas as tarefas a ele atribuída, as executa da melhor maneira possível. Obrigado pelos dentes doados para a pesquisa, pelas parcerias acadêmicas e sociais.

A amiga, **Fernanda Ferrari Esteves Torres**, por sempre estar ao meu lado. Você foi a primeira pessoa que conheci em Araraquara e, felizmente, nos demos tão bem. Os dias foram muito melhores em sua companhia. Tenho certeza que você é uma amiga que levarei para a vida inteira.

A amiga, **Gabriela Mariana Castro Núñez**, pela grande amizade, carinho, por ser uma pessoa tão sincera e sempre presente. Obrigado por sempre ter uma palavra para tornar o dia melhor. Obrigado pelos bons conselhos, dicas de *powerpoint* e bom gosto nos *slides*. ¡Hasta la vista!

A amiga, **Larissa Torres de Almeida**, pela amizade verdadeira, pelas análises críticas durante os seminários da pós-graduação, pelas reuniões na copa nos intervalos, pelas reuniões na casa das nordestinas do Mestrado sempre com alguma comida gostosa. Desejo toda a sorte do mundo nessa nova etapa da sua vida, *Future*.

“A tarefa não é tanto ver aquilo
que ninguém viu, mas pensar o
que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê. ”

- A. Schopenhauer

Arruda-Vasconcelos R. Estudo do pH e atividade antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* de medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio associada ao óleo de melaleuca, clorexidina ou farnesol [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

Medicações intracanal (MIC) são utilizadas para complementar a desinfecção do sistema de canais radiculares. A associação de antimicrobianos ao hidróxido de cálcio visa aumentar sua ação. As MIC (**Capítulo 1**) hidróxido de cálcio (HC)/óleo de melaleuca (OM) 4,5%/polietilenoglicol 400 (PL), HC/OM 9%/PL, HC/CLX 0,4%/PL e HC/PL (**Capítulo 2**) HC/farnesol (FAR) 4,5%/PL, HC/FAR 9%/PL e HC/PL foram analisadas. O teste de contato direto sobre células planctônicas (**Capítulos 1 e 2**) foi realizado utilizando suspensões das MIC. O teste de contato direto das MIC sobre biofilme (**Capítulo 2**) foi realizado em blocos de dentina bovina (5mm x 5mm x 0,7mm) com biofilme de *Enterococcus faecalis* induzidos por 15 dias e contato com as suspensões das MIC por 6 horas. A efetividade antibacteriana (**Capítulos 1 e 2**) foi avaliada em canais radiculares de dentes de humanos extraídos. Canais radiculares de dentes unirradiculares padronizados em 15mm foram preparados até MTwo #40/.04 e contaminados com *E. faecalis* por 21 dias. As MIC foram mantidas no canal durante 7 dias. A primeira coleta (C1) foi realizada após período de contaminação, a segunda coleta (C2), imediatamente após a remoção das MIC e terceira coleta (C3), realizada 7 dias após a remoção das MIC. Foi realizada contagem de UFCmL⁻¹. O pH foi avaliado após preenchimento de tubos de polietileno (**Capítulos 1 e 2**) com as pastas por 12 horas, 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. A difusão de íons hidroxila por meio de dentina bovina (**Capítulos 1 e 2**) foi avaliada após preenchimento de canais radiculares de dentes bovinos nos períodos 1, 3, 7, 14, 21, 28 e 60 dias. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA e teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Resultados: (**Capítulo 1**) Todas as MIC foram efetivas contra *E. faecalis* na forma planctônica. As MIC contendo OM e CLX foram mais efetivas quando comparadas ao HC/PL em canais radiculares. A associação do OM e CLX 0,4% ao HC não prejudicou a capacidade de ionização da MIC. (**Capítulo 2**) A adição do FAR não alterou a capacidade de alcalinização do HC. Todas as MIC foram efetivas contra células planctônicas. As suspensões das MIC contendo FAR foram mais efetivas sobre biofilme de *E. faecalis* quando comparadas ao HC/PL. As MIC contendo farnesol promoveram maior efetividade contra *E. faecalis* no interior de canais radiculares. Conclusões: (**Capítulo 1**) A adição do OM 4,5 e 9%, bem como de CLX 0,4% aumentam a atividade antimicrobiana do HC sem alterar a liberação de íons hidroxila. (**Capítulo 2**) A adição de Farnesol 4,5 e 9% potencializou a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio sem interferir na liberação de íons hidroxila.

Palavras-chave: Clorexidina. Endodontia. *Enterococcus faecalis*. Hidróxido de cálcio. Óleo de melaleuca

Arruda-Vasconcelos R. pH analysis and antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* of intracanal medication based on calcium hydroxide associated with tea tree oil, chlorhexidine or farnesol [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

Intracanal medications (ICM) are used to complement disinfection of the root canal system. The association of antimicrobials to calcium hydroxide aims to improve its action. The ICM (**Chapter 1**) calcium hydroxide (CH)/tea tree oil (TTO) 4.5%/polyethylene glycol 400 (PL), CH/TTO 9%/PL, CH/chlorhexidine (CHX) 0.4%/PL e CH/PL (**Chapter 2**) CH/farnesol (FAR) 4.5%/PL, CH/FAR 9%/PL and HC/PL were analysed. Direct contact test against *E. faecalis* planktonic cells (**Chapters 1 and 2**) was performed by using suspension of ICM. Direct contact test on biofilm (**Chapter 2**) was performed on bovine dentin blocks (5mm x 5mm x 0.7mm) with *E. faecalis* biofilms induced by 15 days and contact with the suspensions of ICM for 6 hours. Antibacterial effectiveness was evaluated in root canals of extracted human teeth (**Chapters 1 e 2**). Standardized single-rooted teeth with 15mm were prepared up to #40/.04 MTwo and contaminated with *E. faecalis* for 21 days. As ICM were kept within the root canals for 7 days. The first sample (S1) was performed after contamination, S2 immediately after the ICM removal and S3 7 days after the ICM removal. It was performed UFCmL⁻¹ count. pH was evaluated after filling the polyethylene tubes (**Chapter 1 and 2**) with the ICM for 12 hours, 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days. The diffusion of hydroxyl ions through the bovine dentin (**Chapters 1 and 2**) was evaluated after filling root canals of bovine teeth after 1, 3, 7, 14, 21, 28 and 60 days. Data was statistically analyzed using ANOVA and Tukey's test ($p < 0,05$). Results: (**Chapter 1**) all ICM were effective against planktonic cells. ICM containing TTO and CHX were more effective compared to CH/PL. The association of TTO and CHX 0.4% to HC not affect the ionization capacity of ICM. (**Chapter 2**) The addition of FAR did not change the alkalizing ability of the CH. All ICM were effective against planktonic cells. The ICM containing FAR were more effective against *E. faecalis* than CH within root canals. Conclusions: (**Chapter 1**) The addition of TTO 4.5 and 9%, as well as CHX 0.4% increased the HC antimicrobial activity without modifying the release of hydroxyl ions. (**Chapter 2**) The addition of Farnesol 4.5 and 9% enhances the antimicrobial activity of calcium hydroxide without interfering with the release of hydroxyl ions.

Keywords: Calcium hydroxide. Chlorhexidine. Endodontics. *Enterococcus faecalis*. Tea tree oil

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 PROPOSIÇÃO.....	18
3 PUBLICAÇÃO 1.....	19
4 PUBLICAÇÃO 2.....	38
5 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXOS.....	62

1 INTRODUÇÃO

Canais radiculares infectados abrigam microbiota polimicrobiana de bactérias aeróbias, anaeróbias, Gram-positivas e Gram-negativas que apresentam organização na forma de biofilme (Ramachandran Nair³⁹, 1987; Nair et al.³³, 1990; Sundqvist, Figdor⁴⁹ 2003; Nair³⁵, 2006; Baumgartner et al.⁴, 2008; Ricucci, Siqueira⁴¹ 2010). Estes biofilmes são comunidades microbianas envoltas por uma matriz extracelular de polissacarídeo e proteínas na qual as células aderem-se umas às outras e/ou à superfícies ou interfaces (Costerton et al.⁹, 1995; Donlan, Costerton¹² 2002; Lee, Baek²⁶ 2012). Quando organizados em biofilmes, estes micro-organismos apresentam grande resistência a antissépticos e antibióticos (Socransky, Haffajee⁴⁷ 2002). Atualmente, o conceito em microbiologia enfatiza a doença endodôntica como uma infecção promovida por biofilme (Ricucci, Siqueira⁴¹ 2010). Deste modo, a eliminação eficaz do biofilme e a destruição das bactérias do sistema de canais radiculares são desafios importantes na desinfecção endodôntica (Wu et al.⁵⁷, 2014). Mesmo após preparo biomecânico e obturação é possível haver persistência de biofilme bacteriano no interior dos canais radiculares (Nair et al.³⁴, 2005; Siqueira et al.⁴⁶, 2010; Vera et al.⁵⁴, 2012) e esta persistência de micro-organismos após o tratamento é a principal causa de insucesso na terapia endodôntica (Siqueira⁴⁵, 2001).

Frequentemente isolada de canais radiculares em casos de insucesso no tratamento endodôntico, *Enterococcus faecalis* é uma bactéria anaeróbia facultativa Gram-positiva (Peciulienė et al.³⁸, 2000; Haapasalo et al.¹⁸, 2003; Rôças et al.⁴², 2004) presente em 24% a 74% dos casos de infecções endodônticas persistentes (Stuart et al.⁴⁸, 2006) e é capaz de organizar-se em forma de biofilme tornando-se mais resistente à fagocitose, anticorpos e antibióticos quando comparados a organismos não formadores de biofilme (Distel et al.¹¹, 2002). Este micro-organismo apresenta ainda diversos fatores de virulência tais como ácido lipoteicóico (LTA), peptidoglicano, citolisina e substâncias de agregação, capazes de induzir inflamação periapical (Lee, Baek²⁶ 2012). Estas bactérias são capazes de invadir e permanecer viáveis no interior de túbulos dentinários por um período de tempo prolongado (Love²⁸, 2001), aderir e formar biofilme em dentina sob diferentes condições ambientais (George et al.¹³, 2005), resistir a desinfetantes intracanal, e sobreviver em condições adversas em canais radiculares obturados (Rôças et al.⁴², 2004).

Medicamentos intracanal antimicrobianos são utilizados para complementar a desinfecção do sistema de canais radiculares (Byström et al.⁶, 1985; Tanomaru-Filho et al.⁵¹, 2002; Lana et al.²⁵, 2009). O hidróxido de cálcio é amplamente utilizado devido às suas propriedades biológicas e atividade antimicrobiana (Mohammadi, Dummer³² 2011), inibir a reabsorção dentária e induzir a formação de tecido duro (Mizuno, Banzai³⁰ 2008), estimular a proliferação de osteoblastos (Yang et al.⁵⁸, 2006) e capacidade de inativar endotoxinas bacterianas (Tanomaru et al.⁵⁰, 2003). O efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio é atribuído principalmente à liberação de seus íons hidroxila, que se difundem através de túbulos dentinários e superfície externa da raiz (Andreasen et al.³, 2006). Estes íons são radicais livres com alto poder de reatividade (Tanomaru-Filho et al.⁵², 2011) com capacidade de destruir componentes estruturais da membrana celular das bactérias e diminuir a atividade biológica celular, o que pode ser letal para micro-organismos (Zmener et al.⁵⁹, 2007).

Os óleos essenciais de plantas têm sido utilizados desde o início da civilização humana para fins terapêuticos e medicinais (Oyen, Dung³⁷ 1999). Estes óleos são materiais voláteis que protegem as plantas de doenças e do ataque de insetos (Valero⁵³, 2008) e, devido à natureza volátil dos seus componentes, são altamente aromáticos (Valero⁵³, 2008). Os óleos derivados de plantas, especialmente *Myrtaceae alternifolia*, tornou-se conhecido mundialmente no século XVIII, e apresenta propriedades anticâncer (Greay et al.¹⁷, 2010), anti-inflamatória (Hart et al.¹⁹, 2000) e antimicrobiana (Minami et al.²⁹, 2003; Wilkinson et al.⁵⁶, 2005; Catalán et al.⁸, 2008; Kwiecinski et al.²⁴, 2009).

As propriedades antimicrobianas de determinados óleos essenciais e/ou seus componentes em relação a patógenos humanos e animais foram estudados por diversos autores (Burt⁵, 2004; Carson et al.⁷, 2006). O óleo de melaleuca (OM) promove a lise e perda de integridade e função da membrana celular que se manifesta por extravasamento de íons e inibição da respiração (Carson et al.⁷, 2006). Este composto mostrou-se eficaz frente a 15 cepas de MRSA e 5 cepas de enterococos resistentes à vancomicina (Nelson et al.³⁶, 1997).

A clorexidina (CLX) tem sido utilizada como irrigante e MIC em endodontia. CLX apresenta efetividade perante bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos (Gomes et al.¹⁶, 2013). A CLX foi estudada como MIC isoladamente (Vianna et al.⁵⁵, 2007; Gomes et al.¹⁴, 2009) ou em associação a outras substâncias (Vianna

et al.⁵⁵, 2007; Gomes et al.¹⁴, 2009; Lima et al.²⁷, 2012), mostrando o efeito sinérgico da clorexidina quando associado ao hidróxido de cálcio (De Souza-Filho et al.¹⁰, 2008; Gomes et al.¹⁴, 2009; Lima et al.²⁷, 2012).

O farnesol, Trans-trans farnesol (tt-farnesol), é um álcool sesquiterpeno comumente encontrado na própolis e óleos essenciais de frutas cítricas como casca de laranja e óleo de capim-limão e apresenta efeitos antibiofilme por prevenção na formação de biofilme ou atuação em biofilmes estabelecidos (Alves et al.¹, 2013). Farnesol inibe ou reduz a formação de biofilme de diversas espécies microbianas, incluindo *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* (Ramage et al.⁴⁰, 2002; Koo et al.²², 2005; Jabra-Rizk et al.²⁰, 2006). Esta substância inibe a produção de ácido e a síntese de glucano por *S. mutans* no biofilme (Koo et al.²², 2005). Os biofilmes formados na presença de farnesol contém menos biomassa e apresenta mudanças na composição da matriz (Gomes et al.¹⁵, 2011).

Na tentativa de encontrar um possível substituto para o hipoclorito de sódio devido a desvantagens como irritação aos tecidos periapicais (Serper et al.⁴⁴, 2004) e corrosão de instrumentos (Mohammadi³¹, 2008), Alves et al.¹ (2013) avaliaram os efeitos antibiofilme e antibacteriano do farnesol contra *Enterococcus faecalis* como solução irrigadora atuando isoladamente em concentração de 0,2% ou em associação com xilitol a 20%. Os autores demonstraram que o farnesol afetou tanto a biomassa do biofilme quanto a viabilidade das células no biofilme. A habilidade do tt-farnesol a 0,2%, xilitol a 5%; xilitol a 20%; tt-farnesol a 0,2% e xilitol a 5%; tt-farnesol a 0,2%, xilitol a 5% e lactoferrina 0,1%; xilitol a 5% e lactoferrina a 0,1%; e 20 mM de ácido salicílico (Katsuyama et al.²¹, 2005; Rosenberg et al.⁴³, 2008; Koo et al.²³, 2009; Ammons et al.², 2009) foi avaliada sobre biofilmes de *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* MB35 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984. Os autores observaram que a combinação de farnesol, xilitol e lactoferrina reduziu significativamente a biomassa de biofilme produzido pelas duas cepas de *E. faecalis* e uma cepa de *S. epidermidis*. Desta maneira, o farnesol isoladamente ou em associação ao xilitol apresenta potencial para ser utilizado no combate de biofilmes no tratamento endodôntico (Alves et al.¹, 2013).

2 PROPOSIÇÃO

Proposição geral: Avaliar o pH e atividade antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* de medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio associada ao óleo de melaleuca, clorexidina ou farnesol.

Proposições específicas:

Publicação 1 - Avaliar o pH e a atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis* de medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio em associação ao óleo de melaleuca ou clorexidina por meio de:

1. Avaliação da propriedade antibacteriana por meio de teste de contato direto sobre células planctônicas de *E. faecalis*
2. Avaliação da propriedade antibacteriana / antibiofilme de *E. faecalis* em dentes de humanos *ex vivo*
3. Determinação do pH das soluções por meio de tubos de polietileno
4. Avaliação da difusão de íons hidroxila em dentina bovina

Publicação 2 - Avaliar o pH e a atividade antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* de medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio em associação ao farnesol por meio de:

1. Avaliação da propriedade antibacteriana por meio de teste de contato direto sobre células planctônicas de *E. faecalis*
2. Avaliação da propriedade antibacteriana por meio de contato direto dos materiais sobre biofilme de *E. faecalis*
3. Avaliação da propriedade antibacteriana / antibiofilme de *E. faecalis* em dentes de humanos *ex vivo*
4. Determinação do pH das soluções por meio de tubos de polietileno
5. Avaliação da difusão de íons hidroxila em dentina bovina

3 PUBLICAÇÃO 1

Efetividade antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* e pH da associação do hidróxido de cálcio ao óleo de melaleuca ou clorexidina*

Resumo

Objetivo Avaliar a atividade antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* e pH de medicações intracanal (MIC) à base de hidróxido de cálcio (HC) associado ao óleo de melaleuca (OM) 4,5 e 9% ou clorexidina (CLX) 0,4%.

Materiais e métodos As MIC HC/OM 4,5%/polietilenoglicol (PL), HC/OM 9%/PL, HC/CLX 0,4%/PL e HC/PL foram analisadas. O teste de contato direto sobre células planctônicas foi realizado utilizando *E. faecalis* e suspensão das MIC. A efetividade antibacteriana foi avaliada em canais radiculares de dentes de humanos extraídos. Dentes unirradiculares padronizados em 15mm foram preparados com sistema MTwo até #40/.04 e contaminados com *E. faecalis* por 21 dias. As MIC foram mantidas no canal durante 7 dias. A primeira coleta (C1) foi realizada após período de contaminação. C2 imediatamente após a remoção das MIC e C3, 7 dias após remoção das MIC. Em todas as fases, foi realizada contagem de UFCmL⁻¹. O pH foi avaliado após preenchimento de tubos de polietileno com as MIC por 12 horas, 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. A difusão de íons hidroxila por meio de dentina bovina foi avaliada após preenchimento de canais radiculares de incisivos bovinos após 1, 3, 7, 14, 21, 28 e 60 dias. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados Todas as MIC foram efetivas contra *E. faecalis* na forma planctônica. As MIC contendo OM e CLX foram mais efetivas quando comparadas ao HC/PL em canais radiculares. A associação do OM e CLX 0,4% ao HC não prejudicou a capacidade de ionização da MIC.

Conclusões A adição do OM 4,5 e 9%, bem como de CLX 0,4% aumentam a atividade antimicrobiana do HC sem alterar a liberação de íons hidroxila.

Relevância clínica MIC à base de HC associado ao OM 4,5 e 9% ou CLX 0,4% apresentam maior efetividade antimicrobiana sobre *E. faecalis* em comparação ao HC.

Palavras-chave: Clorexidina - *Enterococcus faecalis* - Hidróxido de cálcio - Óleo de melaleuca

Introdução

Canais radiculares infectados abrigam microbiota capaz de promover formação de biofilme [1-3]. *Enterococcus faecalis* é uma bactéria anaeróbia facultativa Gram-positiva frequentemente isolada de canais radiculares em casos de insucesso no tratamento endodôntico [4, 5]. Está presente em 24% a 74% dos casos de infecções endodônticas persistentes [6]. *E. faecalis* é capaz de invadir e permanecer viável no interior de túbulos dentinários por um período de tempo prolongado [7], aderir e formar biofilme em dentina sob diferentes condições ambientais [8], resistir a procedimentos endodônticos, e sobreviver em condições adversas em canais radiculares obturados [5].

Medicações intracanal (MIC) são utilizadas para complementar a desinfecção do sistema de canais radiculares [9, 10]. O hidróxido de cálcio (HC) tem sido amplamente utilizado por apresentar propriedades biológicas [11-13] e atividade antimicrobiana [14]. O efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio é atribuído principalmente à liberação de seus íons hidroxila, que se difundem através de túbulos dentinários até superfície externa da raiz [15]. Estes íons apresentam capacidade de destruir componentes estruturais da membrana celular das bactérias e diminuir a atividade biológica celular [16].

O óleo de melaleuca (OM) é um óleo essencial (OE) de plantas, que as protegem de doenças e do ataque de insetos [17]. OE, especialmente *Myrtaceae alternifolia*, tornaram-se conhecidos por apresentar propriedades anticâncer [18], anti-inflamatória [19] e antimicrobiana [20, 21]. OM promove a lise e perda de integridade e função da membrana celular que se manifesta por extravasamento de íons e inibição da respiração [22].

A clorexidina (CLX) tem sido utilizada como irrigante e MIC em endodontia. CLX apresenta efetividade perante bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos [23]. A CLX foi estudada como MIC isoladamente [24, 25] ou em associação a outras substâncias [24-26]. A associação entre HC e CLX potencializa o efeito antimicrobiano do HC [25, 26].

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis* e pH de medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio associada ao óleo de melaleuca (4,5 e 9%) ou clorexidina 0,4%.

Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos (CEP), protocolo número 1.280.669 (**Anexo 1**), e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo número 43/2014, da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista.

As MIC analisadas foram:

- Hidróxido de cálcio + Óleo de melaleuca 4,5% + polietilenoglicol 400 - HC/OM 4,5/PL
- Hidróxido de cálcio + Óleo de melaleuca 9% + polietilenoglicol 400 - HC/OM 9/PL.
- Hidróxido de cálcio + Clorexidina 0,4% + polietilenoglicol - HC/CLX0,4/PL
- Hidróxido de cálcio + polietilenoglicol 400 - HC/PL.

Todos os componentes usados para as pastas foram de origem da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA.

Testes microbiológicos

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda, Campinas, SP, Brasil) sob condições assépticas. Culturas puras de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foram obtidas por meio de semeadura por esgotamento em placas de Petri contendo TSA (Tryptic Soy Agar, Difco, Detroit, MI, EUA) 12 horas antes de cada teste. A pureza das culturas foi confirmada por meio de morfologia macroscópica e microscópica (Coloração de Gram). A concentração do inóculo bacteriano foi ajustada por meio de espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil), comprimento de onda igual a 600 nm, na concentração equivalente a 10^8 UFCmL⁻¹.

Contato direto sobre células planctônicas

Foi utilizada uma suspensão das MIC em água destilada com concentração igual a 25 mg/mL agitada em vortex por 1 minuto e que permaneceu em repouso *overnight* à temperatura ambiente. O inóculo de *E. faecalis* (50µL) foi adicionado a 1,45 mL da suspensão e agitados em vortex (Vortex AP 56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) por 5 segundos. Os tempos de contato foram de 1 e 3 minutos. Foram utilizados 8 tubos para cada grupo experimental.

Foram realizadas diluições decimais seriadas até 10^{-4} . Alíquotas de 100 μ L da mistura foram transferidas para um segundo tubo contendo 0,9 mL de ácido cítrico a 0,5%, agente neutralizante para as MIC à base de HC. Para o grupo contendo CLX, além do ácido cítrico 0,5%, a lecitina de soja preparada com Tween 80. Estes neutralizantes foram colocados nos dois primeiros tubos (10^{-1} e 10^{-2}) da diluição com a finalidade de evitar o efeito *carry-over* das MIC.

Cada uma das diluições (20 μ L) foram plaqueadas, em triplicata, em placas de Petri contendo TSA e incubadas a 37 °C por 48 horas em microaerofilia. A leitura dos resultados de cada placa corresponde às médias do número de UFC das três áreas de crescimento bacteriano, na diluição com número entre 5 e 50 UFCmL⁻¹. Os valores obtidos expressam, em log₁₀, as médias de colônias viáveis após o contato com as suspensões testes em cada período.

Contaminação de canais radiculares de dentes de humanos *ex vivo*

Foram utilizados 72 incisivos inferiores unirradiculares com dimensões e anatomia radicular semelhantes. Os dentes foram radiografados para comprovação da presença de um único canal e ausência de curvatura. As coroas dentais foram seccionadas em cortadeira de precisão de baixa velocidade, Isomet 1000 (Buehler, Lake Bluff, IL. EUA), padronizando o comprimento radicular em 15 mm.

A abertura foraminal foi padronizada com lima tipo K #25. Os canais radiculares foram instrumentados com o sistema rotatório MTwo (VDW, Munich, Alemanha) até o instrumento #40/.04, 1 mm aquém do comprimento real do dente. A irrigação foi realizada com 2 mL de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% a cada troca de instrumento. Os canais radiculares foram inundados com EDTA 17% por 3 minutos. A irrigação final foi realizada com 5 mL de solução salina. Sucessivas lavagens com água destilada foram realizadas para remoção de NaOCl durante 4 dias.

A região apical foi selada com resina composta fotopolimerizável (3M ESPE, St. Paul, EUA) e a superfície radicular externa impermeabilizada com duas camadas de adesivo epóxi Araldite (Brascola, Joinville, SC, Brasil), exceto na região cervical. Os espécimes foram aleatoriamente distribuídos em placas de cultura de 24 poços, fixados com resina acrílica ativada quimicamente [27] e esterilizadas em óxido de etileno (Acecil, Campinas, Brasil).

Os canais radiculares foram contaminados com 20 µL de inóculo bacteriano de *Enterococcus faecalis* e incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 21 dias, em umidade relativa. A cada 2 dias, novo meio de cultura esterilizado, BHI, foi adicionado aos canais radiculares. Além dos grupos experimentais, o controle negativo não recebeu a suspensão bacteriana, recebendo somente o meio de cultura esterilizado, atestando, desta maneira, a eficácia da esterilização. O controle positivo não recebeu nenhuma medicação intracanal, demonstrando a viabilidade bacteriana durante o experimento.

Coleta microbiológica

As coletas microbiológicas foram realizadas com os canais radiculares inundados com solução salina estéril e introduzidos dois cones de papel absorvente estéreis (40/.02), um após outro, por 1 minuto cada e inseridos em tubo de polietileno contendo 1 mL de solução salina esterilizada.

Após o período de contaminação (21 dias) foi realizada a coleta inicial (C1) para confirmação da contaminação por *E. faecalis*. Os canais radiculares foram reinstrumentados com lima tipo K #40 e irrigados com solução salina estéril. Os canais radiculares foram inundados com solução de EDTA 17% por 3 minutos e irrigados com 5 mL de solução salina estéril. As MIC foram inseridas com auxílio de agulha e seringa. Uma mecha de algodão esterilizada foi adaptada nas entradas dos canais radiculares e os espécimes foram armazenados em estufa a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em microaerofilia, por 7 dias.

A remoção das MIC foi realizada com limas tipo K #40 e os canais irrigados com 10 mL de solução salina fisiológica estéril. Foi utilizado 1 mL de neutralizante, como descrito anteriormente. A irrigação final foi realizada com 1 mL de solução salina estéril e foi realizada a coleta C2 (pós medicação).

Após C2, os canais radiculares foram preenchidos com solução salina estéril. Os espécimes foram incubados em estufa a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em microaerofilia e umidade relativa por 7 dias. Após este período realizou-se a coleta C3 (7 dias após a remoção das medicações intracanal) para verificação de possível recolonização do canal principal.

Análise microbiológica

Os tubos de polietileno contendo os dois cones de papel absorvente foram agitados em vortex por 1 minuto. Diluições decimais seriadas foram realizadas e

alíquotas de 20 μL de cada uma das diluições foram plaqueadas em placas de Petri, contendo *Tryptic Soy Ágar* (TSA-Difco). As placas foram incubadas em microaerofilia a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. O crescimento microbiano foi determinado por contagem de UFCmL^{-1} .

Testes de pH

Determinação do pH das soluções em tubos de polietileno

Tubos de polietileno com 10 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro interno foram preenchidos com as medicações com auxílio de seringa plástica de 3 mL e agulha 1,2 x 40 (Benton, Dickinson and Company, Juiz de Fora, MG, Brasil). Os tubos foram submersos em frascos plásticos com tampas contendo 10 mL de água destilada com pH previamente aferido. Os frascos foram mantidos em estufa à 37°C . Após 12 horas de imersão, os tubos de polietileno foram transferidos para novos frascos com o auxílio de uma pinça clínica. A solução resultante de cada um dos frascos utilizados foi utilizada para realizar a aferição do pH. Este procedimento foi repetido pelos períodos de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias.

O pH das soluções foi determinado com o auxílio de um pHmetro digital Digimed DM-21 (Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil) à temperatura ambiente, 25°C . Previamente à aferição do pH, o dispositivo foi calibrado com soluções-tampão de pH 4, 7 e 10 e estas foram utilizadas para averiguar a calibragem do pHmetro durante todo o período experimental.

Difusão de íons hidroxila em dentina bovina

Foram utilizados 72 dentes de bovinos. As coroas dentárias foram seccionadas em máquina de corte Isomet 1000 (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e comprimento das raízes padronizado em 15 mm. Os espécimes foram submersos em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 48 horas e enxaguados em água destilada por 4 dias. Os canais radiculares foram instrumentados 1 mm aquém do comprimento do dente até a lima K #110 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça). A irrigação foi realizada com solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (Instituto de Química, Araraquara, UNESP – Brasil) durante todo o preparo biomecânico. Foram utilizados 5 mL no início e ao final da instrumentação e 2 mL a cada troca de limas. Gates-Glidden número 5 (Dentsply-

Maillefer, Ballaigues, Suíça) foi utilizada até o comprimento de 11 mm. Solução de EDTA 17% (Odahecam Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) foi utilizada por 3 minutos. A irrigação final foi realizada com 5 mL de solução salina.

Cavidade com 4 mm x 2 mm x 0,5 mm (comprimento x largura x profundidade) foi confeccionada na superfície radicular proximal, entre 5 mm e 9 mm do ápice radicular com broca diamantada 1052 (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil), penetrando toda a parte ativa da broca, para padronização da espessura dentinária remanescente. Os espécimes foram mensurados e radiografados para garantir espessura uniforme de dentina entre a parede de fundo da cavidade e a parede interna do canal radicular.

A superfície radicular externa foi impermeabilizada com adesivo epóxi (Brascola, Joinville, SC, Brasil) complementado por uma camada de esmalte para unhas, exceto na área de desgaste do cimento. Os espécimes alocados no grupo controle 1 (C1) não receberam MIC, entretanto, houve confecção de cavidade e impermeabilização da mesma forma. No grupo controle 2 (C2), os espécimes foram completamente impermeabilizados, sem confecção de cavidade na superfície externa e sem colocação de MIC.

Após a colocação das MIC, a abertura do canal radicular foi selada com resina composta fotopolimerizável e impermeabilizada. Após a secagem, as amostras foram imersas em frascos com tampas contendo 10 mL de água destilada com pH previamente aferido. Estes frascos foram armazenados em estufa a 37°C e o pH da solução avaliado nos períodos de 1, 3, 7, 14, 21, 28 e 60 dias por meio de pHmetro digital Digimed DM-22 (Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil) calibrado com pH 4, 7 e 10 à temperatura ambiente, 25°C.

Análise estatística

Os dados obtidos das coletas microbiológicas e avaliação de pH foram submetidos ao teste estatístico ANOVA e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados

Contato direto sobre células planctônicas

Todas as medicações intracanal utilizadas foram eficazes em eliminar células planctônicas de *Enterococcus faecalis* nos períodos de 1 e 3 minutos (**Tabela 1**).

Tabela 1 Média (desvio padrão) do número de UFCmL⁻¹ (log 10) nos períodos de contato de 1 e 3 minutos entre as MIC e células planctônicas de *Enterococcus faecalis*.

Período	Medicações intracanal				Controle
	HC/OM4,5/PL	HC/OM9/PL	HC/PL	HC/CLX0,4/PL	
1 min	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	7,846 (±0,361) ^b
3 min	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	7,830 (±0,356) ^b

HC: hidróxido de cálcio; OM: óleo de melaleuca; CLX: clorexidina; PL: polietilenoglicol 400; Controle: número de UFCmL⁻¹ (log10) de células planctônicas de *Enterococcus faecalis*. *Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos em cada coleta (p < 0,05).

Contaminação de canais radiculares de dentes de humanos *ex vivo*

Todos os espécimes foram contaminados com *Enterococcus faecalis* após 21 dias (C1) de forma similar (p>0,05). Na segunda coleta (C2), houve eliminação de *E. faecalis*, para todos as pastas (p>0,05). Na terceira coleta (C3), os níveis de contaminação por *E. faecalis* foi mantido em zero nos grupos em que foram utilizadas as medicações HC/OM 9/PL e HC/CHX 0,4/PL. O resultado menos satisfatório foi observado no grupo HC/PL, não apresentando diferença em relação ao grupo controle positivo (p>0,05) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Média e desvio padrão do número de UFCmL⁻¹ (log 10) nas diferentes coletas.

Coleta	Medicações Intracanal				Controle
	HC/OM 4,5/PL	HC/OM 9/PL	HC/CHX0,4/PL	HC/PL	
C1	6,53 (±0,376) ^a	6,618 (±0,626) ^a	6,734 (±0,425) ^a	6,676 (±0,401) ^a	6,678 (±0,547) ^a
C2	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	5,939 (±0,442) ^b
C3	0,453 (±1,360) ^b	0 ^a	0 ^a	3,184 (±2,268) ^{b,c}	5,725(±0,400) ^c

HC: hidróxido de cálcio; OM: óleo de melaleuca; CLX: clorexidina; PL: polietilenoglicol 400; Controle: dentes contaminados com *Enterococcus faecalis* que não receberam medicação intracanal. *Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos em cada coleta (p < 0,05).

Determinação do pH das soluções em tubos de polietileno

Durante todos os períodos o grupo controle (água destilada) apresentou menores valores de pH. No período de 12 horas, maior alcalinização foi atingida pelo HC/CLX 0,4/PL (9,531), não apresentando diferença significativa em relação ao HC/PL ($p>0,05$). Foi observada diferença quando comparado ao HC/OM 4,5/PL e HC/OM 9/PL. Nos períodos entre 24 horas e 14 dias, todas as MIC foram capazes de alcalinizar o meio, não havendo diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$). No 21º dia, os maiores valores foram observados nos grupos HC/OM 4,5/PL e HC/PL (8.294 e 8.247, respectivamente), sem diferença entre eles ($p>0,05$). No dia 28, as MIC apresentaram capacidade de alcalinização similares, sem diferença entre os grupos ($p>0,05$) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Médias de pH (desvio padrão) das soluções das MIC nos diferentes períodos observacionais.

Período	Medicações Intracanal				Controle
	HC/OM 4,5/PL	HC/OM 9/PL	HC/CHX0,4/PL	HC/PL	
12 h	8.480 (± 0.413) ^a	8.568 (± 0.533) ^a	9.531 (± 0.266) ^b	9.237 (± 0.255) ^b	6.71 (± 0.0575) ^c
1 d	7.743 (± 0.480) ^a	7.786 (± 0.393) ^a	7.835 (± 0.463) ^a	7.983 (± 0.548) ^a	6.736 (± 0.149) ^b
3 d	8.266 (± 0.342) ^a	8.221 (± 0.484) ^a	7.963 (± 0.217) ^a	8.055 (± 0.341) ^a	7.085 (± 0.187) ^b
7 d	7.978 (± 0.372) ^a	8.116 (± 0.198) ^a	8.205 (± 0.266) ^a	8.170 (± 0.127) ^a	6.794 (± 0.182) ^b
14 d	8.502 (± 0.385) ^a	8.476 (± 0.362) ^a	8.516 (± 0.377) ^a	8.725 (± 0.362) ^a	7.142 (± 0.269) ^b
21 d	8.294 (± 0.448) ^a	7.952 (± 0.224) ^{a,b}	7.801 (± 0.234) ^{b,c}	8.247 (± 0.476) ^{a,c}	7.089 (± 0.158) ^d
28 d	7.711 (± 0.339) ^a	7.836 (± 0.158) ^a	7.787 (± 0.165) ^a	7.974 (± 0.223) ^a	7.25 (± 0.243) ^b

HC: hidróxido de cálcio; OM: óleo de melaleuca; CLX: clorexidina; PL: polietilenoglicol 400; Controle: água destilada. *Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos em cada período ($p < 0,05$).

Difusão de íons hidroxila em dentina bovina

O grupo C2 apresentou os menores valores de pH em todos os períodos. O grupo C1 apresentou pH superior ao grupo C2, entretanto, inferior aos grupos contendo as MIC. As MIC com CHX apresentaram maior pH quando comparadas

aquelas com OM nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Os maiores valores de pH foram observados no período igual a 60 dias (**Tabela 4**).

Tabela 4. Médias de pH e desvio padrão das MIC nos diferentes períodos observacionais.

Período	Medicações intracanal				C1	C2
	HC/OM4,5/PL	HC/OM9/PL	HC/CLX0,4/PL	HC/PL		
1 d	7,497 ($\pm 0,253$) ^a	7,498 ($\pm 0,312$) ^a	7,499 ($\pm 0,280$) ^a	7,500 ($\pm 0,191$) ^a	7,501 ($\pm 0,079$) ^a	7,502 ($\pm 0,253$) ^a
3 d	7,367 ($\pm 0,387$) ^a	7,000 ($\pm 0,190$) ^{b,c,d}	7,225 ($\pm 0,320$) ^{a,c}	7,339 ($\pm 0,300$) ^{a,d}	7,466 ($\pm 0,107$) ^a	6,798 ($\pm 0,131$) ^b
7 d	7,683 ($\pm 0,387$) ^{a,b}	7,327 ($\pm 0,283$) ^b	8,171 ($\pm 0,402$) ^a	7,685 ($\pm 0,529$) ^{a,b}	7,266 ($\pm 0,104$) ^b	6,492 ($\pm 0,416$) ^c
14 d	7,762 ($\pm 0,216$) ^b	7,723 ($\pm 0,299$) ^b	8,414 ($\pm 0,461$) ^{a,e}	7,993 ($\pm 0,549$) ^{b,e}	7,206 ($\pm 0,092$) ^c	6,362 ($\pm 0,196$) ^d
21 d	7,763 ($\pm 0,287$) ^b	7,968 ($\pm 0,270$) ^{b,c}	8,227 ($\pm 0,381$) ^{a,c}	8,205 ($\pm 0,453$) ^c	7,306 ($\pm 0,183$) ^d	6,867 ($\pm 0,241$) ^e
28 d	7,970 ($\pm 0,170$) ^a	7,653 ($\pm 0,139$) ^b	7,927 ($\pm 0,331$) ^{a,d}	7,694 ($\pm 0,218$) ^{b,d}	7,456 ($\pm 0,057$) ^{b,e}	7,243 ($\pm 0,060$) ^{c,e}
60 d	8,253 ($\pm 0,152$) ^a	8,251 ($\pm 0,121$) ^a	8,281 ($\pm 0,103$) ^a	8,215 ($\pm 0,104$) ^a	7,913 ($\pm 0,166$) ^b	7,481 ($\pm 0,060$) ^c

HC: hidróxido de cálcio; OM: óleo de melaleuca; CLX: clorexidina; PL: polietilenoglicol 400; C1: Controle 1, espécimes com cavidades e sem medicação intracanal; C2: Controle 2, espécimes sem cavidades e sem medicação intracanal. *Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos em cada período ($p < 0,05$).

Discussão

HC apresenta atividade antimicrobiana [14], inibição da reabsorção dentária e indução de formação de tecido mineralizado [13], estimulação de proliferação de osteoblastos [12] e capacidade de inativação de endotoxinas bacterianas [11]. Entretanto, não pode ser considerado uma MIC universal em virtude da dificuldade de atuação contra algumas espécies microbianas encontradas no sistema de canais radiculares [28, 29]. Por este motivo, a associação do HC a outras substâncias na tentativa de potencializar a atividade antimicrobiana, especialmente contra *Enterococcus faecalis*, ainda hoje é muito pesquisada e de grande interesse clínico.

Óleo de Melaleuca é capaz de causar extravasamento de material intracelular, inibição da respiração e inabilidade em manter homeostase [22], sendo este último,

um dos mecanismos de defesa do *Enterococcus faecalis*. Desta maneira, acreditamos que a associação deste óleo essencial ao HC apresenta grande potencial para combater este micro-organismo que se mostra resistente ao HC. Além disso, o OM apenas apresenta citotoxicidade em concentrações $\geq 10\%$ e $\geq 50\%$ em células e tecidos, respectivamente [30]. OM apenas apresenta toxicidade caso seja ingerido em altas doses ou pode apresentar alergias cutâneas quando aplicado em altas concentrações, além disso, OM não apresenta genotoxicidade [31]. Da mesma forma, Faria *et al.* [32], avaliaram a citotoxicidade da clorexidina a 0,5 e 1% e concluíram que, em menor concentração, é observada menor citotoxicidade. Deste modo, tanto a aplicação do OM a 4,5 e 9% quanto a CLX a 0,4% associados ao HC neste estudo mostram-se seguras para possíveis aplicabilidades clínicas. Além disso, essas substâncias conferiram maior efeito antimicrobiano ao HC contra *E. faecalis*.

Todas as medicações foram eficientes na completa eliminação de células de *E. faecalis* em sua forma planctônica. Estes resultados corroboram com achados encontrados previamente no qual medicações à base de hidróxido de cálcio foram efetivas durante curto período de contato [33].

O método de contaminação de canais radiculares *ex vivo* é capaz de simular condições clínicas de dentes com infecção [34]. O período de contaminação foi de 21 dias, sendo este capaz de promover infecção no interior dos túbulos dentinários [33, 35].

Os resultados do presente estudo mostraram que, na coleta realizada imediatamente após a remoção das MIC dos canais radiculares (C2), todos os medicamentos foram eficientes na descontaminação da luz do canal radicular como observado previamente [26]. A ampla redução de micro-organismos nesta etapa, provavelmente se deve, além da ação química da MIC, à ação mecânica (utilização de instrumentos) e física (irrigação/aspiração de solução salina).

Entretanto, após a remoção das MIC e manutenção de solução salina nos canais radiculares, é possível verificar se há micro-organismos viáveis no interior dos túbulos dentinários [26, 33, 34, 36]. Deste modo, após a coleta C3, observou-se aumento no número de UFCmL⁻¹ nos grupos HC/OM 4,5/PL e HC/PL, sendo que, diferentemente do HC/PL que apresentou 7 entre 10 culturas positivas, HC/OM 4,5/PL apresentou apenas 1 em 10 culturas positivas de *E. faecalis*. Uma provável explicação consiste na resistência do *Enterococcus faecalis* ao HC, comprovada por diversos

autores [37-39]. Além disso, o tempo mínimo de contato recomendado não deve ser inferior a 14 dias para medicações à base de hidróxido de cálcio em casos de infecção [40].

Nos grupos HC/OM 9/PL e HC/CLX 0,4/PL, após C3 não houve recolonização de bactérias cultiváveis. Em estudo de Lima *et al.* [26] foi utilizada metodologias de contaminação e coleta similares ao nosso trabalho. Os autores avaliaram a atividade antimicrobiana da pasta Calen associado à clorexidina 0,4% e foi possível recuperar *E. faecalis* na coleta final. Nossos resultados podem ter divergido dos de Lima *et al.* [26] por se tratar de MIC obtidas a partir de compostos isolados. Em outro estudo, a aplicação de medicação composta por CLX/HC promoveu desinfecção dentinária numa profundidade de 600 μm após 7 dias [41], concordando com os nossos resultados no que se refere à eficiente atividade antimicrobiana dessas medicações no interior dos túbulos dentinários.

O efeito antimicrobiano do HC é atribuído principalmente à liberação de íons hidroxila, que se difundem através de túbulos dentinários e superfície externa da raiz [15]. Estes íons são radicais livres com alto poder de reatividade [42], capacidade de destruir componentes estruturais da membrana celular das bactérias e diminuir a atividade biológica celular, causando efeito letal para micro-organismos [16]. Deste modo, além das propriedades antimicrobianas das MIC, é de extrema importância o estudo do pH destas pastas. Apesar da ampla busca em potencializar a atividade antimicrobiana do HC, especialmente contra micro-organismos resistentes, é de extrema importância a incorporação de substâncias que não prejudiquem na capacidade de liberação de íons hidroxila.

Nas primeiras 12 horas, foi observada dissociação mais rápida de íons nos grupos HC/CLX 0,4/PL e HC/PL. Como a ação antimicrobiana dos íons hidroxila e da CLX é exercida pela desintegração de membranas [43] das bactérias, evidenciou-se que a presença de CLX em baixa concentração não é capaz de alterar a dissociação de íons do hidróxido de cálcio em meio aquoso. Possivelmente por se tratar de um óleo, a dissociação iônica do HC quando associado ao OM não foi tão rápida. Porém, a partir de 24 horas, houve um equilíbrio em relação à capacidade de alcalinização entre todos os grupos ($p>0,05$).

A capacidade de liberação de íons pode ser afetada se forem incorporadas substâncias ou veículos diferentes ao HC [44]. No presente estudo, HC/CLX 0,4/PL e

HC/PL promoveram rápida alcalinização do meio em períodos curtos (12 horas), havendo estabilização após 24 horas até o dia 28. Nos grupos associados ao OM, a liberação inicial foi mais lenta, conseguindo atingir graus de alcalinização semelhantes aos outros grupos após 24 horas. Deste modo, a adição dessas substâncias ao HC não foi capaz de prejudicar a dissociação iônica.

Alguns estudos observaram que a presença de CLX não alterou o pH do HC [45-48]. Guerreiro-Tanomaru *et al.* [49], também observaram que a adição de CLX a 0,4% não prejudicou a dissociação de íons, entretanto, estes autores observaram progressivo aumento de pH ao longo do tempo, enquanto que em nosso estudo, houve uma rápida liberação nas primeiras 12 horas e estabilização até o dia 28 apesar de utilizarmos o mesmo veículo para as pastas (polietilenoglicol 400), com a diferença de que os autores [49] incorporaram CLX a 0,4% a um produto comercial (Calen) enquanto que em nosso estudo as MIC foram obtidas a partir de compostos isolados.

A utilização de dentes bovinos para avaliação de pH foi descrita previamente [49]. Nos períodos iniciais da análise, o pH da solução se mostrou inferior quando comparado aos demais períodos, possivelmente, devido à dificuldade de difusão dos íons por meio dos túbulos dentinários. Para que a MIC atue de maneira efetiva, os íons hidroxila resultantes da dissociação da MIC deve atingir o meio externo, garantindo a atuação em todo o sistema de canais radiculares [15]. É possível observar que o grupo C1 (presença de cavidade na superfície radicular, porém, sem MIC) apresentou pH superior quando comparado ao grupo C2 (sem MIC e completamente impermeabilizado), confirmando a capacidade tampão da dentina, observada previamente [50].

Todas as medicações intracanal foram capazes de alcalinizar o meio. Na maior parte dos períodos observados as medicações se comportaram de maneira similar ao grupo HC/PL.

Conclusões

Diante das metodologias utilizadas, é possível concluir que o óleo de melaleuca e clorexidina associados ao hidróxido de cálcio apresentam maior atividade antimicrobiana quando comparado ao hidróxido de cálcio sobre *Enterococcus faecalis*. A adição do óleo de melaleuca e clorexidina ao hidróxido de cálcio nas concentrações

estudadas não alterou a capacidade de liberação de íons hidroxila. Estas medicações intracanal apresentam potencial para utilização clínica.

Referências

1. Nair PN (2006) On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 39:249-281.
2. Baumgartner JC, Siqueira JF, Sedgley CM, Kishen A (2008) Microbiology of endodontic disease. In: Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC, (ed). *Ingle's Endodontics*, 6th edn. Hamilton, Ontario, Canada, pp 221–222.
3. Ricucci D, Siqueira JF (2010) Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 36:1277-1288.
4. Haapasalo M, Udnaes T, Endal U (2003) Persistent, recurrent and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endod Topics* 6:29–56.
5. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KR (2004) Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 30:315-320.
6. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB (2006) *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 32:93-98.
7. Love RM (2001) *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 34:399-405.
8. George S, Kishen A, Song KP (2005) The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 31:867-872.
9. Tanomaru-Filho M, Leonardo MR, Silva LAB (2002) Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *J Endod* 28:295–299.

10. Lana PEP, Scelza MFZ, Silva LE, Mattos-Guaraldi AL, Hirata-Júnior R (2009) Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in root canal systems. *Braz Dent J* 20:32–36.
11. Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA (2003) Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J* 36:733–739.
12. Yang WK, Kim MR, Lee Y, Son HH, Lee W (2006) Effect of calcium hydroxide-treated *Prevotella nigrescens* on the gene expression of matrix metalloproteinase and its inhibitor in MG63 cells. *J Endod* 32:1142-1145.
13. 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* 41:933-938.
14. Mohammadi Z, Dummer PMH (2011) Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J* 44, 697–730.
15. 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 Topics* 14:93-101.
16. Zmener O, Pameijer CH, Banegas G (2007) An *in vitro* study of the pH of three calcium hydroxide dressing materials. *Dent Traumatol* 23:21-25.
17. Valero M (2008) Plant oils and anti-pathogen immune stimulation. In: Watson RR, Preedy VR (Ed) *Botanical Medicine in Clinical Practice*. CABI, Cambridge, pp. 164–174.
18. Greay SJ, Ireland DJ, Kissick HTA, Levy MW, Beilharz TV, Riley CF, Carson CF (2010) Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. *Cancer Chemother Pharmacol* 65:877–888.

19. Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ (2000) Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm Res* 49:619–626.
20. Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA (2008) *In vitro* and *in vivo* activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105:327–332.
21. Kwiecinski J, Eick S, Wójcik K (2009) Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *Int J Antimicrob Agents* 33:343–347.
22. Carson CF, Hammer KA, Riley TV (2006) *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev* 19:50-62.
23. Gomes BPFA, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JFA, Souza-Filho FJ, Ferraz CCR (2013) Chlorhexidine in Endodontics. *Braz Dent J* 24:89-102.
24. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza FJ, Gomes BP (2007) Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immun* 22:411-418.
25. Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME (2009) Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod* 35:1350-1353.
26. 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.
27. Oliveira LD, Jorge AOC, Carvalho CAT, Koga-Ito Cy, Valera MC (2007) *In vitro* effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 104:135-142.

28. Mohammadi Z, Shalavi S (2012) Is chlorhexidine an ideal vehicle for calcium hydroxide? A microbiologic review. *Iran Endod J* 7:115-122.
29. Saatchi M, Shokraneh A, Navaei H, Maracy MR, Shojaei H (2014) Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. *J Appl Oral Sci* 22:356-365.
30. Homeyer DC, Sanchez CJ, Mende K, Beckius ML, Murray CK, Wenke JC, Akers KS (2015) *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on filamentous fungi and toxicity to human cells. *Med Mycol* 53:285-294.
31. Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB (2006) A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food Chem Toxicol* 44:616-625.
32. Faria G, Celes MR, De Rossi A, Silva LA, Silva JS, Rossi MA (2007) Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured I929 fibroblasts. *J Endod* 33:715-722.
33. Aguiar AS, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria G, Leonardo RT, Tanomaru-Filho M (2015) Antimicrobial Activity and pH of Calcium Hydroxide and Zinc Oxide Nanoparticles Intracanal Medication and Association with Chlorhexidine. *J Contemp Dent Pract* 16:624-629.
34. Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo CHR, Mancini MNG (2004) *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J* 37:311–319.
35. Guerreiro-Tanomaru JM, Chávez-Andrade GM, Faria-Júnior NB, Watanabe E, Tanomaru-Filho M (2015) Effect of passive ultrasonic irrigation on *Enterococcus faecalis* from root canals: An *Ex Vivo* Study. *Braz Dent J* 26:342-346.
36. Cardoso MG, Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AO (2008) Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105:85–91.

37. Heling I, Steinberg D, Keni S, Gavrilovich I, Sela MN, Friedman M (1992) Efficacy of a sustained-release device containing chlorhexidine and Ca(OH)₂ in preventing secondary infection of dentinal tubules. *Int Endod J* 25:20–24.
38. Basrani B, Tjäderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, Friedman S (2003) Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 96:618–624.
39. Afkhami F, Pourhashemi SJ, Sadegh M, Salehi Y, Fard MJK (2015) Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against *Enterococcus faecalis*. *J Dent* 43:1573-1579.
40. Leonardo MR, Silveira FF, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Utrilla LS (2002) Calcium hydroxide root canal dressing. Histopathological evaluation of periapical repair at different time periods. *Braz Dent J* 13:17–22.
41. Sirén EK, Haapasalo MPP, Waltimo TMT, Ørstavik D (2004) *In vitro* antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci* 112:326–331.
42. 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* 19:1-5.
43. McDonnell G, Russell AD (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 12:147-179.
44. Pacios MG, de la Casa ML, de Bulacio MA, López ME (2004) Influence of different vehicles on the pH of calcium hydroxide pastes. *J Oral Sci* 46:107–111.
45. Basrani B, Ghanem A, Tjäderhane L (2004) Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. *J Endod* 30: 413–417.

46. Souza-Filho FJ, Soares AJ, Vianna ME, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPFA (2008) Antimicrobial Effect and pH of Chlorhexidine Gel and Calcium Hydroxide Alone and Associated with other Materials. *Braz Dent J* 19:28-33.
47. Yücel AC, Aksoy A, Ertas E, Güvenç D (2007) The pH changes of calcium hydroxide mixed with six different vehicles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 103:712–717.
48. Freire LG, Carvalho CN, Ferrari PHP, Siqueira EL, Gavini G (2010) Influence of dentin on pH of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone or in combination. *Dent Traumatol* 26:276–280.
49. Guerreiro-Tanomaru JM, Chula DG, Lima RKP, Berbert FLCV, Tanomaru-Filho M (2012) Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. *Dent Traumatol* 28:320–323.
50. Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TMT, Ørstavik D, Haapasalo MPP (2000) Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an *in vitro* study. *Int Endod J* 33:126-131.

4 PUBLICAÇÃO 2

Efetividade antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* e análise de pH de medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio associada ao farnesol *

Resumo

Objetivo: Avaliar pH e atividade antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* de medicações intracanal (MIC) à base de hidróxido de cálcio (HC) associada ao farnesol (FAR).

Metodologia: As MIC HC/FAR4,5%/polietilenoglicol (PL), HC/FAR 9%/PL, e HC/PL foram analisadas. O pH foi avaliado após preenchimento de tubos de polietileno com as pastas por 12 horas, 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. A difusão de íons hidroxila por meio de dentina bovina foi avaliada após preenchimento de canais radiculares de dentes bovinos nos períodos 1, 3, 7, 14, 21, 28 e 60 dias. O teste de contato direto sobre células planctônicas e biofilme de *E. faecalis* induzido por 15 dias em blocos de dentina bovina, foi realizado utilizando suspensão das MIC. A efetividade antibacteriana também foi avaliada em canais radiculares de dentes de humanos extraídos. Canais radiculares de dentes unirradiculares padronizados em 15mm foram preparados até MTwo #40/.04 e contaminados com *E. faecalis* por 21 dias. As MIC foram mantidas no canal durante 7 dias. A primeira coleta (C1) foi realizada após período de contaminação, a segunda coleta (C2), imediatamente após a remoção das MIC e terceira coleta (C3), realizada 7 dias após a remoção das MIC. Foi realizada contagem de UFCmL⁻¹. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados: A adição do FAR não alterou a capacidade de alcalinização do HC. Todas as MIC foram efetivas contra células planctônicas. As suspensões das MIC contendo FAR foram mais efetivas sobre biofilme de *E. faecalis* quando comparadas ao HC/PL. As MIC contendo farnesol promoveram maior efetividade contra *E. faecalis* no interior de canais radiculares.

Conclusões: A adição de Farnesol 4,5 e 9% potencializou a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio sem interferir na liberação de íons hidroxila.

Palavras-chave: Endodontia. *Enterococcus faecalis*. Hidróxido de cálcio

*Artigo nas normas do periódico *International Endodontic Journal*.

Introdução

O controle de micro-organismos presentes no sistema de canais radiculares representa um desafio para a desinfecção endodôntica (Wu⁵⁷ et al. 2014). *Enterococcus faecalis* é capaz de formar biofilme, aumentando a sua resistência (Distel et al. 2002). *E. faecalis* é capaz de permanecer viável no interior de túbulos dentinários por períodos prolongados (Love 2001), mesmo em condições adversas e canais radiculares obturados (Rôças et al. 2004).

Na tentativa de complementar a desinfecção do sistema de canais radiculares, a medicação intracanal (MIC) tem sido indicada (Tanomaru-Filho et al. 2002, Lana et al. 2009). O hidróxido de cálcio (HC) é amplamente utilizado devido às suas propriedades biológicas (Tanomaru et al. 2003, Yang et al. 2006, Mizuno & Banzai 2008) e atividade antimicrobiana (Mohammadi & Dummer 2011). A liberação de íons hidroxila com difusão através de túbulos dentinários contribui com a atividade antimicrobiana do HC (Andreasen et al. 2006). Estes íons apresentam capacidade de destruir componentes estruturais da membrana celular das bactérias e diminuir a atividade biológica celular (Zmener et al. 2007). O HC é capaz de causar danos à membrana citoplasmática, DNA e desnaturar proteínas bacterianas (Siqueira & Lopes 1999). Entretanto, apresenta maior dificuldade de atuação contra algumas espécies microbianas encontradas no sistema de canais radiculares (Mohammadi & Shalavi 2012, Saatchi et al. 2014).

Farnesol (FAR) é um álcool sesquiterpeno comumente encontrado na própolis e óleos essenciais de frutas cítricas e apresenta efeitos antibiofilme por prevenção na sua formação ou atuação em biofilmes estabelecidos (Alves et al. 2013a). FAR é capaz de inibir ou reduzir a formação de biofilme de diversas espécies microbianas, incluindo *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* (Ramage et al. 2002, Koo et al. 2005, Jabra-Rizk et al. 2006, Alves et al. 2013a, Alves et al. 2013b). Esta substância inibe a produção de ácido e a síntese de glucano por *S. mutans* no biofilme (Koo et al. 2005). Os biofilmes formados na presença de FAR contém menos biomassa e apresentam mudanças na composição da matriz (Gomes et al. 2011, Alves et al. 2013a). Desta maneira, FAR apresenta potencial para ser utilizado contra biofilmes durante o tratamento endodôntico (Alves et al. 2013a). Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* e

pH de MIC à base de HC associada ao FAR 4,5 ou 9%. As hipóteses nulas são (a) adição do FAR ao HC não altera as propriedades antimicrobianas do HC e (b) adição do FAR não altera a dissociação iônica do HC.

Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos (CEP), protocolo número 1.280.669 (**Anexo 1**), e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo número 43/2014, da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista.

MIC analisadas:

- Hidróxido de cálcio + Farnesol 4,5% + polietilenoglicol 400 - HC/FAR 4,5/PL
- Hidróxido de cálcio + Farnesol 9% + polietilenoglicol 400 - HC/FAR 9/PL.
- Hidróxido de cálcio + polietilenoglicol 400 - HC/PL.

Os produtos citados acima são de origem Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA.

Testes de pH

Determinação do pH das soluções em tubos de polietileno

Tubos de polietileno com 10 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro interno foram preenchidos com as MIC com auxílio de seringa plástica de 3 mL e agulha 1,2 x 40 (Benton, Dickinson and Company, Juiz de Fora, MG, Brasil). Os tubos foram submersos em frascos plásticos com tampas contendo 10 mL de água destilada com pH previamente aferido. Os frascos foram mantidos em estufa à 37 °C. Após 12 horas de imersão, os tubos de polietileno foram transferidos para novos frascos com o auxílio de uma pinça clínica. A solução resultante de cada um dos frascos utilizados foi utilizada para realizar a aferição do pH. Este procedimento foi repetido pelos períodos de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias.

O pH das soluções foi determinado com o auxílio de um pHmetro digital Digimed DM-21 (Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil) à temperatura ambiente, 25°C. Previamente à aferição do pH e durante todo o período experimental, o dispositivo foi calibrado com soluções tampão de pH 4, 7 e 10.

Difusão de íons hidroxila em dentina bovina

Foram utilizados 72 dentes de bovinos. As coroas dentárias foram seccionadas em Isomet 1000 (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e comprimento das raízes padronizado em 15 mm. Os espécimes foram submersos em solução de NaOCl 2,5% por 48 horas e enxaguados em água destilada por 4 dias. Os canais radiculares foram instrumentados 1 mm aquém do comprimento do dente até a lima K #110 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça). A irrigação foi realizada com solução de NaOCl 2,5% (Instituto de Química, Araraquara, UNESP – Brasil) durante todo o preparo biomecânico. Foram utilizados 5 mL no início e ao final da instrumentação e 2 mL a cada troca de limas. Gates-Glidden número 5 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) foi utilizada até o comprimento de 11 mm. Solução de EDTA 17% (Odahcam Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) foi utilizada por 3 minutos. A irrigação final foi realizada com 5 mL de solução salina.

Cavidade com 4 mm x 2 mm x 0,5 mm (comprimento x largura x profundidade) foi confeccionada na superfície radicular proximal, entre 5 mm e 9 mm do ápice radicular com broca diamantada 1052 (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil), penetrando toda a parte ativa da broca, para padronização da espessura dentinária remanescente. Os espécimes foram mensurados e radiografados para garantir espessura uniforme de dentina entre a parede de fundo da cavidade e a parede interna do canal radicular.

A superfície radicular externa foi impermeabilizada com adesivo epóxi (Brascola, Joinville, SC, Brasil) complementado por uma camada de esmalte para unhas, exceto na área de desgaste do cimento. Além dos grupos contendo as MIC, um grupo apresentou cavidade, porém, não foi preenchido com MIC -Controle 1 (C1) e outro grupo - Controle 2 (C2), os dentes foram completamente impermeabilizados, incluindo a área da cavidade radicular.

Após a colocação das MIC, a abertura do canal radicular foi selada com resina composta fotopolimerizável e impermeabilizada. Após a secagem, as amostras foram imersas em frascos com tampas contendo 10 mL de água destilada com pH previamente aferido. Estes frascos foram armazenados em estufa a 37°C e o pH da solução avaliado nos períodos de 1, 3, 7, 14, 21, 28 e 60 dias por meio de pHmetro digital Digimed DM-22 (Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil) calibrado com pH 4, 7 e 10 à temperatura ambiente, 25°C.

Análise microbiológica

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda, Campinas, SP, Brasil). Culturas puras de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foram obtidas em placas de Petri contendo TSA (Tryptic Soy Agar, Difco, Detroit, MI, EUA) 12 horas antes de cada teste. A pureza foi confirmada por meio de morfologia macroscópica e microscópica (Coloração de Gram). A concentração do inóculo bacteriano foi ajustada por meio de espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil), comprimento de onda igual a 600 nm, a 10^8 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFCmL⁻¹).

Contato direto sobre células planctônicas

Foi utilizada uma suspensão das MIC em água destilada com concentração igual a 25 mg/mL agitada em vortex por 1 minuto e que permaneceu em repouso *overnight* à temperatura ambiente.

O inóculo de *E. faecalis* (50 µL) foi adicionado a 1,45 mL da suspensão e agitados em vortex (Vortex AP 56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) por 5 segundos. Os tempos de contato foram de 1 e 3 minutos. Foram utilizados 8 amostras para cada grupo experimental.

Foram realizadas diluições decimais seriadas até 10^{-4} . Alíquotas de 100 µL da mistura foram transferidas para um segundo tubo contendo 0,9 mL de ácido cítrico a 0,5%, agente neutralizante para as MIC. Este neutralizante foi colocado nos dois primeiros tubos (10^{-1} e 10^{-2}) da diluição com a finalidade de evitar o efeito *carry-over* das MIC.

Cada uma das diluições (20 µL) foram plaqueadas, em triplicata, em placas de Petri contendo TSA e incubadas a 37 °C por 48 horas em microaerofilia. A leitura dos resultados de cada placa corresponde às médias do número de UFC das três áreas de crescimento bacteriano, na diluição com número entre 5 e 50 UFCmL⁻¹. Os valores obtidos expressam, em log₁₀ as médias de colônias viáveis após o contato com as suspensões testes em cada período.

Contato direto sobre biofilme

Foram confeccionados blocos de dentina a partir de dentes de bovinos com dimensões de 5 mm x 5 mm x 0,7 mm (comprimento x largura x espessura) obtidos por meio de Isomet 1000 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) sob irrigação abundante.

Os blocos de dentina permaneceram em EDTA 17% por 3 minutos e foram enxaguados abundantemente com solução salina. Em seguida, esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Os blocos de dentina foram distribuídos em placas de cultura celular de 24 poços. Cada poço recebeu 200 µL de inóculo bacteriano, padronizado em 10^7 UFCmL⁻¹ e 1,8 mL de meio de cultura esterilizado BHI e foram mantidos em incubadora (modelo Q816M20, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) sob agitação constante, em microaerofilia, a 37°C por 15 dias. A cada 48 horas o meio foi renovado, sem adição de novos micro-organismos.

Os blocos de dentina foram lavados duas vezes em salina para remoção das células não aderidas. Em placas de 48 poços foram colocadas 1mL da suspensão das MIC na concentração de 25mg/mL em contato com os blocos de dentina com biofilme e permaneceram em contato durante 6 horas, em estufa a 37 °C. No grupo controle negativo foi utilizado água destilada com a finalidade de verificar a viabilidade do biofilme durante o período de contato. Para cada grupo avaliado foram utilizados 6 blocos de dentina com biofilme.

Após 6 horas de contato, os blocos contendo o biofilme remanescente foram lavados em solução salina esterilizada e, individualmente, inseridos em tubos eppendorf contendo 1 mL de solução salina esterilizada e pérolas de vidro. Os tubos foram agitados em vortex (modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) por 1 minuto a fim de promover o rompimento do biofilme aderido ao bloco de dentina.

Foram realizadas diluições decimais seriadas até 10^{-4} utilizando, nos dois primeiros tubos, os agentes neutralizantes descritos anteriormente. Alíquotas de 20 µL de cada diluição da suspensão foi inoculada em placas de Petri contendo meio de cultura *Triptic Soy Agar* (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h. Em seguida realizou-se contagem UFCmL⁻¹ e os dados transformados em Log10 para realização da análise estatística.

Contaminação de canais radiculares de dentes de humanos *ex vivo*

Foram utilizados 72 incisivos inferiores unirradiculares com dimensões e anatomia radicular semelhantes. Os dentes foram radiografados para comprovação da presença de um único canal e ausência de curvatura. As coroas dentais foram seccionadas em máquina de corte Isomet 1000 (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), padronizando o comprimento radicular em 15 mm.

A abertura foraminal foi padronizada com lima tipo K #25. Os canais radiculares foram instrumentados com o sistema rotatório MTwo (VDW, Munich, Alemanha) até o instrumento #40/.04, 1 mm aquém do comprimento real do dente. A irrigação foi realizada com 2 mL de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% a cada troca de instrumento. Os canais radiculares foram inundados com EDTA 17% por 3 minutos. A irrigação final foi realizada com 5 mL de solução salina. Sucessivas lavagens com água destilada foram realizadas para remoção de NaOCl durante 4 dias.

A região apical foi selada com resina composta fotopolimerizável (3M ESPE, St. Paul, EUA) e a superfície radicular externa impermeabilizada com duas camadas de adesivo epóxi Araldite (Brascola, Joinville, SC, Brasil), exceto na região cervical. Os espécimes foram aleatoriamente distribuídos em placas de cultura de 24 poços e fixados com resina acrílica ativada quimicamente (Oliveira *et al.* 2007) e esterilizadas em óxido de etileno (Acecil, Campinas, Brasil).

Os canais radiculares foram contaminados com 20 µL de inóculo bacteriano padronizado em 10^7 UFCMI⁻¹ e incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 21 dias, em umidade relativa. A cada 2 dias, novo meio de cultura esterilizado, BHI, foi adicionado aos canais radiculares. Além dos grupos experimentais, o controle negativo não recebeu a suspensão bacteriana, recebendo somente o meio de cultura esterilizado, atestando, desta maneira, a eficácia da esterilização. O controle positivo não recebeu nenhuma medicação intracanal, demonstrando a viabilidade bacteriana durante o experimento.

Coleta microbiológica

As coletas microbiológicas foram realizadas com os canais radiculares inundados com solução salina estéril e introduzidos dois cones de papel absorvente estéril (40/.02), um após outro, por 1 minuto cada e inseridos em tubo Eppendorf contendo 1 mL de solução salina.

Após o período de contaminação (21 dias) foi realizada a coleta inicial (C1) para confirmação da contaminação por *E. faecalis*. Os canais radiculares foram reinstrumentados com lima tipo K ISO 40 e irrigados com solução salina estéril. Os canais radiculares foram inundados com solução de EDTA 17% por 3 minutos e irrigados com 5 mL de solução salina estéril. As MIC foram inseridas com auxílio de agulha e seringa. Uma mecha de algodão esterilizada foi adaptada nas entradas dos canais radiculares e os espécimes foram armazenados em estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, em microaerofilia, por 7 dias.

A remoção das MIC foi realizada com limas tipo K ISO 40 e os canais irrigados com 10 mL de solução salina fisiológica estéril. Foi utilizado 1 mL de ácido cítrico a 0,5%, como agente neutralizante. A irrigação final foi realizada com 1 mL de solução salina estéril e foi realizada a coleta C2 (pós medicação intracanal).

Após C2, os canais radiculares foram preenchidos com solução salina estéril. Os espécimes foram incubados em estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, em microaerofilia e umidade relativa por 7 dias. Após este período realizou-se a coleta C3 (7 dias após remoção das MIC) para verificação de possível recolonização do canal principal.

Análise microbiológica

Os tubos de polietileno contendo os dois cones de papel absorvente foram agitados em vortex por 1 minuto. Diluições decimais seriadas foram realizadas e alíquotas de 20 μL de cada uma das diluições foram plaqueadas em placas de Petri, contendo *Tryptic Soy Ágar* (TSA-Difco). As placas foram incubadas em microaerofilia a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. O crescimento microbiano foi determinado por contagem de UFCmL^{-1} e transformados em $\log_{10}$.

Análise estatística

Os dados obtidos das coletas microbiológicas e avaliação de pH foram submetidos ao teste estatístico ANOVA e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados

Determinação do pH das soluções em tubos de polietileno

Durante todos os períodos de observação, o grupo controle (H₂O destilada) apresentou menor pH quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). No período de 12 horas, HC/PL apresentou maior pH, porém, sem diferença estatística quando comparado ao HC/FAR 4,5/PL ($p > 0,05$). No período de 3 dias, HC/PL apresentou menor capacidade de alcalinização. Nos períodos de 7 e 21 dias, menor alcalinização foi observada para HC/FAR 9 ($p > 0,05$). Após 28 dias, todos os grupos foram semelhantes ($p > 0,05$) (**Tabela 1**).

Tabela 1 Médias de pH e desvio padrão das medicações intracanal nos diferentes períodos observacionais

Período	Medicações intracanal			
	HC/FAR 4,5/PL	HC/FAR 9/PL	HC/PL	Controle
12 h	8,688 ($\pm 0,632$) ^{a,b}	8,652 ($\pm 0,369$) ^b	9,197 ($\pm 0,292$) ^a	6,710 ($\pm 0,058$) ^c
1 d	8,178 ($\pm 0,447$) ^a	7,817 ($\pm 0,232$) ^a	7,983 ($\pm 0,548$) ^a	6,736 ($\pm 0,149$) ^b
3 d	8,408 ($\pm 0,309$) ^a	8,290 ($\pm 0,189$) ^{a,b}	8,055 ($\pm 0,341$) ^b	7,085 ($\pm 0,187$) ^c
7 d	8,066 ($\pm 0,307$) ^{a,b}	7,836 ($\pm 0,124$) ^b	8,170 ($\pm 0,126$) ^a	6,794 ($\pm 0,182$) ^c
14 d	8,367 ($\pm 0,336$) ^{a,b}	8,098 ($\pm 0,353$) ^a	8,495 ($\pm 0,186$) ^b	7,142 ($\pm 0,269$) ^c
21 d	8,155 ($\pm 0,419$) ^a	7,648 ($\pm 0,225$) ^b	8,247 ($\pm 0,476$) ^a	7,089 ($\pm 0,158$) ^c
28 d	7,779 ($\pm 0,259$) ^a	7,781 ($\pm 0,163$) ^a	7,854 ($\pm 0,226$) ^a	7,250 ($\pm 0,243$) ^b

HC: hidróxido de cálcio; FAR: farnesol; PL: polietilenoglicol 400; Controle: água destilada.

*Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos em cada período ($p < 0,05$).

Difusão de íons hidroxila em dentina bovina

De maneira geral, o grupo C2, espécimes completamente impermeabilizados, apresentou menor pH quando comparado aos demais grupos. O grupo C1 apresentou pH superior ao grupo C2, entretanto, inferior aos grupos contendo as MIC. Em todos os períodos analisados, HC/FAR 4,5/PL, HC/FAR 9/PL E HC/PL apresentaram capacidades de alcalinização semelhante. Os maiores valores de pH foram observados em períodos mais prolongados (**Tabela 2**).

Tabela 2 Médias de pH e desvio padrão das medicações intracanal nos diferentes períodos observacionais

Período	Medicações intracanal			C 1	C 2
	HC/FAR4,5/PL	HC/FAR9/PL	HC/PL		
1 d	7,364	7,604	7,566	7,318	7,078
	($\pm 0,254$) ^{a,b}	($\pm 0,200$) ^a	($\pm 0,191$) ^{a,b}	($\pm 0,106$) ^{b,c}	($\pm 0,095$) ^c
3 d	7,140	7,156	7,339	7,084	6,793
	($\pm 0,112$) ^{a,b}	($\pm 0,120$) ^a	($\pm 0,300$) ^{a,b}	($\pm 0,064$) ^{b,c}	($\pm 0,175$) ^c
7 d	7,397	7,712	7,685	7,265	6,553
	($\pm 0,166$) ^a	($\pm 0,553$) ^a	($\pm 0,529$) ^a	($\pm 0,140$) ^{a,b}	($\pm 0,548$) ^b
14 d	7,718	7,926	7,993	7,206	6,367
	($\pm 0,238$) ^{a,b}	($\pm 0,440$) ^a	($\pm 0,549$) ^a	($\pm 0,124$) ^b	($\pm 0,263$) ^c
21 d	7,793	7,874	8,205	7,336	6,869
	($\pm 0,332$) ^{a,b}	($\pm 0,365$) ^a	($\pm 0,453$) ^a	($\pm 0,240$) ^{b,c}	($\pm 0,323$) ^c
28 d	7,713	7,672	7,694	7,457	7,234
	($\pm 0,224$) ^a	($\pm 0,208$) ^a	($\pm 0,218$) ^a	($\pm 0,077$) ^{a,b}	($\pm 0,080$) ^b
60 d	8,185	8,141	8,215	7,942	7,490
	($\pm 0,057$) ^a	($\pm 0,063$) ^a	($\pm 0,140$) ^a	($\pm 0,217$) ^b	($\pm 0,079$) ^c

HC: hidróxido de cálcio; FAR: farnesol; PL: polietilenoglicol 400; C 1: espécimes com cavidades e sem medicação intracanal; C 2: espécimes sem cavidades e sem medicação intracanal. *Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos em cada período ($p < 0,05$).

Contato direto sobre células planctônicas

Todas as MIC utilizadas foram eficazes em eliminar células planctônicas de *Enterococcus faecalis* nos períodos de 1 e 3 minutos (**Tabela 3**).

Tabela 3 Média e (desvio padrão) do número de UFCmL⁻¹ (log 10) após os períodos de contato de 1 e 3 minutos.

Período	Medicações intracanal			Controle
	HC/FAR4,5/PL	HC/FAR9/PL	HC/PL	
1 min	0 ^a	0 ^a	0 ^a	7,846 ($\pm 0,360$) ^b
3 min	0 ^a	0 ^a	0 ^a	7,830 ($\pm 0,356$) ^b

HC: hidróxido de cálcio; FAR: farnesol; PL: polietilenoglicol 400; Controle: número de UFCmL⁻¹ (log10) de células planctônicas de *Enterococcus faecalis*. *Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos em cada período ($p < 0,05$).

Contato direto sobre biofilme

Após o período de contato de 6 horas todas as MIC foram efetivas em reduzir biofilme. Entretanto, o melhor resultado foi observado nos grupos HC/FAR4,5/PL e HC/FAR9/PL quando comparado ao HC/PL ($p < 0,05$) (**Tabela 4**).

Tabela 4 Média (desvio padrão) do número de UFCmL⁻¹ (log 10) das MIC após período de contato de 6 horas.

Período	Medicações intracanal			Controle
	HC/FAR4,5/PL	HC/FAR9/PL	HC/PL	
6 h	4,541 ($\pm 1,046$) ^a	4,471 ($\pm 0,892$) ^a	5,869 ($\pm 0,459$) ^b	7,483 ($\pm 0,095$) ^c

HC: hidróxido de cálcio; FAR: farnesol; PL: polietilenoglicol 400; Controle: número de UFCmL⁻¹ (log10) de *Enterococcus faecalis*. *Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Contaminação de canais radiculares de dentes de humanos *ex vivo*

C1 não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$). A C2 comprovou que todas as MIC foram capazes de eliminar bactérias presentes na luz do canal radicular, não apresentando diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). Na coleta C3, as MIC contendo FAR apresentaram maior efetividade ($p < 0,05$) (**Tabela 5**).

Tabela 5 Média (desvio padrão) do número de UFCmL⁻¹ (log 10) nas diferentes coletas realizadas

Coleta	Medicações intracanal			Controle
	HC/FAR 4,5/PL	HC/FAR 9/PL	HC/PL	
C1	6,669 ($\pm 0,333$) ^a	6,838 ($\pm 0,337$) ^a	6,716 ($\pm 0,549$) ^a	6,678 ($\pm 0,547$) ^a
C2	0 ^a	0 ^a	0 ^a	6,048 ($\pm 0,478$) ^b
C3	1,068 ($\pm 1,785$) ^a	0,4875 ($\pm 1,542$) ^a	3,294 (2,336) ^{a,b}	5,725 ($\pm 0,400$) ^b

HC: hidróxido de cálcio; FAR: farnesol; PL: polietilenoglicol 400; Controle: dentes contaminados com *Enterococcus faecalis* que não receberam medicação intracanal. *Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos em cada coleta ($p < 0,05$).

Discussão

O comportamento de liberação de íons hidroxila por uma MIC à base de HC é importante, uma vez que o seu efeito antimicrobiano é atribuído à liberação de íons hidroxila, que se difundem através de túbulos dentinários até a superfície externa da raiz (Andreasen *et al.* 2006). Estes íons são radicais livres com alto poder de

reatividade (Tanomaru-Filho *et al.* 2011), capacidade de destruir componentes estruturais da membrana celular das bactérias e diminuir a atividade biológica celular, causando efeito letal para microrganismos (Zmener *et al.* 2007).

No presente estudo, todas as MIC foram capazes de alcalinizar o meio. No período correspondente a 12 horas houve rápida liberação de íons hidroxila para HC/PL. Após 1 dia, as MIC apresentaram pH semelhantes. De um modo geral, a adição do FAR não alterou a capacidade de dissociação iônica da MIC. HC/FAR 9/PL a liberação de íons foi levemente prejudicada em comparação ao HC/PL em alguns períodos ($p < 0,05$). Este fato pode ser explicado, uma vez que a capacidade de liberação de íons pode ser afetada se forem incorporadas substâncias ou veículos diferentes ao HC (Pacios *et al.* 2004). FAR apresenta-se como óleo, podendo contribuir para a dissociação mais lenta de íons. No entanto, pequena alteração foi observada uma vez que o veículo para todas as pastas foi viscoso (polietilenoglicol 400).

Dentes bovinos foram utilizados previamente para avaliação do pH (Guerreiro-Tanomaru *et al.* 2012). Os resultados da difusão de íons hidroxila em dentina bovina mostraram que nos primeiros períodos de análise, o pH da solução foi menor quando comparado a períodos mais prolongados, provavelmente, este fato se deve à dificuldade dos íons hidroxila se difundirem por meio dos túbulos dentinários, atingindo o meio externo. Entretanto, a capacidade destes íons em alcançar o meio externo é muito importante para que a MIC atue em todo o sistema de canais radiculares (Andreasen *et al.* 2006). Além disso, é possível observar que o grupo C1 (presença de cavidade na superfície radicular, porém, sem MIC) apresentou maior pH que o grupo C2 (sem MIC e completamente impermeabilizado), evidenciando a capacidade tampão da dentina (Haapasalo *et al.* 2000). Os três grupos contendo MIC comportaram-se de maneira semelhante quanto a capacidade de dissociação iônica, assim, a incorporação de FAR ao HC não interferiu na liberação de íons hidroxila, concordando com alguns autores que adicionaram outras substâncias ao HC (Yücel *et al.* 2007, Souza-Filho *et al.* 2008, Guerreiro-Tanomaru *et al.* 2012).

Todas as medicações foram eficientes na completa eliminação de células de *E. faecalis* em sua forma planctônica. Estes resultados corroboram com achados encontrados previamente no qual medicações à base de hidróxido de cálcio foram efetivas durante curto período de contato (Aguilar *et al.* 2015).

E. faecalis apresenta organização em biofilme após incubação em blocos de dentina bovina em período próximo de 14 dias (Guerreiro-Tanomaru *et al.* 2013, Nascimento *et al.* 2014). A dentina bovina para este tipo de experimento foi utilizada previamente devido similaridades com a dentina de dentes de humanos (Ordinola-Zapata *et al.* 2013, Guerreiro-Tanomaru *et al.* 2013). Entretanto, após o período de 6 horas de contato entre a suspensão das MIC com o biofilme, a presença do FAR proporcionou melhores resultados.

A contaminação de canais radiculares de dentes de humanos por *Enterococcus faecalis* durante 21 dias para avaliação da atividade antimicrobiana tem sido indicada (Guerreiro-Tanomaru *et al.* 2015, Aguiar *et al.* 2015) possibilitando a formação de biofilme não apenas a luz do canal radicular, mas também no sistema de canais radiculares.

HC apresenta atividade antimicrobiana (Mohammadi & Dummer 2011), inibição da reabsorção dentária e indução de formação de tecido mineralizado (Mizuno M & Banzai, 2008), estimulação de proliferação de osteoblastos (Yang *et al.* 2006) e capacidade de inativação de endotoxinas bacterianas (Tanomaru *et al.* 2003). O presente estudo confirma a necessidade de associação do HC a substâncias antimicrobianas na tentativa de potencializar a sua efetividade, especialmente contra *Enterococcus faecalis*.

FAR é um composto hidrofóbico e pode se acumular na membrana celular de bactérias, comprometendo a integridade celular e, conseqüentemente, promovendo extravasamento de material intracelular (Jabra-Rizk *et al.* 2006, Gomes *et al.* 2011). FAR demonstra efetividade em reduzir biomassa de biofilme, atuar contra bactérias em biofilmes já estabelecidos (Alves *et al.* 2013a) e induzir alterações na matriz do biofilme (Katragkou *et al.* 2015). FAR apresenta efeito sinérgico quando associado a antifúngicos como fluconazol e anfotericina B (Katragkou *et al.* 2015), além disso, apresenta efeito contra células planctônicas e biofilme de *S. mutans* (Horev *et al.* 2015). O presente estudo mostra que a associação do FAR ao HC apresenta excelente potencial para uso como MIC.

Os resultados deste estudo na coleta realizada logo após a remoção das MIC mostram eliminação dos micro-organismos no canal principal, conforme demonstrado previamente (Lima *et al.* 2012). Após a remoção das MIC e manutenção de solução salina nos canais radiculares, é possível recuperar micro-organismos viáveis no

interior dos túbulos dentinários (Lima *et al.* 2012, Aguiar *et al.* 2015, Guerreiro-Tanomaru *et al.* 2015). Deste modo, na coleta C3, aumento no número de UFCmL⁻¹ foi observado em todos grupos. Entretanto, quando utilizado o FAR combinado ao HC, a recuperação destes micro-organismos foi menor, evidenciando a capacidade do FAR em combater *E. faecalis*. HC/FAR 4,5/PL apresentou 3 entre 10 culturas positivas de *E. faecalis* em C3. HC/FAR 9/PL apresentou 1 entre 10 culturas positivas em C3. Apresentando resultados menos satisfatórios, HC/PL apresentou 7 entre 10 culturas positivas de *E. faecalis* e, em comparação a C1 houve recuperação de 49,04% de micro-organismos em C3. Uma provável justificativa consiste na resistência do *E. faecalis* ao HC (Lima *et al.* 2012, Afkhami *et al.* 2015).

Os resultados deste estudo evidenciam a atividade antimicrobiana do FAR quando associado ao HC contra *E. faecalis*. Alves *et al.* (2013a) mostraram a capacidade do FAR em combater *E. faecalis* em biofilmes por meio de contaminação de dentes *ex vivo*. Biofilmes de *Staphylococcus epidermidis* na presença de FAR apresentaram menor biomassa e alterações na composição da matriz, demonstrando a sua efetividade antibiofilme (Gomes *et al.* 2011).

Conclusões

Diante das metodologias utilizadas, é possível concluir que a adição do Farnesol ao hidróxido de cálcio nas concentrações estudadas não alterou a capacidade de liberação de íons hidroxila. A associação do Farnesol ao hidróxido de cálcio apresenta maior atividade antimicrobiana quando comparado ao HC contra *Enterococcus faecalis*.

Referências

1. Afkhami F, Pourhashemi SJ, Sadegh M, Salehi Y, Fard MJK (2015) Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Dentistry* **43**, 1573-9.
2. Aguiar AS, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria G, Leonardo RT, Tanomaru-Filho M (2015) Antimicrobial Activity and pH of Calcium Hydroxide and Zinc Oxide Nanoparticles Intracanal Medication and Association with Chlorhexidine. *Journal of Contemporary Dental Practice* **16**, 624-9.

3. Alves FRF, Silva MG, Rôças IN, Siqueira Jr JF (2013) Biofilm biomass disruption by natural substances with potential for endodontic use. *Brazilian Oral Research* **27**, 20-5(a).
4. Alves FRF, Neves MAS, Silva MG, Rôças IN, Siqueira Jr JF (2013) Antibiofilm and Antibacterial Activities of Farnesol and Xylitol as Potential Endodontic Irrigants. *Brazilian Dental Journal* **24**: 224-9(b).
5. 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. *Endodontic Topics* **14**, 93-101.
6. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ (2002) Biofilm formation in medicated root canals. *Journal of Endodontics* **28**, 689-93.
7. Gomes F, Teixeira P, Cerca N, Azeredo J, Oliveira R (2011) Effect of farnesol on structure and composition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm matrix. *Current Microbiology* **63**, 354-59.
8. Guerreiro-Tanomaru JM, Chula DG, Lima RKP, Berbert FLCV, Tanomaru-Filho M (2012) Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. *Dental Traumatology* **28**, 320–23.
9. Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M (2013) Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *Journal of Endodontics* **39**, 346-50.
10. Guerreiro-Tanomaru JM, Chávez-Andrade GM, Faria-Júnior NB, Watanabe E, Tanomaru-Filho M (2015) *Effect of Passive Ultrasonic Irrigation on Enterococcus faecalis* from Root Canals: An Ex Vivo Study. *Brazilian Dental Journal* **26**, 342-6.
11. Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TMT, Ørstavik D, Haapasalo MPP (2000) Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an *in vitro* study. *International Endodontic Journal* **33**, 126-31.

12. Jabra-Rizk MA, Meiller TF, James CE, Shirtliff ME (2006) Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **50**, 1463-69.
13. Katragkou A, McCarthy M, Alexander EL, Antachopoulos C, Meletiadis J, Jabra-Rizk MA, Petraitis V, Roilides E, Walsh TJ (2015) *In vitro* interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **70**, 470-8.
14. Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA, et al. (2005) Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. *Journal of Dental Research* **84**, 1016-20.
15. Lana PEP, Scelza MFZ, Silva LE, Mattos-Guaraldi AL, Hirata-Júnior R (2009) Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in root canal systems. *Brazilian Dental Journal* **20**, 32–6.
16. Lima RKP, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M (2012) Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus fecalis*. *International Endodontic Journal* **45**, 311–16.
17. Love RM (2001) *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *International Endodontic Journal* **34**, 399-405.
18. 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. *International Endodontic Journal* **41**, 933-8.
19. Mohammadi Z, Dummer PMH (2011) Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *International Endodontic Journal* **44**, 697–730.
20. Mohammadi Z, Shalavi S (2012) Is chlorhexidine an ideal vehicle for calcium hydroxide? A microbiologic review. *Iranian Endodontic Journal* **7**, 115-22.

21. Nascimento CA, Tanomaru-Filho M, Faria-Júnior NB, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM (2014) Antimicrobial activity of root canal irrigants associated with cetrimide against biofilm and planktonic *Enterococcus faecalis*. *The Journal of Contemporary Dental Practice* **15**, 603-7.
22. Oliveira LD, Jorge AOC, Carvalho CAT, Koga-Ito Cy, Valera MC (2007) *In vitro* effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology* **104**, 135-42.
23. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Garcia RB, et al. (2013) The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intraorally infected dentin. *Acta Odontologica Scandinavica* **71**, 424-31.
24. Pacios MG, de la Casa ML, de Bulacio MA, López ME (2004) Influence of different vehicles on the pH of calcium hydroxide pastes. *Journal of Oral Science* **46**, 107–11.
25. Ramage G, Saville SP, Wickes BL, Lopez-Ribot JL (2002) Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 5459-63.
26. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KR (2004) Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *Journal of Endodontics* **30**, 315-20.
27. Saatchi M, Shokraneh A, Navaei H, Maracy MR, Shojaei H (2014) Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Applied Oral Sciences* **22**, 356-65.
28. Siqueira JF, Lopes HP (1999) Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *International Endodontic Journal* **32**, 361–9.
29. Souza-Filho FJ, Soares AJ, Vianna ME, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPFA (2008) Antimicrobial Effect and pH of Chlorhexidine Gel and Calcium Hydroxide Alone and Associated with other Materials. *Brazilian Dental Journal* **19**, 28-33.

30. Tanomaru-Filho M, Leonardo MR, Silva LAB (2002) Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *Journal of Endodontics* **28**, 295–9.
31. Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA (2003) Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *International Endodontic Journal* **36**, 733–9.
32. 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. *Journal of Applied Oral Sciences* **19**, 1-5.
33. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B (2014) Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of Endodontics* **40**, 285-90.
34. Yang WK, Kim MR, Lee Y, Son HH, Lee W (2006) Effect of calcium hydroxide-treated *Prevotella nigrescens* on the gene expression of matrix metalloproteinase and its inhibitor in MG63 cells. *Journal of Endodontics* **32**, 1142–5.
35. Yücel AC, Aksoy A, Ertas E, Güvenç D (2007) The pH changes of calcium hydroxide mixed with six different vehicles. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* **103**, 712–17.
36. Zmener O, Pameijer CH, Banegas G (2007) An *in vitro* study of the pH of three calcium hydroxide dressing materials. *Dental Traumatology* **23**, 21-5.

5 CONCLUSÃO

Diante das metodologias utilizadas, é possível concluir que:

- I. O óleo de melaleuca e clorexidina associados ao hidróxido de cálcio apresentam maior atividade antimicrobiana quando comparado ao hidróxido de cálcio contra *Enterococcus faecalis*.
- II. A adição do óleo de melaleuca e clorexidina ao hidróxido de cálcio nas concentrações estudadas não alterou a capacidade de liberação de íons hidroxila.
- III. A associação do farnesol ao hidróxido de cálcio apresenta maior atividade antimicrobiana quando comparado ao hidróxido de cálcio contra *Enterococcus faecalis*.
- IV. A adição do farnesol ao hidróxido de cálcio nas concentrações estudadas não alterou a capacidade de liberação de íons hidroxila.
- V. Estas medicações intracanal apresentam potencial para utilização clínica.

REFERÊNCIAS*

1. Alves FRF, Silva MG, Rôças IN, Siqueira Jr JF. Biofilm biomass disruption by natural substances with potential for endodontic use. *Braz Oral Res.* 2013; 27(1): 20-5.
2. Ammons MC, Ward LS, Fisher ST, Wolcott RD, James GA. *In vitro* susceptibility of established biofilms composed of a clinical wound isolate of *Pseudomonas aeruginosa* treated with lactoferrin and xylitol. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33(3): 230-6.
3. Andreasen J, Jensen L, Christensen SSA. Relationship between calcium hydroxide pH levels in the root canals and periodontal healing after replantation of avulsed teeth. *Endod Topics.* 2006; 14(1): 93-101.
4. Baumgartner JC, Siqueira JF, Sedgley CM, Kishen A. Microbiology of endodontic disease. In: Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC. *Ingle's endodontics* 6th ed. Hamilton: BC Decker; 2008: p 221–2.
5. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Int J Food Microbiol.* 2004; 94(3): 223–53.
6. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.* 1985; 1(5): 170–5.
7. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(1): 50-62.
8. Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. *In vitro* and *in vivo* activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(3): 327–32.
9. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Ann Rev Microbiol.* 1995; 49: 711-45.
10. De Souza-Filho FJ, Soares A de J, Vianna ME, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J.* 2008; 19(1): 28-33.
11. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002; 28(10): 689-93.
12. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2): 167-93.
13. George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2005; 31(12): 867-72.

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

14. Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod*. 2009; 35(10): 1350-3.
15. Gomes F, Teixeira P, Cerca N, Azeredo J, Oliveira R. Effect of farnesol on structure and composition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm matrix. *Curr Microbiol*. 2011; 63(4): 354-9.
16. Gomes BPFA, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JFA, Souza-Filho FJ, Ferraz CCR. Chlorhexidine in Endodontics. *Braz Dent J*. 2013; 24(2): 89-102.
17. Greay SJ, Ireland DJ, Kissick HTA, Levy MW, Beilharz TV, Riley CF, et al. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010; 65(5): 877-88.
18. Haapasalo M, Udnaes T, Endal U. Persistent, recurrent and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endod Topics*. 2003; 6: 29-56.
19. Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm Res*. 2000; 49(11): 619-26.
20. Jabra-Rizk MA, Meiller TF, James CE, Shirtliff ME. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(4): 1463-9.
21. Katsuyama M, Ichikawa H, Ogawa S, Ikezawa Z. A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. *J Dermatol Sci*. 2005; 38(3): 197-205.
22. Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA, et al. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. *J Dent Res*. 2005; 84(11): 1016-20.
23. Koo H, Jeon JG. Naturally occurring molecules as alternative therapeutic agents against cariogenic biofilms. *Adv Dent Res*. 2009; 21(1): 63-8.
24. Kwiecinski J, Eick S, Wójcik K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 33(4): 343-7.
25. Lana PEP, Scelza MFZ, Silva LE, Mattos-Guaraldi AL, Hirata-Júnior R. Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in root canal systems. *Braz Dent J*. 2009; 20(1): 32-6.
26. Lee SH, Baek DH. Antibacterial and neutralizing effect of human β -defensins on *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid. *J Endod*. 2012; 38(3): 351-6.

27. 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.
28. Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J. 2001; 34(5): 399-405.
29. Minami M, Kita M, Nakaya T, Yamamoto T, Kuriyama H, Imanishi J. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication *in vitro*. Microbiol Immunol. 2003; 47(9): 681–4.
30. Mizuno M, Banzai Y. 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. 2008; 41(11): 933-8.
31. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. Int Dent J. 2008; 58(6): 329–41
32. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. Int Endod J. 2011; 44(8): 697–730.
33. Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. J Endod. 1990; 16(12): 580-8.
34. Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod. 2005; 99(2): 231-52.
35. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. Int Endod J. 2006; 39(4): 249-81.
36. Nelson R. In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. J Antimicrob Chemother. 1997; 40(2): 305–6.
37. Oyen, LPA, Dung, NX. Plant resources of south-east Asia No. 19: essential-oil plants. Wageningen: Leiden: Backhuys Publishers; 1999: p277.
38. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. J Endod. 2000; 26(10): 593-5.
39. Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. J Endod. 1987; 13(1): 29-39.

40. Ramage G, Saville SP, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(11): 5459-63.
41. Ricucci D, Siqueira JF. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010; 36(8): 1277-88.
42. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004; 30(5):315-20.
43. Rosenberg LE, Carbone AL, Romling U, Uhrich KE, Chikindas ML. Salicylic acid-based poly (anhydride esters) for control of biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Lett Appl Microbiol.* 2008; 46(5): 593-9.
44. Serper A, Özbek M, Çalt S. Accidental sodium hypochlorite-induced skin injury during endodontic treatment. *J Endod.* 2004; 30(3): 180-1.
45. Siqueira JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001; 34(1): 1-10.
46. Siqueira Jr JF, Rôças IN, Ricucci D. Biofilm in endodontic infection. *Endod Topics.* 2010; 22(1): 33-49.
47. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000.* 2002; 28(1): 12-55.
48. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006; 32(2): 93-8.
49. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen: ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endod Topics.* 2003; 6(1):3–28.
50. 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.
51. Tanomaru-Filho M, Leonardo MR, Silva LAB. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *J Endod.* 2002; 28(4): 295–9.
52. Tanomaru-Filho M, Saçaki JN, Faleiros FB, Guerreiro-Tanomaru JM. pH and calcium ion release evaluation of pure and calcium hydroxide-containing Epiphany for use in retrograde filling. *J Appl Oral Sci.* 2011; 19(1): 1-5.
53. Valero M. Plant oils and anti-pathogen immune stimulation. In: Watson RR, Preedy VR. *Botanical Medicine in Clinical Practice.* Cambridge: CAB International; 2008: p. 164–74.

54. Vera J, Siqueira Jr FJ, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, et al. One-versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod*. 2012; 38(8): 1040-52.
55. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza FJ, Gomes BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immun*. 2007; 22(6): 411-8.
56. Wilkinson JM, Cavanagh HMA. Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. *Phytother Res*. 2005; 19(7): 643–6.
57. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod*. 2014; 40(2): 285-90.
58. Yang WK, Kim MR, Lee Y, Son HH, Lee W. Effect of calcium hydroxide-treated *Prevotella nigrescens* on the gene expression of matrix metalloproteinase and its inhibitor in MG63 cells. *J Endod*. 2006; 32(12):1142–5.
59. Zmener O, Pameijer CH, Banegas G. An *in vitro* study of the pH of three calcium hydroxide dressing materials. *Dent Traumatol*. 2007; 23(1): 21-5.

ANEXOS

1. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos.

	FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA - UNESP													
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP														
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA														
Título da Pesquisa: Estudo do pH e atividade antimicrobiana sobre <i>Enterococcus faecalis</i> de medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio associada ao óleo de melaleuca e fomesol														
Pesquisador: Juliane Maria Guerreiro Tanomaru														
Área Temática:														
Versão: 2														
CAAE: 47788615.7.0000.5416														
Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP														
Patrocinador Principal: MINISTERIO DA EDUCACAO														
DADOS DO PARECER														
Número do Parecer: 1.280.669														
Apresentação do Projeto: O pesquisador responsável encaminha o projeto e outros documentos após pendência de reunião: 1-Verificar se o nome correto do óleo é malaleuca ou melaleuca. 2-Qual a concentração inibitória mínima dos dois óleos? Por que está usando nas concentrações de 10% e 20%? Justifique os motivos. 3-Qual a forma de obtenção do óleo de malaleuca/melaleuca? Será produzido ou comprado. Se o óleo for comprado, acrescentar no orçamento do protocolo.														
Objetivo da Pesquisa: O objetivo desta pesquisa será avaliar a efetividade antimicrobiana contra <i>Enterococcus faecalis</i> e pH de medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio em associação ao óleo de melaleuca e fomesol. Os objetivos específicos serão: 1-Determinar o pH por meio de tubos de polietileno 2-Avaliar a propriedade antibacteriana por meio de teste de contato direto sobre células planctônicas 3-Avaliar a propriedade antibacteriana por meio de contato direto sobre biofilme 4-Avaliar a difusão de íons hidroxila em dentina bovina 5-Avaliar a propriedade antibacteriana / antibiofilme em dentes humanos ex vivo.														
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Riscos: serão minimizados aos pesquisadores durante o exame radiográfico a fim de padronizar os														
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">Endereço: HUMAITA 1680</td> <td style="width: 33%;"></td> <td style="width: 33%;"></td> </tr> <tr> <td>Bairro: CENTRO</td> <td></td> <td>CEP: 14.801-903</td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: ARARAQUARA</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (16)3301-6459</td> <td></td> <td>E-mail: cep@foar.unesp.br</td> </tr> </table>			Endereço: HUMAITA 1680			Bairro: CENTRO		CEP: 14.801-903	UF: SP	Município: ARARAQUARA		Telefone: (16)3301-6459		E-mail: cep@foar.unesp.br
Endereço: HUMAITA 1680														
Bairro: CENTRO		CEP: 14.801-903												
UF: SP	Município: ARARAQUARA													
Telefone: (16)3301-6459		E-mail: cep@foar.unesp.br												



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 1.280.660

espécimes, pois será utilizado um sistema radiográfico digital juntamente com uma caixa de chumbo. No laboratório de Ensaios Microbiológicos, os profissionais envolvidos farão uso de EPIs indicados quanto ao Mapa de Risco de cada ambiente.

Benefícios: estão relacionados às observações com relação as buscas de novas medicações intracanal, com o objetivo de desenvolver melhores materiais com potencial utilização clínica que visem aumentar os casos de sucesso na terapia endodôntica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A partir dos testes que serão conduzidos com as associações entre hidróxido de cálcio associado ao óleo de melaleuca 4,5 e 9,0%, farnesol 4,5 e 9,0% ou clorexidina 0,4% espera-se obter aumento da atividade antimicrobiana / antibiofilme contra *Enterococcus faecalis* e manutenção do pH elevado destas associações por períodos mais prolongados quando comparado à pasta Calen isolada, potencializando o efeito contra *E. faecalis*.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os arquivos sobre o projeto, informações básicas so projeto, banco de dentes, folha de rosto, termo de compromisso, devolução de material biológico, declaração de ressarcimento, autorização para uso de laboratórios e TCLE foram apresentados. A resposta a pendência encontra-se no projeto: os óleos essenciais serão adquiridos comercialmente da marca Sigma. A determinação das concentrações dos óleos essenciais foram determinadas a partir de estudos prévios realizados pela pesquisadora responsável quanto a concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). A proposta é avaliar a atividade antimicrobiana destes óleos essenciais associados ao hidróxido de cálcio no intuito de substituição ao Paramonoclorofenol canforado utilizado atualmente nas medicações intracanal. As concentrações reais na pasta foram alteradas com relação ao projeto inicial, pois o cálculo anteriormente havia sido realizado quanto a porcentagem no veículo (polietilenoglicol 400) e não na quantidade final da pasta, portanto as concentrações de 10 e 20% em veículo, na pasta representaram 4,5 e 9% destes óleos.

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação do projeto de pesquisa para seu desenvolvimento, comunicando a pesquisadora responsável que o termo de compromisso enviado em cumprir as normas do CEP, não está com o nome da Coordenadora atual do CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores esperam que a partir dos resultados desta pesquisa possam ser obtidas associações com potencial capacidade de utilização como medicação intracanal na terapia

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 1.280.889

endodôntica.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO em reunião de 14 de Outubro de 2015.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_541872.pdf	30/09/2015 22:20:48		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	30/09/2015 22:19:42	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
Outros	Banco_de_dentes.pdf	29/09/2015 14:53:11	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	25/09/2015 13:12:20	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_de_compromisso.pdf	21/09/2015 15:57:59	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
Outros	Devolucao_material_biologico.pdf	21/09/2015 15:57:18	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
Outros	declaracao_nao_ressarcimento.pdf	21/09/2015 15:56:28	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
Outros	Autorizacao_lab_micro.pdf	21/09/2015 15:55:20	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
Outros	Autorizacao.pdf	21/09/2015 15:54:24	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	20/09/2015 23:11:21	Juliane Maria Guerreiro Tanomaru	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 1.280.889

Não

ARARAQUARA, 14 de Outubro de 2015

Assinado por:
Andréa Gonçalves
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 30 de março de 2018

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 30 de março de 2016

RODRIGO ARRUDA VASCONCELOS