

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Daniel de Lima Dalla Lana

**EFICÁCIA DE CINCO PROTOCOLOS DE
DESCONTAMINAÇÃO FINAL CONTRA
ENTEROCOCCUS FAECALIS E SEUS
EFEITOS NA FORÇA DE ADESÃO DO
MATERIAL OBTURADOR À DENTINA**

Passo Fundo

2016

Daniel de Lima Dalla Lana

**EFICÁCIA DE CINCO PROTOCOLOS DE
DESCONTAMINAÇÃO FINAL CONTRA
ENTEROCOCCUS FAECALIS E SEUS
EFEITOS NA FORÇA DE ADESÃO DO
MATERIAL OBTURADOR À DENTINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UPF, para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Odontológica, sob orientação do Prof. Dr. Matheus Albino Souza.

Passo Fundo

2013

Folha reservada para
Ata de aprovação da Banca Examinadora

Observação:
Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.
Após, faça a substituição pela Ata de aprovação fornecida pela
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

Folha reservada para
Ficha catalográfica

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.
Após, faça a substituição pela Ficha Catalográfica fornecida pela
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo amparo nos momentos difíceis suprindo minhas necessidades tornando a conquista deste objetivo possível.

A FAPERGS pela bolsa concedida ao Programa de Pós-graduação, a qual possibilitou minha formação.

Aos Professores Dr. Matheus Albino Souza e Dr. Doglas Cecchin pelas orientações durante o desenvolvimento da pesquisa, as Professoras Dra. Paula Benetti e Dra. Ana Paula Farina pela ajuda na realização dos testes de push out, e aos demais Professores do Programa de Pós-graduação pela experiência compartilhada, ensinamentos, dicas e principalmente amizade cultivada ao longo destes dois anos.

Ao Professor Dr. Francisco Montagner pela disponibilidade para participação na Banca de defesa de dissertação.

Ao acadêmico e agora colega Ezequiel Gabrielli pela parceria para realização da etapa microbiológica desta pesquisa.

A Fabiana Pimentel, secretária e amiga do PPGOdonto, pelo seu trabalho e dedicação, sempre disponível para passar as informações pertinentes ao programa de pós-graduação.

Aos colegas e amigos de Mestrado pela amizade e conhecimento difundidos durante todo o período do curso.

À minha Família pelo incentivo, paciência, ajuda e compreensão nos momentos difíceis.

À minha namorada Tábata por seu companheirismo e ajuda durante esta etapa de nossas vidas.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	5
SUMÁRIO.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
<i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>	18
CLOREXIDINA.....	28
QMIX.....	41
EXTRATO DE SEMENTE DE UVA.....	48
TERAPIA FOTODINÂMICA.....	54
FORÇA DE ADESÃO.....	78
3. PROPOSIÇÃO.....	85
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	87
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	116
6. CONCLUSÕES.....	143
REFERÊNCIAS.....	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão do percentual de redução de <i>Enterococcus faecalis</i> (%)	118
Tabela 2 - Força de adesão do teste de push out (MPa) e padrão de falha do material obturador (%)	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Padronização do comprimento das raízes	88
Figura 2 - Motor endodôntico X-Smart Plus e sistema ProTaper Universal	89
Figura 3 - Selamento do forame apical com resina composta, impermeabilização com cianocrilato e fixação no interior do eppendorf com silicona pesada	91
Figura 4 - Caixa de polipropileno	91
Figura 5 - Câmara de fluxo laminar, Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo	93
Figura 6 - <i>Enterococcus faecalis</i> , coloração de gram	96
Figura 7 - Esquema de coleta inicial	97

Figura 8 - Cânula Navi-Tip calibre 30 para irrigação	98
Figura 9 - Fibra óptica intracanal	101
Figura 10 - Grupo 5 (PDT com fibra)	102
Figura 11 - Tratamento do grupo 6 (PDT sem fibra)	103
Figura 12A - Cone de papel absorvente F3	107
Figura 12B - Cimento obturador AH Plus	107
Figura 13 - Amostra fixada em placa de acrílico com cera pegajosa, acoplada a cortadeira metalográfica	108
Figura 14 - Disco de dentina sendo submetido ao teste de push out	110
Figura 15 - Microscópio Zeiss – medida do perímetro do canal	110

Figura 16A - Fluxograma da metodologia utilizada: teste microbiológico e MEV	113
Figura 16B - Fluxograma da metodologia utilizada: push out	114
Figura 16C – Fluxograma da metodologia utilizada: padrões de falha	115
Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura: imagens de microscopia eletrônica de varredura ilustrando a efetividade de redução de <i>Enterococcus faecalis</i> de cada protocolo de descontaminação final. DW = água destilada; CHX = clorexidina líquida 2%; QMix; GSE = extrato de semente de uva 6,5%; PDT = terapia fotodinâmica	120
Figura 18 - Unidades formadoras de colônias: imagem das placas de Petri exemplificando a coleta inicial e a coleta final de uma das amostras de um dos grupos de tratamento, comparando a efetividade da redução de <i>Enterococcus faecalis</i> - (Grupo 6 – terapia fotodinâmica sem fibra)	121

LISTA DE ABREVIATURAS

PDT – Photodynamic Therapy
MEV – Microscopio Eletrônico de Varredura
SEM – Scanning Electron Microscope
DW – Distilled Water
CHX – Clorexidina
GSE – Grape Seed Extract
UFC – Unidade Formadora de Colônia
ANOVA – Análise da Variância
PCR – Polymerase Chain Reaction
DNA – Desoxyribonucleic Acid
RNA – Ribonucleic Acid
VAI – Vascular Access Infection
HOMD – Human Oral Microbiome Database
TSB – Tryptic Soy Broth
NaOCl – Hipoclorito de Sódio
PUI – Passive Ultrasonic Irrigation
NUI – Non Ultrasonic Irrigation
CFU – Colony Forming Unit
CLSM – Confocal Laser Scanning Microscope
FISH – Fluorescence *In Situ* Hybridization
MIC – Mínima Concentração Inibitória
PAs – Proantocianidinas
BHI – Brain Heart Infusion
PCA – Plate Count Agar
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

RESUMO

Introdução: O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de cinco protocolos de descontaminação final no combate ao *Enterococcus faecalis* e sua influência na força de adesão do material obturador à dentina radicular. **Metodologia:** Noventa raízes humanas padronizadas em 15 mm de comprimento, preparadas com o sistema ProTaper, foram divididas aleatoriamente em 6 grupos e esterilizadas. Sessenta raízes (n=10) foram contaminadas com *Enterococcus faecalis* e submetidas aos seguintes protocolos: 1- água destilada (controle), 2- clorexidina líquida 2%, 3- QMix, 4- extrato de semente de uva 6,5%, 5- terapia fotodinâmica com fibra óptica e 6- terapia fotodinâmica sem fibra óptica. O percentual de redução de UFCs foi verificado e imagens em MEV foram obtidas para ilustrar a redução bacteriana. As 30 amostras restantes foram submetidas aos mesmos protocolos (n=5), obturadas e utilizadas para o push out. O teste one-way ANOVA foi utilizado separadamente para a análise microbiológica e push out, seguido pelo post hoc de Tukey. **Resultados:** A maior redução bacteriana foi observada para clorexidina, QMix e extrato de semente de uva, sem diferença estatisticamente significativa entre eles. A terapia fotodinâmica, com e sem fibra óptica, demonstrou uma redução bacteriana significativamente maior do que a água destilada ($p<0,05$). Para o push out todos os protocolos demonstraram valores de força de adesão semelhantes ($p<0,05$). **Conclusão:** Clorexidina 2%, QMix e extrato de semente de uva foram mais efetivos do que a terapia fotodinâmica no combate ao *Enterococcus faecalis*, no entanto, os protocolos de descontaminação final não interferiram na força de adesão do material obturador à dentina.

Palavras chave: clorexidina, *Enterococcus faecalis*, extrato de semente de uva, força de adesão, QMix, push out, terapia fotodinâmica.

ABSTRACT¹

Introduction: The aim of this study was evaluate the effectiveness of five final decontamination protocols against *Enterococcus faecalis* and its effects on bond strength of filling material to root canal dentin. **Methods:** Ninety human roots standardized in 15 mm of length were prepared with ProTaper system, divided randomly in six groups and sterilized. Sixty roots (n=10) were inoculated with *Enterococcus faecalis* and submitted to the following protocols: 1- distilled water (control), 2- 2% chlorhexidine solution, 3- QMix, 4- 6.5% grape seed extract, 5- photodynamic therapy with optical fiber and 6- photodynamic therapy without optical fiber. The percentage of reduction of CFUs was checked and SEM images were obtained to illustrate the bacterial reduction. The remaining 30 samples were submitted to the same protocols (n=5), filled and used to push out. One-way ANOVA test was applied separated in the microbiological and push out tests, followed by Tukey's HSD post hoc procedure, at a significance level of 5%. **Results:** The greater bacterial reduction was observed for 2% chlorhexidine, QMix and 6.5% grape seed extract, with no statistically significant difference between them. Photodynamic therapy, with and without optical fiber, showed a significantly higher reduction than distilled water ($p<0.05$). For the push out test, final decontamination protocols showed similar bond strength values ($P>0.05$). **Conclusion:** 2% chlorhexidine, QMix and 6.5% grape seed extract were more effective than photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis*. Furthermore, the final decontamination protocols did not affect the bond strength values.

Key words: bond strength, chlorhexidine, *Enterococcus faecalis*, grape seed extract, QMix, photodynamic therapy, push out.

¹Effectiveness of five final decontamination protocols against *Enterococcus faecalis* and its effects on bond strength of filling material to root canal dentin

1. INTRODUÇÃO

Ainda hoje, os dois maiores desafios da terapia endodôntica são representados pela otimização do processo de desinfecção do canal radicular, bem como a prevenção da recontaminação por meio de uma adequada obturação e blindagem do sistema de canais.

O controle bacteriano tem papel fundamental na endodontia e é considerado seu principal objetivo. Atualmente, o protocolo de preparo dos canais, em conjunto com as substâncias químicas auxiliares, embora considerado satisfatório não garante a inativação completa da contaminação (Ordinola-Zapata *et al.*, 2013), e a infecção residual ainda é uma causa comum dos insucessos da terapia endodôntica.

Dentre os microrganismos contaminantes dos canais, destaca-se o *Enterococcus faecalis*, que possui a capacidade de se adaptar as mudanças severas no meio, invadir túbulos dentinários (Chivatxaranukul *et al.*, 2008; Ran *et al.*, 2015) e principalmente desenvolver biofilme (Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2013), tornando a eliminação completa da infecção

inatingível, promovendo infecções persistentes (Elakanti *et al.*, 2015) que impossibilitam o reparo apical.

Com o objetivo de promover uma melhor descontaminação, aproximando-se da sonhada esterilização deste sistema de canais, protocolos suplementares de desinfecção têm sido amplamente estudados, e tratamentos adjuvantes têm sido propostos: Uma irrigação final com clorexidina 2% tem atingido resultados bastante satisfatórios na maioria dos estudos, destacando a substantividade e largo espectro deste composto. Outro tratamento estudado é o uso da terapia fotodinâmica (PDT), que inicialmente idealizada para o combate ao câncer vem ganhando espaço na odontologia devido a sua efetividade antimicrobiana. Pesquisas também apontam para o uso do Qmix, uma solução com capacidade bactericida e ao mesmo tempo efeito quelante. E por fim, com o constante aumento da resistência bacteriana e a presença de efeitos adversos dos irrigantes sintéticos, produtos derivados de plantas fitoterápicas surgem como uma nova alternativa, é o caso do extrato da semente de uva o qual possui atividade antibacteriana.

Mesmo que a desinfecção seja uma das etapas mais importantes do tratamento endodôntico, a obturação e

selamento dos canais radiculares é um passo crucial em direção ao sucesso da endodontia, pois irá prevenir as recontaminações e possíveis recidivas da infecção. Portanto, uma atenção especial deve ser dada a possibilidade de interação entre as soluções irrigantes e cimentos obturadores, uma vez que a força de adesão dos cimentos pode estar suscetível a ação dos resíduos destas soluções (Ok *et al.*, 2013).

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de descontaminação de cinco protocolos de descontaminação final na terapia endodôntica, em canais de dentes humanos extraídos infectados com *Enterococcus faecalis*, bem como, avaliar seu efeito na força de adesão do material obturador à dentina radicular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

ENTEROCOCCUS FAECALIS

Fouad *et al.* (2005) buscaram identificar a presença de *Enterococcus faecalis* em casos de insucessos endodônticos utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento molecular, e determinar se a prevalência de *E. faecalis* é aumentada em pacientes diabéticos. 40 casos de retratamento foram selecionados e incubados em caldo de tioglicolato 37°C e extraído o DNA. O PCR foi utilizado para identificar filogeneticamente a espécie através do marcador genético 14 *Enterococcus spp.* Três casos foram eliminados porque os pacientes estavam em uso de antibióticos ou o dente não apresentou radiolucidez perirradicular. Os 37 casos restantes, incluindo seis pacientes diabéticos, tiveram oito amostras positivas para *E. faecalis*, destes, 6 (19%) eram de não diabéticos e 2 (33%) de pacientes diabéticos. Filogeneticamente, todas as sequências de amostras positivas corresponderam a *E. faecalis*, sendo a única espécie de enterococos detectada, com uma prevalência geral de 22%.

Gomes *et al.* (2006) pesquisaram a presença de *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas através de testes de reação em cadeia da polimerase (PCR) e cultura microbiana. As amostras microbiológicas foram obtidas a partir de 50 dentes com polpas necróticas não tratadas (infecção primária) e de 50 dentes com falha do tratamento endodôntico (infecção secundária). Foram utilizadas as técnicas de cultura, incluindo diluição em série, chapeamento, incubação e identificação bioquímica. Para a análise por PCR foi utilizado um primer específico para espécies do 16S DNAr. Cultura e PCR detectaram o *E. faecalis* em 23 dos 100 e 79 dos 100 dentes, respectivamente. A espécie alvo foi cultivada em 2 (4%) de 50 canais com polpa necrótica e em 21 (42%) de 50 canais tratados endodônticamente. Já o PCR identificou a espécie em 41 (82%) amostras nas infecções primárias e 38 (76%) nas infecções secundárias.

Cogulu *et al.* (2008) avaliaram a presença de patógenos em amostras de canais radiculares, de dentes decíduos e permanentes, utilizando o método de PCR e determinaram a associação desses microrganismos com os sintomas clínicos de infecções endodônticas. 145 crianças de 5 a 13 anos de idade participaram do estudo. Foram identificados os

seguintes patógenos nos dentes infectados: *Actinomyces israelii*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus intermedius*, *Treponema denticola*, *Parvimonas micra*, *Tannerella forsythensis*, *Enterococcus faecium*, *Prevotella melaninogenica*. *T. denticola* e *E. faecalis* foram altamente associados com radiolucidez periapical e dor anterior, enquanto em dentes decíduos e permanentes sensíveis a percussão pode-se associar a presença de *P. gingivalis*.

Sassone *et al.* (2008) verificaram a microbiota de infecções endodônticas primárias em dentes com ou sem fistula. As amostras foram coletadas após instrumentação com uma lima #15 H-file e duas pontas de papel estéreis de 30 casos. A presença de 40 espécies bacterianas foi determinada pelo método de hibridação ADN-ADN. As espécies encontradas com maior prevalência foram: *Fusobacterium nucleatum sp. vincentii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Veillonella parvula*, *Enterococcus faecalis*, *Campylobacter gracilis* e *Neisseria mucosa*. As contagens bacterianas totais foram semelhantes entre os dentes com e

sem uma fistula. *E. faecalis*, *Streptococcus anginosus*, *Capnocytophaga sputigena* e *Capnocytophaga gingivalis* tinham contagens significativamente mais elevadas na ausência de fistula. Níveis mais elevados de *P. gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum sp. nucleatum* foram observadas em casos com fistula. *Buccalis Leptotrichia* e *Porphyromonas endodontalis* foram associadas a indivíduos com maior chance de fistula.

Chivatxaranukul *et al.* (2008) analisaram capacidade de invasão e a predileção de *Enterococcus faecalis* nas paredes dos túbulos dentinários. A capacidade de invasão dos túbulos dentinários foi medida após 8 semanas de incubação em dentes humanos *ex vivo*. Extensão e profundidade máxima de invasão túbular foram avaliados histologicamente; a aderência foi avaliada após a fratura vertical, exposição dos túbulos dentinários e contaminação com estirpes de *Enterococcus faecalis* resistentes a eritromicina, aerobicamente por 2 horas e analisadas com microscopia eletrônica de varredura calculando o número de células por 100 microns. A invasão dos túbulos dentinários mostrou-se moderada após 8 semanas, no estudo de adesão havia significativamente mais bactérias aderidas a linha de fratura

que nas paredes dos túbulos dentinários. Com relação a parede tubular, a adesão foi maior na dentina interior comparada a porção mais externa, e maior quando a adesão bacteriana foi testada em meio definido quimicamente do que em solução salina tamponada com fosfato.

Zhu *et al.* (2010) investigaram a prevalência, o fenótipo e o genótipo de *Enterococcus faecalis* extraídos da saliva e de canais de pacientes com insucesso no tratamento endodôntico. Foram coletadas amostras de 32 adultos submetidos a retratamento de lesões periapicais após tratamento endodôntico realizado nos últimos 2 anos. Para identificação do *E. faecalis* foram utilizados os testes API20 STREP e 16S RNA, além de testes fenotípicos e genótipos para detecção de genes de virulência. Das 19 amostras isoladas de *E. faecalis*, seis eram da saliva e 13 dos canais radiculares, em três pacientes as amostras isoladas da saliva apresentaram maior resistência a gentamicina e os genes, *ace*, *asa*, *gelE*, *cylA*, and *efaA*, apresentaram correlação em todas as amostras.

Chavez De Paz (2012) testou a capacidade de quatro bactérias do canal radicular em estabelecer uma comunidade multiespécies, determinando as características estruturais,

fisiológicas e a composição desta comunidade. Foram isoladas as seguintes estirpes *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus gordonii*, e *Enterococcus faecalis*, cultivadas juntas em um sistema de célula miniflow, além de avaliar a viabilidade celular e os parâmetros de biovolume, utilizando um corante Redox de fluorescência para determinar a atividade metabólica do biofilme bacteriano. As quatro espécies testadas foram capazes de formar comunidades estáveis e reprodutíveis, mostrando um crescimento contínuo ao longo do tempo. No entanto, na ausência de glicose mostrou biovolumes significativamente menores. Uma elevada proporção de células viáveis (>90%) foi observada, e o crescimento do biofilme estava correlacionado com a atividade metabólica celular. A estrutura em meio rico não mudou consideravelmente nas primeiras 120 horas, período no qual o *E. faecalis*, *L. salivarius*, e *S. gordonii* foram mais abundantes.

D'amato-Palumbo *et al.* (2013) avaliaram os microrganismos de possível origem oral associados às infecções de acesso vascular (VAI), durante o período de 10 anos em pacientes sob hemodiálise, através do Human Oral

Microbiome Database (HOMD). Dos 218 registros identificados, 65 pacientes apresentaram coletivamente 115 episódios VAI. Os microrganismos mais envolvidos foram: *Staphylococcus aureus* (49,6% de infecções), *Staphylococcus epidermidis* (10,4%), *Serratia marcescens* (10,4%), *Pseudomonas aeruginosa* (9,6%), e *Enterococcus faecalis / fecum* (8,7%). Segundo o HOMD o risco de ocorrer uma VAI sendo causada por microrganismos provenientes da cavidade oral é muito pequena.

Guerreiro-Tanomaru *et al.* (2013) analisaram a contribuição do *Enterococcus faecalis* na formação de biofilme em diferentes substratos. Placas infectadas com *E. faecalis* foram utilizadas para o crescimento de biofilme em dentina e osso bovino, gutta-percha e hidroxiapatita. Os substratos foram incubados a 37°C durante 14 ou 21 dias, e o meio foi trocado a cada 48 horas. Após os períodos de indução do crescimento, as amostras (n = 5 por grupo e por período de indução) foram coradas usando o Live / Dead, e as imagens foram analisadas ao microscópio confocal. Neste caso a formação do biofilme foi observada em todos os grupos, a gutta-percha teve o menor volume total em 14 dias e a

hidroxiapatita mais elevada aos 21 dias, no entanto ao final dos 21 dias o volume de todas as amostras eram semelhantes.

Tennert *et al.* (2014) analisaram a microbiota de pacientes submetidos a tratamento de infecções endodônticas persistentes primárias e secundárias, relacionados aos aspectos clínicos e radiográficos. Foram coletadas amostras de 21 pacientes através de cones de papel esterilizados, as amostras foram plaqueadas, e, em seguida, os microrganismos foram isolados e identificados morfológicamente por análise bioquímica e sequenciação dos genes de RNAr 16S de microrganismos isolados. Em 12 dos 21 canais foram isoladas 33 espécies de bactérias, 12 anaeróbios facultativos e 21 anaeróbios obrigatórios. *E. faecalis* foi mais frequentemente isolado em infecções endodônticas secundárias e a *Moraxella osloensis* foi isolada a partir de uma infecção endodôntica secundária, que tinha obturação do canal radicular insuficiente acompanhada de uma leve sensação de dor.

Murad *et al.* (2014) investigaram a microbiota de canais radiculares após insucessos no tratamento endodôntico, afim de, identificar e quantificar os microrganismos existentes. Amostras microbiológicas foram retiradas de 36 canais

radiculares com infecção endodôntica persistente e as espécies bacterianas foram determinadas pelo quadriculado hibridização DNA-DNA. Os mais altos níveis encontrados foram das seguintes espécies: *Enterococcus faecium*, *Dialister pneumosintes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Helicobacter pylori* com diferença estatística significativa entre bactérias gram-negativas e gram-positivas. Também pode-se observar nesse estudo uma correlação entre a área da lesão periapical e os níveis de espécies gram-negativas.

Vengerfeldt *et al.* (2014) realizaram um trabalho com pacientes que não tiveram contato com antibióticos para revelar as comunidades bacterianas presentes no tratamento endodôntico, através do sequenciamento Illumina (Illumina Inc, San Diego, CA). As amostras foram coletadas em condições assépticas rigorosas a partir de 12 dentes (5 com CAP primário, 3 com CAP secundário, e 4 com um abscesso periapical), caracterizando o perfil da comunidade microbiana. Os resultados dessa análise demonstraram comunidades altamente polimicrobianas nos três grupos pesquisados, sendo as mais frequentes, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. As comunidades foram individualmente diferentes, mas as bactérias anaeróbias predominaram como

regra. O *Enterococcus faecalis* foi encontrado apenas em pacientes com PAC secundário.

De acordo com Antunes *et al.* (2015) a maioria dos estudos sobre dentes tratados endodonticamente focam apenas no canal principal, não distinguindo regiões nem a complexa anatomia dos canais, além disso, a maioria desses estudos fornecem apenas dados de prevalência. Nesse caso, o estudo foi desenhado para realizar a contagem total e a presença de patógenos exclusivamente endodônticos na porção apical do sistema de canais radiculares após tratamento de periodontite apical. Foram obtidos 27 espécimes, com periodontite apical persistente, durante cirurgia perirradicular, e utilizada em tempo real uma reação em cadeia da polimerase para quantificar o total de bactérias. Vinte e um dentes apresentaram bactérias, sendo as mais prevalentes *Streptococcus* (76%), *Actinobacteria* (52%) e *Pseudoramibacter alactolyticus* (19%). Já o *Enterococcus faecalis* foi encontrado em apenas 3 casos.

Ran *et al.* (2015) analisaram a capacidade de invasão de túbulos dentinários por *Enterococcus faecalis*. Foram infectados 40 dentes humanos unirradiculares em pH alcalino e condições de estresse nutricional. Os canais foram

padronizados e após 4 semanas de contaminação as raízes foram divididas verticalmente em duas metades: uma metade foi processada para análise de formação de biofilme usando um microscópio eletrônico de varredura, a outra metade foi corada com reagentes fluorescentes e a profundidade de invasão tubular dos microrganismos foi examinada MEV confocal. A estirpe de *E. faecalis* resultou na formação de biofilme e invasão dos túbulos dentinários sob todas as condições de estresse, com exceção de pH 11 e 12, no entanto, a distância de penetração túbulo foi drasticamente reduzida nestas condições de stress em comparação com em caldo triptico de soja (TSB) ou pH 7. A profundidade de invasão na dentina na porção medial da raiz foi significativamente maior do que nas secções apicais em TSB e meio de privação de energia.

CLOREXIDINA

Weber *et al.* (2003) realizaram um estudo com a finalidade de avaliar o efeito da ativação ultrassônica passiva da clorexidina 2% e NaOCl 5,25% na atividade antimicrobiana residual em canais radiculares. Foram

utilizados 94 dentes humanos extraídos divididos em 5 grupos: I- canais preparados com clorexidina 2%; II- preparo com clorexidina 2% mais ativação ultrassônica passiva durante 1 minuto; III- preparo com NaOCl 5,25%; IV- preparo com NaOCl 5,25% mais ativação ultrassônica passiva durante 1 minuto; e V- preparo com solução salina (controle negativo). Os resultados demonstraram uma atividade antimicrobiana residual com clorexidina 2% estatisticamente superior ao NaOCl 5,25%, com apenas irrigação ou irrigação seguida de ativação ultrassônica passiva. Os grupos experimentais tratados com clorexidina permitiram atividade antimicrobiana residual por até 168h após o tratamento, enquanto que o NaOCl 5,25% não demonstrou atividade alguma após 48h. Possivelmente a remoção da lama dentinária, seguida da irrigação final com clorexidina 2% ativada com ultrassom resultará em um aumento da atividade antimicrobiana residual. Por outro lado, NaOCl demonstra capacidade de dissolução de tecidos, o que é de suma importância para a instrumentação do canal. Futuros estudos devem ser realizados afim de verificar se a clorexidina 2% como irrigante e medicação intracanal na presença de sangue,

plasma e outros fluídos é tão efetiva quanto o NaOCl, até lá não poderá ser considerado superior ao hipoclorito de sódio.

Quando comparada ao hipoclorito de sódio, a clorexidina é relativamente não tóxica, apresenta amplo espectro e possui uma ação residual com um menor potencial de efeitos adversos. A fim de verificar a eficácia antibacteriana deste irrigante, Ercan *et al.* (2004) utilizaram 30 incisivos e pré-molares com um único canal, apresentando necrose pulpar e/ou lesão apical de 20 pacientes. Foram utilizados hipoclorito de sódio 5,25% e clorexidina 2% como irrigantes dos canais. A clorexidina demonstrou ser tão eficaz quando o hipoclorito de sódio, e pode ser uma alternativa como irrigante em relação à atividade antimicrobiana, porém não apresenta capacidade de dissolução de tecido orgânico.

Estudos demonstram que as principais causas para o insucesso da terapia endodôntica são: microrganismos persistentes no interior do canal radicular e a recolonização do canal obturado, geralmente associados ao *Enterococcus faecalis* organizado na forma de biofilme. Apenas a ação mecânica dos instrumentos endodônticos não é capaz de sanificar o canal, sendo imprescindível o uso de soluções irrigantes com atividade antimicrobiana de amplo espectro,

efetivas contra microrganismos facultativos ou anaeróbios organizados em biofilme, capacidade de dissolução de tecido pulpar remanescente, poder de inativação de endotoxinas e prevenção da formação de lama dentinária ou dissolução da mesma. A clorexidina, desenvolvida em 1940, é um potente antisséptico utilizado na odontologia para controle de placa bem como solução irrigadora para endodontia, porém não deve ser indicada como irrigante padrão pelo fato de não apresentar capacidade de dissolução dos remanescentes pulpares. No entanto é a solução mais indicada para o protocolo final de irrigação, uma vez que possui afinidade pelos tecidos duros do elemento dental, prolongando seu efeito antimicrobiano num fenômeno chamado substantividade. Algum cuidado deve ser tomado a cerca de sua interação com o hipoclorito de sódio, o que pode causar o escurecimento dental. Afim de se evitar tal acontecimento, deve-se antes do uso da clorexidina, remover o hipoclorito do interior dos canais por meio de secagem ou lavagem com solução salina (Zehnder, 2006).

Arias-Moliz *et al.* (2009) testaram a concentração mínima de soluções irrigantes para a erradicação do biofilme de *Enterococcus faecalis*. Verificaram que o NaOCl foi

bastante efetivo na erradicação do biofilme nas concentrações de 0,00625%, 0,0015625% e 0,00078125 durante 1, 5 e 10 minutos de exposição respectivamente. A clorexidina demonstrou ser menos efetiva, necessitando ao menos 5 minutos de contato na concentração de 2% e 1% em 10 minutos. A solução de EDTA 17% não demonstrou atividade antimicrobiana em nenhum intervalo de tempo testado.

A clorexidina tem sido amplamente utilizada como irrigante ou medicação intra-canal, em alguns estudos demonstrou ser mais eficiente do que o hipoclorito de sódio 5,25% contra *Enterococcus faecalis*, e em combinação com peróxido de hidrogênio 3% tem sua atividade antibacteriana amplificada. Além disso, apresenta substantividade, ou seja, a capacidade de ligar-se aos tecidos circundantes e ser liberada lentamente por um maior período de tempo, 72h a 4 semanas. Estudos demonstram que o crescimento bacteriano organizado em biofilme é muito difícil de ser eliminado e que a clorexidina 2% não foi capaz de rompê-lo. Sendo assim, o hipoclorito de sódio é a única solução irrigante capaz de causar seu rompimento, o que também se aplica à capacidade de dissolução de tecido orgânico, a qual tem sido a principal desvantagem da clorexidina. Alguns autores sugerem o uso

de hipoclorito de sódio a fim de se eliminar o tecido orgânico, em seguida o uso de EDTA 17% para remoção da lama dentinária e na sequência o uso de clorexidina no intuito de ampliar o poder de desinfecção devido sua substantividade, porém a interação química entre o hipoclorito de sódio e a clorexidina pode levar à alteração de cor do elemento dentário e o precipitado formado por esta interação interfere no selamento do material obturador. Quando utilizada como medicação intra-canal, os autores demonstram que a clorexidina é mais efetiva do que o hidróxido de cálcio em eliminar *E. faecalis* e que se misturados, sua efetividade antimicrobiana pode ser aumentada. A respeito da adesão dentinária, a clorexidina apresenta ação inibidora de metaloproteinases, que causariam degradação do colágeno desprotegido da camada híbrida levando às falhas na adesão de restaurações. Utilizada clinicamente nas concentrações indicadas a biocompatibilidade da clorexidina é aceitável, e em raros casos pode causar reações alérgicas (Mohammadi e Abbott, 2009).

Mehrvarzfar *et al.* (2011) testaram a hipótese de que a combinação da terapia envolvendo laser e soluções irrigantes seria capaz de eliminar completamente o *Enterococcus*

faecalis do interior dos túbulos dentinários do canal radicular. Foram utilizados 106 dentes humanos unirradulares, as amostras tiveram os canais ampliados, foram esterilizadas e contaminadas com *Enterococcus faecalis*. As unidades experimentais foram divididas em em 2 grupos (n=48), os quais foram subdivididos em 4 grupos (n=12): 1A- Solução salina (5ml) durante 5 minutos; 1B- NaOCl 2,5% (5ml) durante 5 minutos; 1C- Clorexidina 2% (1,2ml) durante 1 minuto; 1D- MTAD (5ml) durante 5 minutos. Para os grupos 2A, 2B, 2C e 2D os mesmos protocolos foram utilizados e após secagem dos canais foi realizada irradiação com laser durante 5 segundos, repetidas por 5 vezes, com intervalo de 15 segundos a cada ciclo de irradiação. Foi utilizado o diodo de GaAlAs, levado ao canal com ponta de fibra óptica. Após contagem de CFU foi observada a ausência de crescimento bacteriano para a associação de MTAD e laser, sem diferenças estatísticas para as associações do laser com de NaOCl 2,5% e clorexidina 2%. Por outro lado, o emprego das soluções sem irradiação a laser, revelou a superioridade das soluções de NaOCl 2,5% e clorexidina 2% na desinfecção, em relação à solução de MTAD. O emprego do diodo de laser,

sem associação com irrigantes, foi capaz de reduzir em 80% a contaminação bacteriana.

Paiva *et al.* (2012) avaliaram o efeito antimicrobiano do preparo químico-mecânico utilizando instrumentação rotatória aliada a irrigação com NaOCl 2,5% e EDTA 17% (após instrumentação), seguida de uma desinfecção suplementar através de PUI (irrigação passiva ultrassonificada) ou irrigação final com clorexidina 2%. A detecção microbiana foi realizada através da cultura e medida da reação de polimerase (PCR). Foram selecionados 1 dente por paciente, com periodontite apical, tendo as paredes da câmara pulpar intactas, totalizando 27 elementos dentários. Após instrumentação os protocolos suplementares foram aplicados: 13 elementos foram submetidos à PUI e 14 elementos à irrigação final com clorexidina 2%. Todos os grupos apresentaram a permanência de microrganismos cultiváveis após o preparo químico-mecânico, demonstrando a necessidade de uma terapia suplementar. Concluíram que ambas as terapias suplementares resultam na diminuição dos casos de cultura bacteriana positiva. No entanto, as terapias não foram capazes de produzir canais livres de bactérias.

Beus *et al.* (2012) compararam o efeito de dois protocolos de irrigação endodôntica para eliminação de bactérias do sistema de canais radiculares. O objetivo foi: 1- comparar o efeito antimicrobiano da irrigação ultrassônica passiva com a irrigação não ultrassônica. 2- verificar o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio como medicação intracanal pós instrumentação. 3- observar o efeito antimicrobiano de uma segunda exposição à instrumentação e irrigação. 4- comparar a capacidade antimicrobiana de tratamentos em sessão única e duas sessões. Foram selecionados 50 pacientes apresentando indicação endodôntica primária, necrose pulpar e lesão periapical. Os dentes foram preparados utilizando instrumentos rotatórios ProTaper e NaOCl 1% e em seguida os pacientes foram divididos em dois grupos (n=25) PUI (irrigação ultrassônica passiva) e NUI (irrigação não ultrassônica). Amostras foram coletadas após acesso endodôntico; instrumentação/irrigação; início da segunda sessão, após uso do hidróxido de cálcio por 7 dias; e antes da obturação, após segunda instrumentação/irrigação. Não foram observadas diferenças significativas para redução bacteriana em relação a PUI (84%) e NUI (80%). Após a medicação intracanal 87% das

amostras atingiram cultura bacteriana negativa, enquanto que após a segunda intervenção as amostras atingiram 91% de culturas negativas, também sem diferença significativa. Portanto, embora o uso de hidróxido de cálcio como medicação intracanal durante 7 dias tenha diminuído a infecção bacteriana, uma exposição a segunda intervenção de instrumentação e irrigação também é um fator importante na redução da contaminação; e a alta taxa de culturas negativas alcançada em uma sessão para ambos os grupos, é provavelmente o resultado do grande volume de solução irrigante assim como a maior profundidade de inserção da cânula irrigadora no interior dos canais radiculares.

Vaziri *et al.* (2012) testaram a eficácia bactericida da terapia fotodinâmica, hipoclorito de sódio a 2,5%, clorexidina a 2% e PDT/NaOCl 2,5% em canais infectados com *Enterococcus faecalis*. Ao realizar contagem de CFU verificaram redução significativa para todos os grupos testados. A PDT e a clorexidina 2% apresentaram efeitos antibacterianos moderados enquanto que NaOCl 2,5% foi significativamente mais elevado, porém a associação de PDT/NaOCl 2,5% obteve os melhores resultados, atingindo 100% de eliminação de *Enterococcus faecalis*, utilizando o

seguinte protocolo: NaOCl 2,5% durante 5 minutos, aplicação do fotosensibilizador (azul de toluidina a 15 µg/ml) e exposição a energia luminosa (potência de 200 mw/cm² e comprimento de onda de 625 nm), não sendo utilizada ponteira de fibra óptica.

Ordinola-Zapata *et al.* (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio, clorexidina 2% e pasta triantibiótica em um modelo de biofilme em dentina infectada de maneira intra-oral. Foram utilizadas 40 secções de dentina bovina esterilizadas, as quais foram fixadas em um dispositivo ortodôntico utilizado por um voluntário durante 72 horas. As amostras ficaram imersas nos agentes antimicrobianos durante 7 dias. A pasta triantibiótica tinha na composição Metronidazol (flagyl 250mg), minociclina (100mg) e ciprofloxacino (250mg) (500 mg de cada antibiótico foi homogeneizada de forma a obter um pó, o qual foi misturada ao propilenoglicol na proporção de 7 partes de pó para 4 de propilenoglicol). Como grupo controle foi utilizada solução salina. Após 7 dias, as amostras foram lavadas em solução salina, e cinco exemplares de cada grupo foram avaliados imediatamente após lavagem, outros 5 exemplares de cada grupo foram reincubados durante 24h

(n=10). Os resultados demonstraram que a pasta de hidróxido de cálcio apresentou a atividade antimicrobiana mais fraca, e que a mistura triantibiótica obteve a maior atividade antimicrobiana com ou sem 24 horas de reincubação. A clorexidina e o hidróxido de cálcio não demonstraram diferença significativa imediatamente após a lavagem das amostras, porém após o período de reincubação, a clorexidina 2% apresentou estatisticamente menor número de células viáveis, enquanto que o hidróxido de cálcio apresentou um aumento de células viáveis, demonstrando que o efeito alcalino pode ser neutralizado, e que o biofilme pode aumentar a proporção de células viáveis quando novos nutrientes estão disponíveis. Quando comparadas a clorexidina 2% e a pasta triantibiótica após período de reincubação não foram observadas diferenças significativas, possivelmente pelo fato da clorexidina e da monociclina apresentarem substantividade. No entanto, os medicamentos utilizados nesse estudo, não foram capazes de eliminar 100% das bactérias, sugerindo que uma prévia desorganização do biofilme por meio do tratamento com hipoclorito de sódio pode ser uma condição necessária para aprimorar o efeito das medicações intra-canais.

Böttcher *et al.* (2015) realizaram um estudo com objetivo de correlacionar a viabilidade bacteriana do *Enterococcus faecalis* e a presença da solução de clorexidina 2% no tecido dentinário de dentes humanos extraídos. As unidades experimentais contaminadas permaneceram em contato com as soluções testadas durante o período de 5 minutos, sendo incubadas após este período. Amostras foram coletadas após, 48 horas, 7 dias e 30 dias de incubação. Os resultados demonstraram que a clorexidina 2% diminuiu significativamente o número de células viáveis no período de 48 horas, comparada ao grupo controle que utilizou solução salina. A mesma diferença foi mantida para as amostras coletadas após 7 dias de incubação. Após 30 dias de incubação a clorexidina apresentou um aumento no número de células viáveis demonstrando resultados similares ao grupo controle. Os autores concluíram que a presença de clorexidina 2% nos períodos de 48 horas e de 7 dias está associada a baixa porcentagem de células viáveis no biofilme de *Enterococcus faecalis*, e que os microrganismos no tecido dentinário humano não afetaram a presença da clorexidina 2%.

QMIX

Dai *et al.* (2011) realizaram um estudo a fim de verificar o efeito do irrigante Qmix na remoção da smear layer e detritos das paredes do canal radicular. Foram utilizados 50 dentes humanos extraídos. Após o preparo dos canais, foram aplicados protocolos de irrigação final com Qmix, MTAD, água destilada e EDTA 17%. Os resultados foram avaliados por meio de MEV e demonstraram uma melhor remoção de smear layer e detritos no terço cervical seguido pelo médio e apical, não havendo diferenças significativas entre os grupos tratados com EDTA e Qmix, no entanto nenhuma das soluções demonstrou eficácia na remoção completa de detritos e smear layer do interior dos canais radiculares.

Ma *et al.* (2011) realizaram um estudo com o propósito de padronizar um método para quantificar a efetividade da desinfecção de diferentes soluções antibacterianas. Para isso, foi utilizado o método de centrifugação das raízes dentárias imersas em uma suspensão de *Enterococcus faecalis*. A presença das bactérias no interior dos túbulos dentinários foi confirmada através de imagens em MEV. Após contaminadas, as raízes foram submetidas a tratamentos de 1 e 3 minutos com as seguintes substâncias:

água estéril; NaOCl nas concentrações de 1%, 2% e 6%; clorexidina 2% e Qmix. Para a avaliação da proporção de células vivas ou mortas foi utilizado o método de CLSM (microscópio de escaneamento a laser confocal), o qual demonstrou uma grande invasão bacteriana no interior dos túbulos dentinários, bem como o aumento da morte celular quando concentrações mais elevadas de NaOCl eram utilizadas. O Qmix demonstrou-se tão efetivo quanto o NaOCl 6%, eliminando 40% e 60% das bactérias em 1 minuto e 3 minutos respectivamente. O NaOCl 1%, 2% e clorexidina 2% eliminaram 20%-30% e 30%-40% das bactérias após 1 e 3 minutos respectivamente. Não foram verificadas diferenças significativas entre os 3 agentes utilizados. A conclusão do estudo foi de que este método de centrifugação para contaminação bacteriana, ajuda na promoção de uma grande contaminação na dentina e que o método CLSM possibilita a comparação da efetividade de diferentes soluções antimicrobianas, na capacidade de promover a morte bacteriana no interior dos túbulos dentinários.

Com o objetivo de avaliar a efetividade de desinfecção endodôntica contra biofilmes jovens e “velhos” de *Enterococcus faecalis*. Wang *et al.* (2012) contaminaram

blocos de raízes dentárias humanas pelo método da centrifugação. Os biofilmes de 1 dia e os de 3 semanas de desenvolvimento foram submetidos a tratamentos de 1 minuto e 3 minutos de contato com: NaOCl (hiplorito de sódio) 2%, NaOCl 6%, clorexidina 2% e QMix. As proporções de células viáveis e não viáveis foram verificadas através do método de CLSM, o qual demonstrou que significativamente menos bactérias foram eliminadas nos biofilmes com 3 semanas de desenvolvimento. O tempo de exposição mais prolongado aos agentes antimicrobianos (3 minutos) resultou, para ambos os biofilmes, na maior quantidade de eliminação bacteriana quando comparado ao tempo de 1 minuto. O NaOCl 6% e o Qmix foram as soluções mais efetivas contra a forma jovem de biofilme, e contra o biofilme de 3 semanas, o NaOCl 6% foi o mais efetivo, seguido pelo Qmix. Clorexidina 2% e NaOCl 2% apresentaram a mesma capacidade de redução bacteriana. Como conclusão, os autores verificaram que no interior dos canais radiculares, bactérias estabelecidas em biofilmes com maior tempo de desenvolvimento (3 semanas) são menos susceptíveis (21%) a ação das soluções bactericidas do que as organizadas em biofilmes recentes (1 dia).

Em um estudo para avaliar a efetividade em remoção de smear layer e atividade antimicrobiana do QMix, Stojicic *et al.* (2012) utilizaram uma suspensão de *Enterococcus faecalis* isolados de canais infectados e uma suspensão mista de bactérias da placa coletada de três voluntários. Estas suspensões foram adicionadas a determinados volumes dos agentes antibacterianos (QMix, clorexidina 2%, MTAD, NaOCl 1% e NaOCl 2%) e mantidas pelos tempos de 5 segundos, 30 segundos e 3 minutos. Após os tempos de exposição, amostras foram coletadas e cultivadas em BHI ágar por duas semanas. Também foram realizados testes em biofilmes de *Enterococcus faecalis* cultivados em discos de dentina, desta vez com tempo de contato de 1 e 3 minutos aos agentes antibacterianos. Os resultados para os testes microbiológicos foram verificados através de MEV confocal e para remoção de smear layer através de MEV. QMix e NaOCl eliminaram 100% das bactérias na forma planctônica ou em biofilme no tempo de 5 segundos. QMix e NaOCl 2% chegaram a ser 12 vezes mais eficazes na eliminação de bactérias e em relação a smear layer, a remoção promovida pelo QMix foi comparável à do EDTA.

Embora inúmeros fatores contribuam para as falhas da terapia endodôntica, a infecção intrarradicular persistente ou a infecção secundária ainda são as maiores causas dos fracassos em endodontia. O QMix™ 2 in 1, contém a mistura de um agente antimicrobiano, um agente quelante e um surfactante, sendo indicado para irrigação final a fim de remover smear layer, após o uso do hipoclorito de sódio como irrigante inicial. Este estudo de Elakanti *et al.* (2015) teve como objetivo comparar a eficácia antimicrobiana do QMix, hipoclorito de sódio 5,25% e clorexidina 2% contra *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Foram utilizados 80 pré-molares inferiores humanos. As raízes foram ampliadas, esterilizadas e contaminadas com uma suspensão de *E. faecalis* e *C. albicans*. Após a contaminação, as unidades experimentais de cada grupo foram subdivididas em quatro grupos (A, B, C e D), e irrigadas de acordo com os seguintes protocolos: IA e IIA: 3ml de hipoclorito de sódio a 5,25%; IB e IIB: 3ml de clorexidina 2%; IC e IIC: 3ml de QMix; ID e IID: 3ml de solução salina 0,9%. O tempo de contato das soluções foi de 1 minuto e uma irrigação final com 5ml de água destilada foi realizada ao término deste período. Foi realizada a contagem de CFU. Os resultados

demonstraram um efeito antimicrobiano significativo do QMix 2 em 1 contra *E. faecalis* e *C. albicans*, sendo estatisticamente superior aos demais irrigantes testados, o que poderia ser explicado pela composição da solução. A presença de um surfactante diminui a tensão superficial da solução, aumentando sua capacidade umectante; o agente antimicrobiano previne a colonização microbiana da superfície dentinária; e o agente quelante promove danos as paredes celulares de bactérias gram negativas, pela interação com a membrana celular aumentando sua permeabilidade.

Em um estudo com o objetivo de comparar a atividade antimicrobiana e atividade residual antimicrobiana de cinco diferentes soluções, foram utilizados blocos de dentina infectados com *Enterococcus faecalis*. As substâncias testadas foram: EDTA 17%, clorexidina 0,2%, cetrimida, MTAD e QMix. Após dois minutos de contato por imersão nos agentes químicos, foram coletadas amostras para cultura e posterior contagem de CFUs. O teste de atividade antimicrobiana residual foi realizado de maneira semelhante, porém as amostras para culturas foram coletadas nos tempos de 12h, 24h, 36 e 48h após os tratamentos. Os resultados demonstraram que todas as soluções atingiram redução

bacteriana significativa com diferenças significativas. Os melhores resultados foram alcançados pelo QMix e clorexidina, não havendo diferenças entre estes dois grupos. No teste de atividade antimicrobiana residual, todas as soluções apresentaram eficácia, porém QMix e clorexidina foram os mais efetivos, tendo a clorexidina atingido a ação mais prolongada, trinta e seis horas (Zhang *et al.*, 2015).

Com o objetivo de comparar o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica, laser de Nd:YAG e QMix contra o biofilme de *Enterococcus faecalis*, Juric *et al.* (2015) utilizaram pedaços de dentina de dentes humanos extraídos, contaminados durante três semanas com a cultura bacteriana. A presença de biofilme nas amostras foi confirmada pelo método FISH (fluorescence *in situ* hybridization) no qual as bactérias apresentam fluorescência quando visualizadas em MEV. Após o período de contaminação os protocolos antimicrobianos foram aplicados. A PDT teve como fotosensibilizador a solução de phenothiazinium chloride (10mg/ml), que foi removida após dois minutos de contato, seguida da aplicação da energia luminosa com 660 nm de comprimento de onda e uma potência de 100mW, durante 60 segundos. O QMix foi aplicado de maneira que cobrisse as

amostras, pelo período de 1 minuto. Os resultados demonstraram que a maior redução bacteriana ocorreu no grupo de controle negativo, que utilizou NaOCl 5,25% durante 1 minuto (99.99%). Nos grupos experimentais a PDT e o QMix foram igualmente efetivos, atingindo 98,8% e 99,3% de redução bacteriana respectivamente. A irradiação com Nd:YAG resultou em 96% de redução bacteriana, o que foi significativamente menos efetivo do que a PDT e o QMix.

EXTRATO DE SEMENTE DE UVA

O estudo de Jayaprakasha *et al.* (2003) teve como objetivo avaliar o potencial antibacteriano e antioxidante do extrato de semente de uva (*Vitis vinífera*). Foram identificados nove compostos responsáveis pela formação de 95% do extrato, dentre eles destacam-se as procianidinas monoméricas, presentes na quantidade de 40 a 48%. As concentrações do extrato em 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 ppm foram testadas afim de determinar a MIC (Mínima Concentração Inibitória), através da contagem de CFU. As espécies bacterianas utilizadas foram *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*,

Escherichia coli and *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados demonstraram que bactérias Gram-positivas foram completamente inibidas nas concentrações de 850-1000 ppm, enquanto as Gram-negativas foram inibidas em concentrações de 1250-1500 ppm.

Autores como Brown *et al.* (2009) avaliaram os efeitos antimicrobianos dos extratos de uva (casca, semente e ambos) contra *Helicobacter pylori* por meio da análise em microscopia eletrônica de varredura confocal. As amostras foram tratadas com diferentes tempos de exposição aos agentes antimicrobianos, 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas. Os resultados demonstraram que os extratos de uva têm um significativo efeito inibitório no crescimento bacteriano, atingindo 60% de redução no período mais prolongado de exposição, sem diferença estatística entre os extratos. Tais resultados sustentam a necessidade de mais pesquisas com o objetivo de avaliar, *in vivo*, o potencial dos extratos de uva e seus compostos constituintes para através da dieta promover o controle da infecção por *Helicobacter pylori*.

Cueva *et al.* (2012) avaliaram o efeito de sete compostos fenólicos do vinho no crescimento de bactérias patogênicas associadas a doenças respiratórias. Dentre as

substâncias testadas o extrato de semente de uva demonstrou o efeito antimicrobiano mais efetivo contra os patógenos avaliados, sendo as bactérias gram-negativas mais susceptíveis do que as gram-positivas. Tais resultados justificam a necessidade de mais estudos com o objetivo de testar substâncias derivadas da uva e do vinho na higiene oral.

Kalra *et al.* (2013) testaram o efeito das proantocianidinas (PAs) do extrato da semente de uva 6,5% na força de adesão do cimento resinoso RealSeal SE a dentina radicular. Foram utilizados 28 pré-molares unirradiculares divididos em dois grupos: PAs-tratados (extrato de uva 6,5% durante 10 minutos) e não-tratados. Após a obturação as raízes foram seccionadas em fatias de 1mm de espessura no terço coronário e terço médio, as quais foram utilizadas para o teste de pushout após uma semana e após 3 meses de armazenamento. O terço apical das raízes foi utilizado para avaliação da interface cimento-dentina em MEV e para o teste da biodegradação, que se deu através da exposição destas amostras à colagenase bacteriana tipo I durante 24h e posterior mensuração da hidroxiprolina, liberada após o período de ação enzimática. Os resultados não demonstraram diferenças na força de adesão entre os grupos para o terço

coronário no período de uma semana de armazenamento. Já para o terço médio o grupo tratado com o extrato demonstrou maiores valores de força de adesão para este período. Após três meses de armazenamento ambos os grupos apresentaram diminuição nos valores de força de adesão, porém o grupo tratado revelou melhores resultados. As imagens em MEV do grupo tratado demonstraram uma interface cimento/dentina intacta quando comparadas ao grupo não tratado, o qual demonstrou espaços na interface. A análise da hidroxiprolina revelou uma menor liberação por parte do grupo tratado com extrato de uva 6,5%. Os autores concluíram que o tratamento da dentina radicular com extrato de semente de uva 6,5% melhora a resistência da matriz dentinária radicular desmineralizada à biodegradação, e aprimora a força de adesão do cimento resinoso à dentina radicular após um curto período de armazenamento em água destilada.

Em um estudo realizado por Munoz-Gonzalez *et al.* (2014), foi utilizado o vinho tinto e seus componentes derivados com o objetivo de verificar as propriedades antimicrobianas destas substâncias contra bactérias orais em um modelo de biofilme com 14 dias de desenvolvimento. A análise microbiológica foi realizada através da contagem de

CFU e teste confocal em MEV dos biofilmes após a exposição dos mesmos aos seguintes agentes: vinho tinto, vinho tinto sem álcool, vinho tinto fortificado com extrato de semente de uva (2,5%) e extrato de levedura seca inativa. Os resultados demonstraram que o vinho tinto foi capaz de inibir o crescimento bacteriano de espécies patogênicas organizadas em biofilme. A solução fortificada por extrato de semente de uva obteve a maior atividade antimicrobiana, abrindo caminhos promissores em direção a um ingrediente natural para as formulações de produtos de cuidado oral, especialmente indicados a prevenção da cárie uma vez que tenha demonstrado efetividade contra o *Streptococcus mutans*.

O constante aumento na resistência bacteriana e os efeitos adversos das drogas sintéticas chamou a atenção dos pesquisadores para as ervas fitoterápicas. Ghonmode *et al.* (2013) compararam a eficiência antimicrobiana do extrato de folhas de nim, extrato de semente de uva e NaOCl 3% contra *Enterococcus faecalis* observando as zonas de inibição em ágar BHI. Resultados mais significantes foram verificados para os grupos tratados com extrato de folha de nim e NaOCl, embora o extrato de semente de uva também tenha

demonstrado efeitos bactericidas. Portanto, a inibição do crescimento microbiano observada neste estudo com estes dois extratos medicinais abre novas perspectivas para o seu uso como medicação intracanal.

Cecchin, Farina, *et al.* (2015) avaliaram o efeito do extrato de semente de uva, hipoclorito de sódio 2,5%, clorexidina 2% e QMix contra *Enterococcus faecalis* e sua influência na resistência da dentina intrarradicular à tração e flexão. O método de contagem de CFU foi utilizado para avaliação da atividade antimicrobiana das soluções. As menores contagens bacterianas foram observadas para os grupos tratados com clorexidina 2% e extrato de semente de uva 6,5%, enquanto que o NaOCl 2,5% e o QMix foram significativamente menos efetivos, apresentaram valores intermediários de redução bacteriana. Sendo assim, os autores destacam que o uso do extrato de semente de uva pode ser recomendado para os procedimentos endodônticos, uma vez que apresente efetiva atividade antimicrobiana não interferindo nas propriedades mecânicas da dentina, bem como a clorexidina 2%.

Cecchin, Pin, *et al.* (2015) realizaram um estudo com o objetivo de investigar os efeitos de um extrato rico em

proantocianidinas (extrato de semente de uva) na força de adesão e estabilidade de adesão de pinos de fibra à dentina, utilizando dois sistemas adesivos. Os resultados demonstraram que o extrato de semente de uva não afetou a força de adesão de imediato, porém contribuiu para preservar a força de adesão após um período de doze meses, para ambos os sistemas adesivos. Os autores concluíram que o pré-tratamento com extrato de semente de uva pode ser utilizado como uma alternativa natural a fim de melhorar a estabilidade da força de adesão da interface dentina-adesivo em canais radiculares.

TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica (PDT) utiliza um corante não tóxico, determinado fotosensibilizador em conjunto com a luz visível de baixa intensidade. A interação luz/corante produz espécies altamente reativas de oxigênio, que podem causar injúrias e morte dos microrganismos. O fotosensibilizador pode ser destinado a células ou tecidos específicos, e a irradiação luminosa pode ser direcionada a um local específico, desta maneira dando a PDT dupla seletividade. Inicialmente

proposta para o tratamento do câncer difundiu-se devidos às inúmeras aplicabilidades, como por exemplo inativação microbiana e tratamento de infecções (Demidova e Hamblin, 2004).

Soukos *et al.* (2006) testaram os efeitos da terapia fotodinâmica em patógenos endodônticos na sua forma planctônica bem como em biofilmes de *Enterococcus faecalis* em canais de dentes extraídos experimentalmente infectados. Para bactérias em estágio planctônico, comumente encontradas em infecções endodônticas primárias (2 espécies gram-negativas e 4 gram-positivas), foi utilizado o fotosensibilizador azul de metileno na concentração de 25 µg/ml (durante 5 minutos), associado a energia luminosa (laser) com um comprimento de onda de 665 nm e potência de 100 mW/cm². As bactérias foram totalmente eliminadas após a ativação do corante, duas espécies foram eliminadas antes mesmo da aplicação da luz, e no *Enterococcus faecalis* foi observada uma redução de 53% após PDT. Nas amostras dentárias (60), após prévia instrumentação, esterilização e contaminação, os canais foram preenchidos com azul de metileno durante 5 minutos de contato, seguidos da aspiração e irradiação. Foi alcançada uma redução bacteriana de 97%,

o que sugere que a terapia fotodinâmica pode ser utilizada como um procedimento complementar com a finalidade de eliminar microrganismos residuais no canal radicular após a terapia endodôntica padrão. É uma técnica não invasiva que apresenta vantagens como rápida aplicação no canal radicular; rápida eliminação bacteriana; penetração do fotosensibilizador em biofilme e túbulos dentinários; limitada penetração e citotoxicidade do fotosensibilizador e luz no ligamento periodontal e tecido ósseo adjacente; e ausência de efeitos adversos nos tecidos radiculares circundantes.

Garcez *et al.* (2007) verificaram a atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica combinada ao tratamento endodôntico convencional para eliminar biofilme bacteriano do interior de canais radiculares. Neste estudo, a eficácia de desinfecção foi analisada utilizando a metodologia da bioluminescência, que utiliza a sobreposição de imagens bioluminescentes para a comparação entre grupos. Um total de dez dentes foram contaminados com as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*. As amostras foram divididas em 3 grupos: PDT, tratamento endodôntico convencional, combinados (PDT+convencional). Para a PDT foi utilizado como fotosensibilizador um conjugado de

polyethylenimine (PEI) e chlorin(e6) incubado por 10 minutos, a energia luminosa utilizada teve comprimento de onda de 660 nm, potência de 40 mW e foi aplicada com auxílio de ponteira de fibra óptica. A terapia endodôntica convencional foi realizada com limas manuais até um diâmetro apical equivalente a uma lima #40 com soluções irrigadoras de hipoclorito de sódio a 2,5% e peróxido de hidrogênio a 3%. Os resultados demonstraram que todos os tratamentos testados foram efetivos na redução da bioluminescência bacteriana. PDT sozinha demonstrou-se mais eficiente (95%) em eliminar bactérias do que o tratamento endodôntico convencional sozinho (90%), embora os níveis de recontaminação após 24h de incubação pós-tratamento não tenham demonstrado diferenças significativas entre os dois grupos. A combinação dos dois tratamentos foi claramente mais efetiva do que ambos os tratamentos sozinhos, e mais importante, foi muito mais efetiva na redução do nível de recontaminação após 24 horas. Concluindo, a associação da PDT como um adjuvante no tratamento endodôntico convencional, conduz a uma estatisticamente significativa maior redução da carga bacteriana do interior dos canais radiculares.

Os insucessos na terapia endodôntica geralmente estão associados à limpeza e desinfecção inadequada do sistema de canais radiculares, possivelmente pela contaminação de locais que a instrumentação e os agentes químicos desinfetantes não conseguem atingir. A terapia fotodinâmica (PDT) é um método complementar que pode ser utilizado a fim de eliminar os remanescentes bacterianos do interior dos canais. 46 dentes humanos extraídos foram contaminados com uma suspensão de *Enterococcus faecalis*. Após, distribuídos em 2 grupos: Grupo controle (CG) e grupos teste (TG). No CG nenhuma terapia foi aplicada, no TG utilizou-se a terapia fotodinâmica, tendo como fotosensibilizador uma solução 0,0125% de azul de toluidina que permaneceu no interior dos canais por um período de 5 minutos. Após lavados com uma solução salina a 9%, com ajuda de uma ponta de fibra óptica introduzida no interior do canal, aplicou-se um laser de baixa potência. Amostras bacterianas foram obtidas antes e após a PDT e CFU foi realizada. No CG foi observado um aumento de 2,6% de CFU, enquanto que no TG a PDT promoveu uma redução de 99,9% na contagem de CFU, demonstrando que a terapia é

viável como um agente bactericida, porém não erradicando totalmente a contaminação bacteriana (Fonseca *et al.*, 2008).

Um estudo realizado por Garcez *et al.* (2008) testou a eficácia na desinfecção da terapia endodôntica convencional em associação à terapia fotodinâmica. Foram selecionados 20 pacientes com diagnóstico de necrose pulpar e lesão periapical em dentes anteriores superiores. Amostras microbiológicas foram obtidas após o acesso endodôntico, terapia endodôntica e PDT. Ao final da primeira sessão, os canais foram preenchidos com Ca(OH)₂, e após uma semana uma segunda sessão de terapia endodôntica foi realizada. Foi utilizado PEI-ce6. A combinação com a PDT diminuiu significativamente a carga bacteriana na primeira sessão, eliminando 82% dos microrganismos que permaneceram no canal após o tratamento endodôntico padrão. A segunda sessão com PDT foi ainda mais efetiva, chegando a atingir mais de 99,99% de redução da carga bacteriana inicial, sugerindo a terapia fotodinâmica como um importante meio auxiliar à terapia endodôntica convencional.

Para testar os efeitos da terapia fotodinâmica no fotosensibilizador azul de metileno (25 µg/mL), Fimple *et al.* (2008) utilizaram 120 dentes humanos contaminados com 4

tipos de bactérias encontradas em infecções endodônticas primárias: *Actinomyces israeli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. O exame em MEV confirmou a presença do biofilme dos 4 microrganismos nos canais infectados. A associação de fotossensibilizador e laser resultou nas menores contagens de CFU (redução de 73 a 80%), enquanto que o grupo controle resultou nas maiores contagens. Quando testados grupos com apenas azul de metileno ou apenas energia luminosa, foram observadas menores contagens de CFU em relação ao grupo controle, porém não significantes. Os resultados sugerem o potencial da PDT para ser utilizada como adjuvante na eficácia antimicrobiana da terapia endodôntica padrão.

Lim *et al.* (2009) testaram uma formulação específica de fotossensibilizador e um condutor líquido em conjunto com energia luminosa de um comprimento de onda específico (LAD – light activated disinfection). Baseia-se no uso de um fotossensibilizador (azul de metileno), diluído em um sistema específico de solventes, composto por glicérol, etanol e água; seguido pela aplicação de luz na presença de um meio propício para irradiação. Neste estudo, o novo método foi utilizado para verificar a eficácia antibacteriana em biofilmes

de *Enterococcus faecalis* imaturos (4 dias de idade) e maduros (4 semanas de idade) em canais radiculares de dentes humanos extraídos. Para o teste de biofilme imaturos, as amostras foram divididas em 5 grupos: Grupo 1 (controle); Grupo 2 (apenas luz); Grupo 3 (PDT); Grupo 4 (NaOCl 5,25%) e Grupo 5 (LAD aprimorado). Após os tratamentos foi realizada a contagem de CFU. No segundo experimento, após os tratamentos, também foram coletadas amostras de dentina para cultura e contagem de CFU. Os resultados demonstraram que o NaOCl 5,25% e a LAD aprimorada obtiveram significativa habilidade de inativação de biofilmes imaturos. Porém, a LAD aprimorada obteve maior capacidade de eliminar bactérias mais profundas nos túbulos dentinários, quando comparada com a LAD convencional e o NaOCl 5,25%. No entanto, a combinação da LAD aprimorada com o procedimento de preparo endodôntico em conjunto com substâncias químicas auxiliares (NaOCl 5,25% + EDTA 17%) foi necessária para reduzir significativamente as bactérias viáveis de biofilmes endodônticos maduros.

Xu *et al.* (2009) em um estudo *in vitro* avaliaram o efeito do fotossensibilizador azul de metileno e luz vermelha em fibroblastos e osteoblastos humanos. Após sensibilizar as

células com o corante em uma concentração de 50 µg/mL foi aplicada a energia luminosa com comprimento de onda de 665 nm durante 5 minutos, com potência de 10, 20 e 40 mW/cm². Os testes demonstraram que a luz a 20 e 40 mW/cm² com azul de metileno promoveu efeitos moderados em 24h nos osteoblastos, enquanto que o hipoclorito de sódio a 3% por um período de 10 minutos eliminou por completo as células. Os resultados sugerem a existência de uma janela terapêutica segura pela qual a terapia fotodinâmica pode inativar os patógenos endodônticos sem afetar a viabilidade das células do hospedeiro.

A terapia fotodinâmica foi descoberta em torno de 100 anos atrás, pela observação da morte de microrganismos quando um corante inofensivo e uma luz visível eram combinados *in vitro*. Primeiramente foi desenvolvida para o uso no tratamento contra o câncer, porém, recentemente tem sido proposta como uma terapia para uma grande variedade de infecções localizadas. Esse ressurgimento da PDT pode ser explicado pelo fato do aumento de resistência às drogas dentre muitas classes de patógenos. Tem como vantagem uma efetividade semelhante à dos antibióticos na eliminação microrganismos, sem no entanto induzir resistência nos

mesmo. Como desvantagem apresenta o cessar dos efeitos antimicrobianos na ausência da luz. A PDT se tornará ainda mais importante no futuro, uma vez que a tendência de resistência bacteriana aos antibióticos é de aumentar (Dai *et al.*, 2009).

Garcez *et al.* (2010) estudaram a terapia fotodinâmica associada ao tratamento endodôntico convencional em pacientes com microflora resistente a antibióticos. Foram selecionados 30 casos de lesões periapicais com tratamento endodôntico prévio associado ao uso de antibióticos. Os dentes foram retratados e submetidos a PDT. Amostras bacterianas foram adquiridas a cada etapa da terapia (acesso, retratamento endodôntico e PDT), obtendo-se após a primeira amostra a confirmação de resistência, de pelo menos um patógeno, ao agente antibiótico. Foi utilizado como agente fotosensibilizador chlorin(e6) por 2 minutos, a energia luminosa foi aplicada no interior dos canais por meio fibra óptica, utilizando-se comprimento de onda de 660 nm e potência de 40 mW, durante 4 minutos. Os retratamentos foram realizados em duas sessões com o uso de hidróxido de cálcio como medicação intra-canal, sendo os protocolos de desinfecção repetidos na segunda consulta, antes da obturação

e selamento final do elemento dentário. O uso do hidróxido de cálcio promove a alcalinização do meio, conseqüentemente, o tempo de vida das espécies reativas de oxigênio aumenta, e o efeito da terapia fotodinâmica é amplificado na segunda intervenção. Após o retratamento endodôntico microrganismos viáveis ainda foram verificados no interior dos canais, porém após aplicada a PDT não foi observado crescimento bacteriano em nenhuma das amostras. Dez canais radiculares apresentaram 100% de eliminação bacteriana após o retratamento endodôntico, enquanto que todos os 30 dentes demonstraram total ausência de microrganismos após a combinação dos tratamentos. Os resultados sugerem que o uso da terapia fotodinâmica como um adjuvante do tratamento endodôntico convencional leva a uma significativa maior redução da carga bacteriana e é efetiva contra bactérias resistentes a antibióticos.

Souza *et al.* (2010) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar os efeitos antibacterianos adicionais da terapia fotodinâmica utilizando azul de metileno ou azul de toluidina após a instrumentação/irrigação de canais radiculares experimentalmente contaminados com *Enterococcus faecalis*. Foram utilizados 70 dentes humanos

unirradiculares extraídos com um único canal, os quais foram contaminados com *Enterococcus faecalis*. Duas unidades experimentais foram submetidas ao exame em MEV e confirmaram a presença de um padrão de colonização. As demais unidades experimentais foram divididas em 4 grupos com diferentes protocolos de desinfecção: 1: Azul de metileno/NaOCl 2,5%; 2: Azul de toluidina/NaOCl 2,5%; 3: Azul de metileno/NaCl 0,85%; 4: Azul de toluidina/NaCl 0,85%. Uma concentração de 15 µg/mL foi utilizada para ambos os fotosensibilizadores. Todos os canais foram preparados através do sistema ProTaper e a energia luminosa foi aplicada no canal através de um diodo de laser, após 2 minutos de tempo de contato do fotosensibilizador, utilizando ponteira de fibra óptica de 300 µm de diâmetro, potência de 40mW e comprimento de onda de 660 nm, durante 4 minutos. Amostras foram obtidas antes e após a instrumentação/irrigação e após PDT. A contagem de CFU revelou que o procedimento de instrumentação/irrigação utilizando NaOCl foi o método mais efetivo na redução da contaminação bacteriana, e embora a PDT tenha promovido alguma redução das populações de *Enterococcus faecalis* do

interior do canal, tais efeitos não atingiram significância estatística como um método suplementar de desinfecção.

No que diz respeito à terapia com lasers de baixa potência, utilizados isoladamente, nem os corantes nem os lasers possuem efeito sobre as bactérias, mas, em combinação, o oxigênio da partícula isolada, que possui forte efeito bactericida, será produzido, o qual causará danos às membranas celulares, mitocôndrias, e DNA, tornando inevitável a destruição microbiana. Este processo é denominado terapia fotodinâmica (TFD), o qual apresenta vantagens como ausência da necessidade de manter altas concentrações do fotossensibilizador na área infectada, como ocorre com antissépticos e antibióticos. A principal vantagem destaca-se ao local de ação, pois afeta microrganismos apenas no sítio da deposição do fotossensibilizador, não alterando estruturas adjacentes como tecidos periodontais e periapicais. Para o tratamento de infecções pelo método da PDT é imprescindível ter uma fonte de luz adequada e um fotossensibilizador capaz de se ligar ao patógeno alvo. Inúmeros fotossensibilizadores estão disponíveis; porém, para o combate aos patógenos orais são utilizados azul de toluidina, azul de metileno e conjugados de poli-L-lisina-

clorina-e6. O laser deve funcionar dentro da faixa de absorção do corante utilizado, que geralmente está no espectro vermelho, com potência de saída entre 50 e 110 mW. Como desvantagem da PDT destaca-se a ausência de um protocolo estabelecido, porém estudos científicos *in vitro* e *in vivo* têm apresentado resultados seguros e favoráveis que permitem a aplicação clínica desta terapia (Convissar, 2011).

Rios *et al.* (2011) avaliaram a eficácia antimicrobiana da terapia fotodinâmica em conjunto com o protocolo de desinfecção convencional contra *Enterococcus faecalis*. As amostras foram contaminadas e divididas aleatoriamente em cinco grupos, nos quais diferentes protocolos foram utilizados pelo período de 30 segundos: 1: NaOCl 6%, 2: Azul de toluidina de baixa viscosidade, 3: irradiação luminosa com ponteira intra-canal, 4: Azul de toluidina e energia luminosa, 5: NaOCl, azul de toudina e energia luminosa. Um exemplar de cada grupo foi selecionado para análise em MEV que revelou biofilme estruturado no interior dos canais e túbulos dentinários, os demais foram utilizados para contagem de CFU. Foi observada diferença significativa entre todos os grupos, exceto entre os grupos 2 e 3. Os canais tratados com PDT apresentaram uma taxa de sobrevivência de *Enterococcus*

faecalis de 2,9%, enquanto que a combinação da PDT e NaOCl 6% resultou em uma taxa de sobrevivência de 0,1%. Os resultados sugerem a terapia fotodinâmica como um importante método auxiliar na atividade antimicrobiana da terapia endodôntica convencional.

Nagayoshi *et al.* (2011) testaram os efeitos bactericidas da terapia fotodinâmica em um modelo de lesão periapical contaminado com *Enterococcus faecalis*. Como fotosensibilizador foi usado o verde de indocyanine. Os tempos de irradiação foram de 30, 60 e 120 segundos e ainda, foram testados hipoclorito de sódio 2,5% e solução salina estéril como grupos controle. A temperatura na lesão periapical e regiões circundantes também foi verificada durante o período de irradiação. Não foi observado nenhum efeito bactericida com a aplicação de luz sem associação ao fotosensibilizador, enquanto que na presença do corante obteve-se uma redução de 72% nas células viáveis com 30 segundos de exposição, e ausência de patógenos após 60 segundos ou mais. O hipoclorito de sódio a 2,5% eliminou completamente o *Enterococcus faecalis*. A aferição da temperatura na lesão periapical e regiões circundantes durante a PDT, demonstrou um aumento de 2^o C para 60 segundos e 6^o C após 120

segundos. Então, amostras bacterianas foram submetidas à temperatura equivalente àquela atingida durante irradiação, afim de verificar alterações na viabilidade celular causadas pelo aquecimento de até 65⁰ C, no entanto nenhuma alteração foi notada, confirmando que a redução bacteriana é promovida pela PDT e não pelo aquecimento da região. Os presentes resultados indicam que o uso da terapia fotodinâmica é eficaz no tratamento de lesões periapicais sem causar efeitos adversos nos tecidos circundantes.

Ng *et al.* (2011) avaliaram os efeitos antimicrobianos da terapia fotodinâmica utilizando 52 dentes humanos extraídos, os quais apresentavam necrose pulpar associada à radiolucidez periapical. Os elementos foram divididos em 2 grupos: Debridamento químico-mecânico (CMD), n=26, e CMD+PDT, n=26. Amostras bacterianas foram obtidas imediatamente após extração, após CMD e após CMD+PDT, a contagem de CFU foi utilizada para avaliação da desinfecção dos canais. No grupo CMD os canais foram instrumentados com o sistema rotatório Profile em associação com hipoclorito de sódio 6% e EDTA 17%. Para o grupo CMD+PDT o preparo foi o mesmo, e a terapia fotodinâmica utilizou com fotosensibilizador azul de metileno a 50 µg/mL

por 5 minutos associado a energia luminosa com 665 nm de comprimento de onda e 1 W de potência. Os resultados demonstraram um melhor desempenho do CMD+PDT do que apenas CMD. CMD+PDT atingiu significativa maior redução de canais infectados (86,5%) em relação ao CMD (49%), o que indica a terapia fotodinâmica como um importante método adjunto da endodontia convencional.

Cheng *et al.* (2012) avaliaram o efeito bactericida do laser de Nd:YAG; Er:YAG; Er,Cr:YSGG e terapia antimicrobiana fotodinâmica em canais radiculares experimentalmente infectados, comparados com o tratamento endodôntico padrão do hipoclorito de sódio 5,25%. As unidades experimentais foram infectadas com uma suspensão de *Enterococcus faecalis* e aleatoriamente divididas em 7 grupos. As amostras bacteriológicas foram realizadas em diferentes profundidades de dentina por meio de comparação da contagem de CFU antes e após tratamento. Em análise MEV foi observada formação de biofilme bacteriano na superfície do canal radicular e no interior dos túbulos dentinários, onde o *Enterococcus faecalis* chegou a penetrar uma distância variando de 100 a 1000 µm. O grupo controle positivo (NaOCl 2,5% durante 60 segundos) atingiu uma

redução bacteriana de 99,99% na superfície do canal, em camadas profundas de dentina não foi eficaz para descontaminação dos túbulos dentinários, possivelmente pelo fato de agir por contato. Os lasers de Nd:YAG (98% de redução bacteriana); Er,Cr:YSGG (93,29% de redução bacteriana) e a PDT (98,13% de redução bacteriana) foram significativamente menos efetivos do que o NaOCl 5,25% em diferentes níveis. Por outro lado, o grupo Er:YAG/NaOCl/NS/DW foi o único tratamento que não apresentou crescimento bacteriano (100% de redução bacteriana) nas paredes do canal ou a uma distância de 100/200 μm no interior dos túbulos dentinários, o que pode ser explicado possivelmente pela agitação promovida na solução irrigante que pode ter atingido maiores profundidades em dentina.

Meire *et al.* (2012) realizaram um experimento laboratorial com a finalidade de avaliar os tratamentos por: irradiação com laser de Nd:YAG e Er:YAG; dois sistemas de terapia fotodinâmica; e hipoclorito de sódio em biofilmes de *Enterococcus faecalis*. Foram utilizados discos de dentina de dentes humanos extraídos, contaminados com *Enterococcus faecalis*. Para os grupos tratados com PDT, utilizou-se dois

sistemas Dentofex e Helbo. Após aplicação dos protocolos, as amostras foram novamente incubadas para então prosseguir à contagem de CFU. Os resultados demonstraram a maior eliminação de biofilme para o grupo tratado com NaOCl 2,5% (total erradicação), seguido pelo grupo tratado com laser de Er:YAG utilizando pulso de 100 mJ. O uso das duas marcas comerciais para PDT resultou numa fraca redução no número de células de *Enterococcus faecalis*. Em relação ao laser de alta intensidade, em específico o Nd:YAG tem seu efeito antibacteriano baseado na absorção da luz pelo substrato no qual a bactéria está aderida (dentina), resultando em um aumento local da temperatura suficiente para resultar na morte da célula. Estes valores energéticos estão contraindicados para serem utilizados *in vivo*, pois resultariam em dano térmico as estruturas peri-radiculares. Como conclusão foi verificado que o NaOCl 2,5% promove a mais efetiva eliminação de biofilme de *Enterococcus faecalis*, enquanto o uso do laser de Er:YAG com pulso de 100 mJ também resultou em uma forte redução na contagem de células viáveis.

Vaziri *et al.* (2012) testaram a eficácia bactericida da terapia fotodinâmica, hipoclorito de sódio a 2,5%, clorexidina

a 2% e PDT/NaOCl 2,5% em canais de dentes humanos extraídos infectados com *Enterococcus faecalis*. Ao realizar contagem de CFU verificaram redução significativa para todos os grupos testados. A PDT e a clorexidina 2% apresentaram efeitos antibacterianos moderados enquanto que NaOCl 2,5% foi significativamente mais elevado, porém a associação de PDT/NaOCl 2,5% obteve os melhores resultados, atingindo 100% de eliminação de *Enterococcus faecalis*, utilizando o seguinte protocolo: NaOCl 2,5% durante 5 minutos, aplicação do fotosensibilizador (azul de toluidina a 15 µg/ml) e exposição a energia luminosa (potência de 200 mw/cm² e comprimento de onda de 625 nm), não sendo utilizada ponteira de fibra óptica.

Silva *et al.* (2012) avaliaram por meio de exame histopatológico a eficácia da terapia fotodinâmica no tratamento de dentes com periodontite apical. Foram utilizados cachorros, nos quais a periodontite apical foi induzida, e quatro protocolos distintos de tratamento foram utilizados: 1: PDT+/obturação (RCF)+, 2: PDT+/RCF-, 3: PDT-/RCF+, 4: PDT-/RCF-. Para as amostras com PDT+ foi utilizado HELBO Blue Photosensitizer (phenothiazine chloride) e uma fonte de laser com comprimento de onda de

660 nm e potência de 20 mW. Os grupos tratados com PDT apresentaram as menores lesões periapicais enquanto que as maiores lesões foram observadas no grupo tratado sem PDT e sem obturação. Embora o reparo apical total não tenha sido alcançado em nenhum grupo, a ausência de células inflamatórias juntamente com moderada neoangiogênese e fibrogênese na região periapical nos grupos tratados com PDT, indica que esta terapia poder ser um promissor tratamento suplementar ao preparo biomecânico do canal radicular em dentes com periodontite apical submetidos a tratamentos endodônticos em sessão única.

Gursoy *et al.* (2013) selecionaram 121 artigos relevantes sobre terapia fotodinâmica, publicados entre os anos de 1981 e 2012, afim de realizar uma revisão de literatura sobre esta modalidade de tratamento. As conclusões obtidas através deste estudo, demonstram que a PDT pode ser considerada uma técnica promissora e menos invasiva dentro da odontologia, sendo uma ferramenta efetiva no tratamento de infecções superficiais localizadas. No entanto, não demonstra a capacidade de substituir a terapia antibiótica, devendo ser utilizada como uma terapia adjunta para o tratamento de infecções orais.

Inúmeros estudos, *in vitro* e *in vivo*, tem relatado os efeitos antimicrobianos da terapia fotodinâmica, porém, ainda existe pouca informação no que diz respeito a influência do tempo de exposição á luz. Yildirim *et al.* (2013) avaliaram a eficácia antimicrobiana da terapia fotodinâmica (PDT) em diferentes tempos de irradiação. Para tal, 60 dentes humanos foram selecionados, os canais foram instrumentados e autoclavados. As amostras foram inoculadas com *Enterococcus faecalis* e incubadas. Em seguida, foram aleatoriamente divididas em 5 grupos (n=12): Grupo controle, Grupo 1 (NaOCl 5%), Grupo 2 (PDT 1 minuto), Grupo 3 (PDT 2 minutos) e Grupo 4 (PDT 4 minutos). Para as amostras tratadas com PDT, foi utilizado azul de metileno como fofosensibilizador, deixado durante 1 minuto no interior do canal e lavado com água seguido da irradiação. Após 24 horas de incubação, as unidades formadoras de colônias de cada amostra foram verificadas. A PDT demonstrou-se tão eficiente quanto o NaOCl (atingindo redução de até 99,9% da carga microbiana). A variação do tempo de exposição á PDT não demonstrou influência significativa na redução bacteriana, sendo 1 minuto suficiente para alcançar o efeito

antimicrobiano. Em nenhum grupo foram observadas amostras totalmente livres de contaminação.

Em um estudo com o objetivo de esclarecer a relação existente entre a quantidade de oxigênio reativo gerado pela PDT utilizando azul de metileno e seus efeitos bactericidas sobre o *Enterococcus faecalis*, Komine e Tsujimoto (2013) utilizaram um diodo de laser com comprimento de onda de 660 nm e potência de 200 mW, durante períodos de 300, 600 e 900 segundos para excitar o agente fotosensibilizador em diversas concentrações. Os grupos experimentais incluíam irradiação a laser L(+), sem irradiação a laser L(-), com azul de metileno M(+) e sem azul de metileno M(-) combinados das seguintes maneiras: L(+)M(+), L(+)M(-), L(-)M(+) e L(-)M(-). Após contagem de CFU, apenas as colônias bacterianas das suspensões de *Enterococcus faecalis* tratadas com L(+)M(+) sofreram significativa diminuição nas concentrações de 0,001%-0,01% de azul de metileno, demonstrando a efetividade da PDT contra cepa bactéria.

Zand *et al.* (2014) avaliaram a eficácia da terapia fotodinâmica e hipoclorito de sódio contra biofilmes de *Enterococcus faecalis* com três diferentes estágios de desenvolvimento (4, 6 e 8 semanas). Foram utilizados 120

dentos humanos unirradiculares extraídos, instrumentados, esterilizados e contaminados com *Enterococcus faecalis*, os quais foram divididos nos seguintes grupos: I: solução salina; II: PDT; III: NaOCl 1%; IV: NaOCl 2,5%. Após obtenção de amostras de dentina a contagem de CFU foi o método utilizado para verificar os níveis de desinfecção. Os tratamentos utilizados para os grupos II e IV alcançaram 100% de eliminação bacteriana, enquanto que o grupo III apresentou contagem em biofilmes de 6 semanas 3,2 vezes mais elevado do que biofilmes de 4 semanas; em biofilmes de 8 semanas a contagem foi 5,94 vezes mais alta do que em biofilmes de 6 semanas, o que significou 19,08 vezes mais elevada do que em biofilmes de 4 semanas. Os resultados deste estudo demonstraram a efetividade da terapia fotodinâmica na eliminação *Enterococcus faecalis*, e que a resistência e sobrevivência bacteriana aumenta conforme o tempo de desenvolvimento (maturação) dos biofilmes (≥ 6 semanas), porém não existem dados suficientes para sugerir a maior efetividade antimicrobiana da PDT do que os agentes bactericidas tradicionais.

Ghinzelli *et al.* (2014) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a influência da ativação ultrassônica do

fotosensibilizador na terapia fotodinâmica em canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*. O método de contagem de CFU foi utilizado para avaliar o potencial de descontaminação dos grupos testados e imagens em MEV foram realizadas para ilustrar a redução bacteriana. Os resultados demonstraram que a ativação ultrassônica do fotosensibilizador obteve as menores contagens bacterianas, com diferenças significativas para os demais grupos testados, concluindo que a ativação ultrassônica melhora o desempenho da terapia fotodinâmica no combate ao *Enterococcus faecalis* no interior do canal radicular.

FORÇA DE ADESÃO

Prado *et al.* (2013) realizaram um estudo para verificar o efeito de diferentes protocolos de irrigação na força de adesão de cimentos resinosos a dentina. Foram utilizados 180 pré-molares unirradiculares. As unidades experimentais foram divididas em 18 grupos de 10, e diferentes protocolos de irrigação foram utilizados. As raízes foram secas com cones de papel e os grupos 1 a 9 foram preenchidos com cones de guta-percha + AH plus enquanto os grupos 10 a 18 foram

preenchidos com Resilon + Real Seal SE. O System B foi utilizado para corte e condensação da obturação e o Sistema Obtura utilizado para preenchimento do canal. Após o teste do push-out as amostras foram divididas em duas metades e avaliadas em microscópio eletrônico de varredura para determinação do padrão de falha do material obturador de acordo com a porcentagem de substrato livre de material obturador (falha adesiva = mais de 75% de substrato livre, falha coesiva = menos de 25% de substrato livre e falha mista = mais de 25 e menos de 75% de substrato livre). Os resultados demonstraram que nos grupos gutta-percha/AH plus os maiores valores de adesão foram obtidos com a associação de hipoclorito e ácido fosfórico ou clorexidina e EDTA. Para os grupos Resilon/Real Seal SE maiores valores de adesão foram observados quando a clorexidina foi utilizada como irrigante durante o preparo principalmente quando associada ao ácido fosfórico. O uso de uma irrigação final com clorexidina em ambas técnicas de obturação não afetou a força de adesão. Em relação ao padrão de falha nos grupos gutta-percha/AH plus foi verificada principalmente falha coesiva enquanto que nos grupos Resilon/Real Seal SE ocorreu o padrão de falha adesiva. Como conclusão os

protocolos de irrigação interferem na força de adesão dos cimentos resinosos a dentina.

Para Ok *et al.* (2013) uma solução irrigante ideal deveria eliminar os microrganismos do sistema de canais, dissolver tecido orgânico, não tendo efeitos negativos na força de adesão dos cimentos endodônticos às paredes dentinárias do canal. Portanto, o objetivo de seu estudo foi avaliar e comparar o efeito do hipoclorito de sódio 5,25%, solução de clorexidina 2% e desinfecção foto ativada com azul de toluidina 0,01% na força de adesão do cimento endodôntico AH plus às paredes do canal radicular, por meio do teste do push out. Foram utilizadas 15 raízes de pré-molares apresentando apenas um canal, seccionadas e padronizadas no comprimento de 15 mm. Os canais foram ampliados e as raízes foram então divididas em 3 grupos (n=5): G1 – terapia fotodinâmica, G2 – clorexidina 2% e G3 – grupo controle (NaOCL + EDTA). Foram obtidos dois discos de dentina com 1mm de espessura dos terços cervical e médio de cada unidade experimental (20 fatias por grupo) e submetidos ao teste do push out. Os resultados não demonstraram diferenças estatísticas significativas em

relação a força de adesão do cimento endodôntico às paredes do canal para os diferentes protocolos de descontaminação.

Para se avaliar o efeito de diferentes técnicas de ativação da irrigação final na força de adesão de um cimento endodôntico a base de resina epoxy, foram utilizados 80 pré-molares humanos extraídos. Os dentes foram preparados e divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=20) e irrigados com 5mL de NaOCl 3% e 5mL de EDTA 17% de acordo com os protocolos de ativação: Controle (sem ativação), MDA (ativação manual com cone de guta F4), CB (ativação com CanalBrush) e UA (ativação ultrasônica), durante 1 minuto para cada irrigante. As amostras foram secas com cones de papel e obturadas pela técnica do cone único com cimento AH plus e cones de gutta-percha F4. Após o push-out os modos de falha também foram analisados (microscópio óptico, 30x) e classificados: falha adesiva (cimento-dentina), falha coesiva (dentro do cimento) e mista. Os resultados do push out revelaram que o terço coronário apresentou os maiores valores de força de adesão, principalmente para o grupo UA, enquanto que no terço apical os maiores valores ocorreram no grupo MDA. A falha coesiva foi a mais frequente entre os grupos, exceto na região apical do grupo MDA, onde a falha

foi predominantemente mista. Como conclusão verificou-se que a ativação ultrassônica na irrigação final melhora a força de adesão do cimento AH plus a nível de terço coronário e médio e o mesmo ocorre a nível de terço apical quando aplicada a ativação manual da irrigação final (Topcuoglu *et al.*, 2014).

Graziele Magro *et al.* (2014) avaliaram a interação entre hipoclorito de sódio e inúmeras formulações contendo clorexidina e seus efeitos na dentina radicular através de MEV e push-out. As amostras dentárias foram divididas aleatoriamente em 5 grupos: G1: controle (sem clorexidina), G2: solução de clorexidina 2%, G3: gel de clorexidina 2%, G4: Concepsis (formulação de clorexidina da Ultradent) e G5: clorexidina plus (formulação com surfactante p reduzir tensão superficial). As formulações de clorexidina foram mantidas no canal durante 3 minutos. Em seguida os dentes foram clivados para análise em MEV nos segmentos cérvico-mediano e mediano-apical e scores foram obtidos. Para análise de push-out os grupos foram divididos da mesma maneira citada anteriormente, e após os protocolos foram secados e obturados pela técnica do cone único com cone de gutta-percha F5 e cimento AH plus. Após o teste de push-out

os padrões de falha foram analisados em microscópio ótico com 40x de magnificação e classificados em: falha adesiva (ao longo da interface dentina/cimento), falha coesiva (dentro do cimento) e mista (parcial adesiva e parcial mista). Os resultados da avaliação em MEV revelaram uma menor presença de detritos e smear layer para o G1 (sem irrigação final com clorexidina) em ambos os segmentos analisados enquanto que entre os demais grupos não existiu diferenças. Para os testes de push-out os resultados não demonstraram nenhuma diferença significativa entre os cinco grupos testados e o modo misto foi a falha predominante em todos os grupos independente do terço radicular. Conclui-se que as formulações de clorexidina utilizadas para irrigação final promovem uma precipitação química de detritos e smear layer na dentina radicular, o que pode ter sido resultado do uso do NaOCl para preparo do canal, porém estes resíduos não interferem na força de adesão do cimento endodôntico a dentina radicular.

Ao realizar um estudo Dias *et al.* (2014) compararam a força de adesão de cimentos endodônticos resinosos a dentina, utilizando álcool isopropílico a 70% como irrigante final, com o objetivo de secagem do canal, comparado as

pontas de papel absorvente. Foram utilizados para o estudo, 80 dentes divididos em dois grupos de 40 conforme o protocolo de secagem, em seguida subdivididos em grupos com n=10, conforme o material obturador utilizado: AHplus/gutta-percha; Hybrid Root Seal/gutta-percha; EpiphanySE/gutta-percha e EpiphanySE/resilon. Os resultados demonstraram que nos grupos onde foi utilizado álcool isopropílico ocorreram os maiores valores de força de adesão. Dentre os grupos com diferentes cimentos utilizados, o AH plus demonstrou os maiores valores de força de adesão, com o padrão de falha coesiva como o mais frequente. Como conclusão, os autores acreditam que uma irrigação final com EDTA e álcool isopropílico a 70% melhora a força de adesão e a penetração dos cimentos endodônticos no interior dos túbulos dentinários do canal radicular.

3. PROPOSIÇÃO

Este estudo tem como objetivos:

- Verificar, *in vitro*, a eficácia dos protocolos de descontaminação final: clorexidina líquida 2%, QMix, extrato de semente de uva 6,5% e terapia fotodinâmica, em canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*, através de contagem de unidades formadoras de colônias e ilustração em microscopia eletrônica de varredura.

- Avaliar, *in vitro*, a influência dos protocolos de descontaminação final na força de adesão do material obturador ao substrato dentinário da parede do canal radicular.

- Classificar os tipos de falhas apresentadas após o teste do pushout em adesiva, coesiva ou mista.

As hipóteses testadas foram:

- Os protocolos de descontaminação final são eficazes na descontaminação de canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*.

- Os protocolos de descontaminação final não apresentam interferência na força de adesão do cimento obturador ao substrato dentinário.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Plataforma Brasil, sob o número de protocolo 735.208.

Obtenção das amostras

Noventa dentes unirradiculares humanos extraídos foram utilizados para o presente estudo, provenientes do Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo (UPF). Os dentes foram congelados e armazenados até o início do experimento, no intuito de preservar as propriedades dos tecidos dentários. Das 90 unidades experimentais, 60 foram destinadas ao teste microbiológico e 30 ao teste de pushout.

Preparo das Amostras para o teste microbiológico

A porção coronária das 60 amostras foi seccionada na junção amelocementária, de forma que o remanescente radicular apresentasse um comprimento de 15mm. Foi utilizado para o corte, um disco de diamante rotativo (KG

Sorensen Dupla face modelo 1802.7015), acoplado na peça reta de baixa rotação, utilizando água para refrigeração (Figura 1).

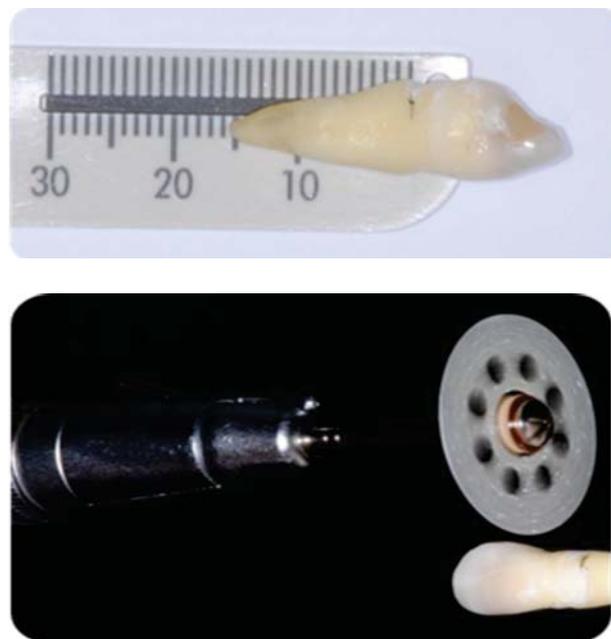


Figura 1 – Padronização do comprimento das raízes.

O comprimento de trabalho foi definido pela introdução de uma lima do tipo K #10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) até que a mesma fosse visualizada no forame apical, subtraindo-se 1 milímetro desta medida. As

amostras foram instrumentadas através do sistema ProTaper Universal (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) seguindo a sequência de limas S1, SX, S2, F1, F2 e F3, todas utilizadas no comprimento de trabalho com velocidade de 250 rpm e torque 2,5 N, no motor X-Smart Plus (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) (Figura 2). As soluções irrigantes utilizadas para o preparo foram hipoclorito de sódio 2,5% (Natupharma, Passo Fundo-RS, Brasil) - 2 ml a cada troca de instrumento, EDTAT 17% (Fórmula e Ação, São Paulo-SP, Brasil) - 5 ml durante 1 minuto e irrigação final com água destilada estéril - 5 ml.



Figura 2 – Motor endodôntico X-Smart plus e sistema ProTaper Universal.

Após realizado o preparo dos canais radiculares, as raízes tiveram os forames apicais selados com resina composta fotopolimerizável para dentina Opallis (FGM, Joinville, SC, Brasil), formando um capuz com o material em torno do ápice da amostra, conforme a técnica de hibridização preconizada para confecção de restaurações. Também foi realizada a impermeabilização da superfície externa das raízes com duas camadas de adesivo cianocrilato, SuperBonder (Henkel, São Paulo, SP, Brasil), aplicadas com pincel, respeitando o período de 30 minutos entre as aplicações. Em seguida as amostras foram fixadas com massa de silicone para impressão, pasta densa (Speedex – Coltene, New York, EUA), em um micro tubo de plástico de 1,5 ml (eppendorf), de modo que a raiz permanecesse na posição vertical voltada para cima, com a massa de silicone envolvendo-a até seu terço médio (Figura 3).

As amostras foram divididas aleatoriamente em seis grupos (n=10), e armazenadas em uma caixa de polipropileno (Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, Estados Unites) (Figura 4). Após, as unidades experimentais foram esterilizadas em autoclave a 120⁰ C durante 30 minutos.



Figura 3 – Selamento do forame apical com resina composta, impermeabilização com cianocrilato e fixação no interior do eppendorf com silicona pesada.



Figura 4 – Caixa de polipropileno.

Controle de Esterilização

Dois dentes de cada grupo foram selecionados aleatoriamente e submetidos ao controle de esterilização. Cada amostra selecionada foi irrigada com água destilada estéril (Decloquimis, São Paulo, SP, Brasil). Após 5 minutos, um cone de papel estéril com calibre #30 (Tanari, Manaus, AM, Brasil) foi colocado e mantido durante 30 segundos no interior de cada canal e em seguida transportados individualmente para tubos eppendorf (Axygen Inc, Union City, CA, EUA) identificados, contendo 1 ml de água destilada estéril. O material foi homogeneizado e semeado em placas de petri com meio de cultura PCA (Plate Count Agar) pela técnica das cinco gotas gota (pinga-se 5 gotas de 15 μ L de cada amostra). As amostras foram incubadas a 37⁰ C durante 48 horas, a fim de verificar o crescimento bacteriano. As amostras selecionadas para controle bacteriano foram novamente distribuídas entre os grupos. O procedimento de controle de esterilização foi realizado sob condições estéreis no interior de uma câmara de fluxo laminar prevenindo qualquer possibilidade de contaminação das amostras (Figura 5).



Figura 5: Câmara de fluxo laminar, Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo.

Preparo do Inóculo

A cepa bacteriana utilizada foi *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), obtida no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo (ICB). As bactérias foram ativadas e cultivadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) durante 24 horas a 37° C em estufa bacteriológica. Após o período de incubação, o grau de

turbidez do inóculo foi ajustado de acordo com a escala 1,0 de MacFarland, que corresponde a $3,0 \times 10^8$ UFC/ml, referente a uma densidade óptica de 0,25 a 550 nm.

Contaminação dos Canais Radiculares

Em cada uma das 60 amostras previamente esterilizadas, foi realizada a inoculação, com auxílio de seringas descartáveis estéreis de 1 ml, preenchendo completamente os canais radiculares com a suspensão de *Enterococcus faecalis*. Essa cultura de *Enterococcus faecalis* foi mantida nos canais durante 15 dias, com renovação do meio de cultura a cada 48 horas para garantir o crescimento e o desenvolvimento bacteriano. A cada renovação do meio de cultura as amostras foram submetidas a centrifugação em uma centrífuga para eppendorfs, com o objetivo de penetração das bactérias no interior dos túbulos dentinários para posterior captação de imagens em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A cada 48 horas, seis dentes (1 de cada grupo) aleatoriamente escolhidos eram submetidos ao controle microbiano para verificar somente o crescimento de *Enterococcus faecalis*, e ausência de contaminação por outras

espécies. Nestas amostras escolhidas, um cone de papel estéril com calibre #30 (Tanari, Manaus, AM, Brasil) era introduzido no canal radicular e mantido durante 30 segundos, com movimentos circulares, tocando as paredes do canal. Logo, o cone era transferido para um microtubo de plástico estéril contendo 1 ml de água destilada estéril, a coleta era homogeneizada em um agitador e então era realizada a semeadura através da técnica das gotas (pinga-se cinco gotas de 15 μ L de cada amostra) em placas de Petri contendo PCA. As amostras foram incubadas a 37 °C durante 48h, após inoculação, analisou-se a morfologia das UFCs cultivadas e foi realizada a coloração de Gram a fim de verificar a confirmação de contaminação por apenas *Enterococcus faecalis* (Figura 6). Todos os procedimentos foram realizados sob condições de assepsia em uma capela de fluxo laminar. Após o período de contaminação as amostras foram irrigadas com água destilada estéril.

Realização da Coleta Inicial

Após o período de contaminação, foi introduzido uma ponta de papel absorvente estéril de calibre #30 no canal radicular de cada amostra, realizando movimentos circulares

a fim de tocar intencionalmente em todas as paredes do canal pelo período de 30 segundos. Depois disso a ponta de papel absorvente foi transferida para um microtubo contendo 1 ml de água destilada estéril. O material foi homogeneizado e diluído a 10^{-3} . Alíquotas dos materiais foram semeadas em placas de Petri contendo PCA através da técnica das cinco gotas, no local correspondente da diluição utilizada (Figura 7). As placas foram identificadas como coleta inicial. Incubou-se durante 24 horas a uma temperatura de 37° C. Após o período de incubação, a contagem de número de unidades formadoras de colônias foi realizada nas placas (coleta inicial).

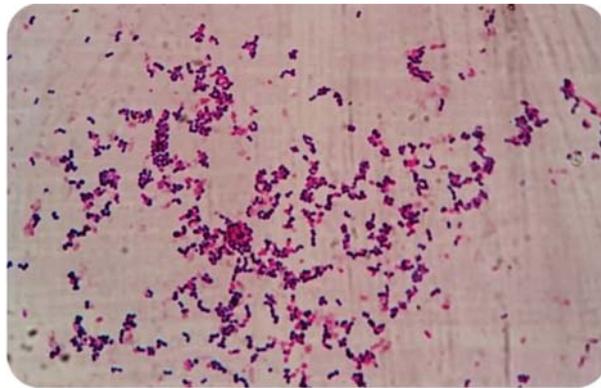


Figura 6 – *Enterococcus faecalis*, coloração de gram.

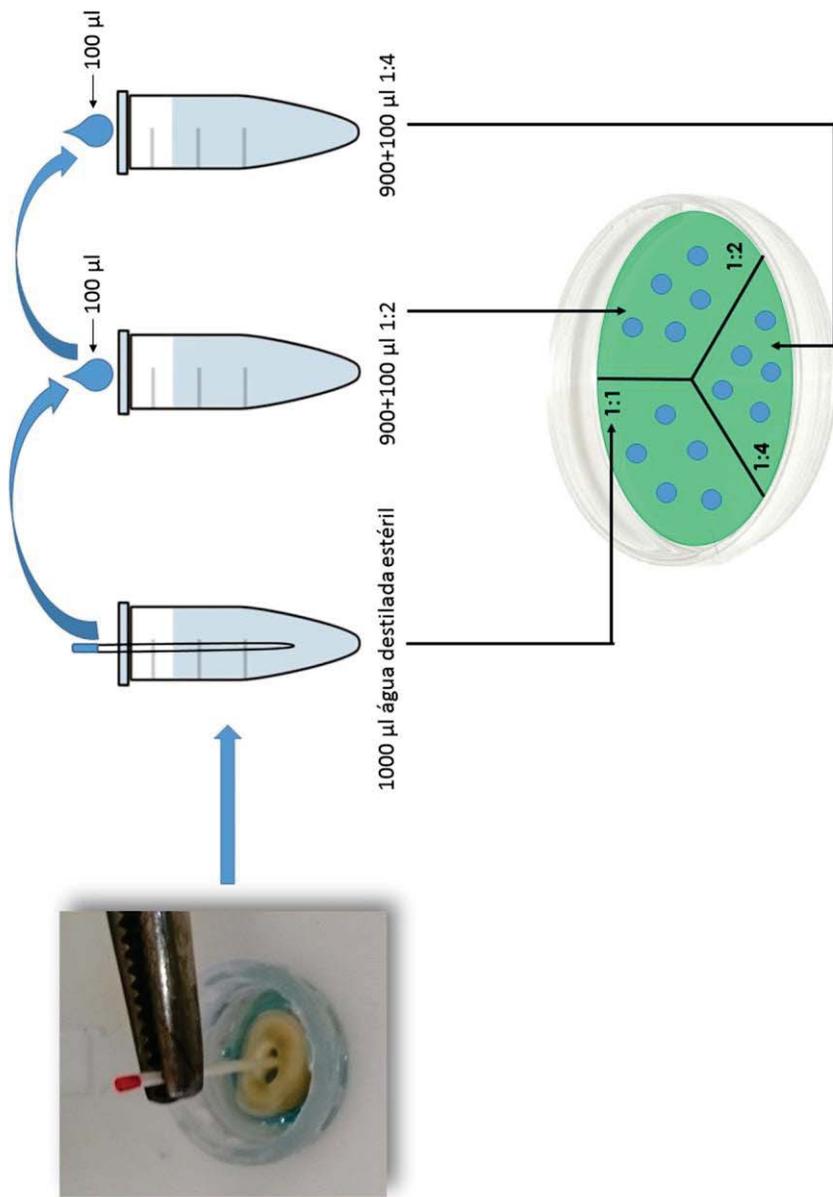


Figura 7 – Esquema de coleta inicial.

Classificação dos Grupos de Tratamento

Após a realização da contaminação com *Enterococcus faecalis*, as amostras de cada grupo (n=10) foram submetidas aos protocolos de descontaminação, como segue:

Grupo1: Água Destilada (DW) (controle): preenchimento dos canais com 2 ml de água destilada estéril (Decloquimis, São Paulo, SP, Brasil), utilizando seringa descartável estéril de 5ml e cânula de calibre 30 (Navi-Tip - Ultradent, South Jordan, UT, Estados Unidos) (Figura 8). Após agitação manual por 1 minuto com lima tipo K #30, a substância permaneceu por 4 minutos no interior do canal radicular, totalizando 5 minutos de contato com as paredes do canal. Após este período, os canais radiculares foram irrigados com 5 mL de água destilada estéril.



Figura 8 – Cânula Navi-Tip calibre 30 para irrigação.

Grupo 2: Clorexidina Líquida 2% (CHX): canal radicular foi preenchido com 2 ml de clorexidina líquida 2% (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brasil), utilizando seringa descartável estéril de 5ml e cânula de calibre 30 (Navi-Tip - Ultradent, South Jordan, UT, Estados Unidos) (Figura 8). Após agitação manual por 1 minuto com lima tipo K #30, a substância permaneceu por 4 minutos no interior do canal radicular, totalizando 5 minutos de contato com as paredes do canal. Após este período, os canais radiculares foram irrigados com 5 mL de água destilada estéril.

Grupo 3: QMix: o canal radicular foi preenchido com 2 ml de QMix (Dentsply Tulsa Dental Specialties, Tulsa, OK, Estados Unidos), utilizando seringa descartável estéril de 5ml e cânula de calibre 30 (Navi-Tip - Ultradent, South Jordan, UT, Estados Unidos) (Figura 8). Após agitação manual por 1 minuto com lima tipo K #30, a substância permaneceu por 4 minutos no interior do canal radicular, totalizando 5 minutos de contato com as paredes do canal. Após este período, os canais radiculares foram irrigados com 5 mL de água destilada estéril.

Grupo 4: Extrato de Semente de Uva 6,5% (GSE): o canal radicular foi preenchido com 2 ml de extrato de semente

de uva (Healthy Origins, Pittsburgh, PA, Estados Unidos) na concentração de 6,5%, utilizando seringa descartável estéril de 5 ml e cânula de calibre 30 (Navi-Tip - Ultradent, South Jordan, UT, Estados Unidos) (Figura 8). Após agitação manual por 1 minuto com lima tipo K #30, a substância permaneceu por 4 minutos no interior do canal radicular, totalizando 5 minutos de contato com as paredes do canal. Após este período, os canais radiculares foram irrigados com 5 mL água destilada estéril. O extrato de semente de uva foi manipulado pelo Laboratório Químico da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo. A matéria prima para substância estava disponibilizada por meio de cápsulas contendo 65 mg de extrato de semente de uva, diluídos em 100 mililitros de água destilada estéril, obtendo 6,5% de princípio ativo para o uso intracanal.

Grupo 5: Terapia Fotodinâmica (PDT) com fibra ótica: o canal radicular foi preenchido com 2 mL de azul de metileno 0,01%. Após agitação manual por 1 minuto com lima tipo K #30, a substância permaneceu por 4 minutos no interior do canal radicular, totalizando 5 minutos de contato com as paredes do canal (tempo de pré-irradiação). Depois disso, a fibra ótica intracanal (Figura 9), acoplada à ponta do

aparelho Therapy XT (DMC Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil), foi introduzida no interior do canal, 2mm aquém do comprimento de trabalho (Figura 10). A fonte de luz de baixa intensidade foi acionada com emissão contínua durante 90 segundos, correspondendo a uma entrega total de 9J de energia luminosa, com 100mW de potência e um comprimento de onda de 660nm, de acordo com instruções do fabricante. Após o protocolo de terapia fotodinâmica, os canais radiculares foram irrigados com 5 mL de água destilada estéril.

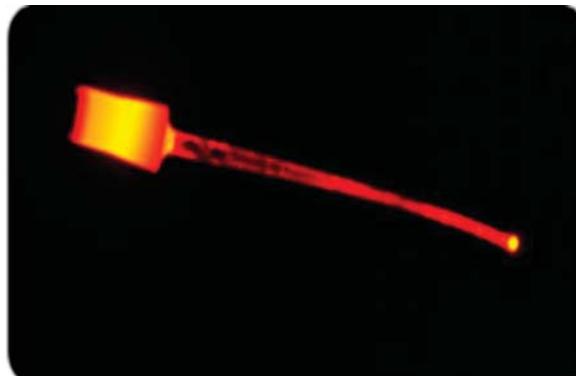


Figura 9 – Fibra óptica intracanal.



Figura 10 – Grupo 5 (PDT com fibra).

Grupo 6: Terapia Fotodinâmica (PDT) sem fibra ótica: canal radicular preenchido com 2 mL de azul de metileno 0,01%. Após agitação manual por 1 minuto com lima tipo K #30, a substância permaneceu por 4 minutos no interior do canal radicular, totalizando 5 minutos de contato com as paredes do canal (tempo de pré-irradiação). Depois disso, a ponta do aparelho Therapy XT (DMC Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil), foi posicionada na entrada do canal radicular. A fonte de luz de baixa intensidade foi acionada com emissão contínua durante 90 segundos, correspondendo a uma entrega total de 9J de energia luminosa, com 100mW de potência e um comprimento de onda de 660nm, de acordo

com instruções do fabricante (Figura 11). Após o protocolo de terapia fotodinâmica, os canais radiculares foram irrigados com 5 mL de água destilada estéril.



Figura 11 – Tratamento do grupo 6 (PDT sem fibra).

Análise Microbiológica

Após os respectivos tratamentos, um cone de papel absorvente estéril de calibre #30 foi introduzido no interior de cada canal e agitado de maneira circunferencial com toque intencional nas paredes do canal, durante 30 segundos. Após, cada cone de papel foi transferido para um microtubo contendo 1ml de água destilada estéril. O material foi

homogeneizado e diluído a 10^{-3} . Alíquotas desta suspensão foram semeadas em placas de petri com meio de cultura PCA (Plate Count Agar) pela técnica das cinco gotas (pinga-se 5 gotas de $15\mu\text{L}$ de cada amostra) no local correspondente a diluição utilizada, conforme realizado na coleta inicial (Figura 7). Estas placas, identificadas como coleta final, foram incubadas durante 24 horas a 37°C . Após o período de incubação foi realizada a contagem do número de UFCs (unidades formadoras de colônias).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP, Piracicaba, SP, Brasil). Após colhida amostras microbiológicas, as raízes foram fixadas durante 7 dias em glutaraldeído a 2% e lavada três vezes durante 30 minutos em uma proporção de 0,2 M de tampão de fosfato de 1:1 e água destilada. Após a desidratação, as raízes foram seccionadas longitudinalmente, proporcionando duas metades de cada amostra. As amostras foram colocadas em bases com a porção do canal radicular

posicionada para cima e revestida com ouro-paládio para a condução de elétrons. A aquisição de imagens foi realizada por microscópio eletrônico de varredura (Philips XL 30, Eindhoven, Holanda), utilizando o recurso de retroespalhamento (BSE). Os registros de imagens foram feitas em 5000x nas paredes do canal do espaço do canal radicular. O recurso de microscopia eletrônica de varredura foi usado apenas para ilustrar os resultados da análise microbiológica.

Preparo das amostras para teste do push-out

Foram utilizadas 30 raízes remanescentes da amostra total para esta etapa da pesquisa. O preparo das amostras foi realizado da mesma maneira descrita para os testes microbiológicos mais o preparo com brocas Gates Glidden na sequencia 2, 3, 4 e 5, afim de se obter um canal cilíndrico com diâmetro de aproximadamente 1,3mm. Nesta etapa da pesquisa as unidades experimentais não passaram pela fase de contaminação, sendo diretamente submetidas aos protocolos de descontaminação conforme a divisão dos grupos explicada nos testes microbiológicos.

Após os protocolos de descontaminação final, as raízes (n=5) de cada grupo foram secas com cones de papel estéreis F3 (Dentsply Industria e Comércio Ltda, Petrópolis-RJ, Brasil) do sistema ProTaper (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) e obturadas pela técnica da condensação lateral: aplicação de cimento em toda extensão do cone mestre de guta-percha calibrado no comprimento de trabalho, posicionamento do cone previamente calibrado no interior do canal radicular, nova aplicação de cimento em toda extensão do cone e reposicionamento do mesmo no interior do canal radicular (Figura 12A). Em seguida, cones acessórios XF (Dentsply Industria e Comércio Ltda, Petrópolis-RJ, Brasil) foram introduzidos com auxílio de um espaçador digital “B” (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). Os cones acessórios foram utilizados até o momento em que o espaçador digital não penetrasse mais do que cinco milímetros no canal. Então, foi realizado o corte do excesso de cones de guta percha com auxílio de um condensador vertical de Paiva número 2 (SS White Duflex, Rio de Janeiro-RJ, Brasil) aquecido em lâmparina e após, realizada a condensação vertical com o mesmo condensador. Foram utilizados como cone mestre, cones de guta-percha F3 do Sistema ProTaper (Dentsply

Industria e Comércio Ltda, Petrópolis-RJ, Brasil). O cimento obturador utilizado foi o AH plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany) (Figura 12B).



Figura 12A – Cone de papel absorvente F3.



Figura 12B – Cimento obturador AH Plus.

Depois de obturadas, as amostras foram armazenadas durante 20 dias sobre uma gaze mantida úmida pela aplicação diária de 3 ml de água destilada sobre a mesma, no interior de uma estufa com temperatura constante de 37⁰C.

Após o período de armazenamento as raízes foram fixadas com cera pegajosa em uma placa de acrílico (60x20x3mm) para que pudessem ser posicionadas em uma cortadeira metalográfica. Foram realizadas secções horizontais nas raízes, obtendo-se um total de cinco fatias com aproximadamente 1mm de espessura de cada raíz, (Figura 13) totalizando 25 discos por grupo. Estes discos de dentina foram submetidos ao teste de push-out.

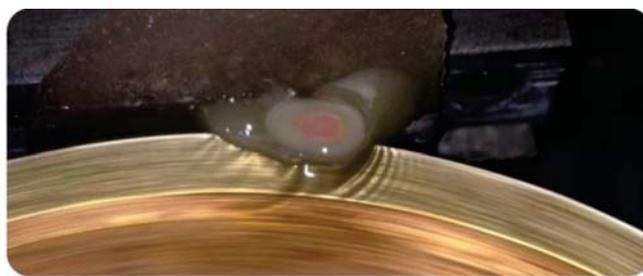


Figura 13 – Amostra fixada em placa de acrílico com cera pegajosa, acoplada a cortadeira metalográfica.

Para o teste de pushout, os vinte e cinco discos de dentina e material obturador de cada grupo foram posicionados com a parte cervical do corte voltada para baixo sobre a mesa (perfurada no centro) do dispositivo. Uma força vertical de cima para baixo foi aplicada perpendicularmente ao material obturador por meio de um pistão metálico, o qual apresentava secção circular, cobrindo a maior área de material obturador possível sem tocar as paredes de dentina (1mm de diâmetro). O pistão metálico estava conectado a uma célula de carga de 500N, a qual estava conectada a uma máquina de ensaios universais (Emic). O teste foi realizado com uma velocidade de 1mm por minuto e a carga foi aplicada até que ocorresse a extrusão do material obturador, obtendo-se a medida de força em newtons necessária para o deslocamento no computador conectado à máquina de ensaio (Figura 14).

Após os testes de pushout os discos de dentina foram observados no microscópio óptico Zeiss acoplado ao computador, de forma que em um aumento de 50x visualizado no monitor do dispositivo fosse possível medir o perímetro do canal na porção cervical e apical do disco de dentina (Figura 15). A medida do perímetro foi inserida na fórmula $C=2\pi R$, obtendo-se desta maneira, uma medida média dos raios. Esta

média dos raios foi utilizada para o cálculo da área lateral do tronco do cone, utilizando a fórmula, conforme descrito no trabalho de Dias *et al.* (2014): $A = \pi \cdot (R+r) \cdot [h^2 + (R-r)^2]^{0.5}$.



Figura 14 – Disco de dentina sendo submetido ao teste de push out.



Figura 15 – Microscópio Zeiss – medida do perímetro do canal.

A força de adesão foi calculada em MPa, através da divisão da força obtida no teste de pushout pela área de superfície do canal. Ao mesmo tempo, no microscópio óptico, foram observados e classificados os padrões de falha no material obturador em:

1) Falha adesiva: entre dentina e cimento, ausência de cimento nas paredes dentinárias do canal radicular.

2) Falha coesiva: falha do material obturador (cimento/gutta-percha), presença de cimento obturador nas paredes dentinárias do canal radicular.

3) Falha mista: ambas as falhas puderam ser observadas.

Análise estatística

A análise estatística para parte microbiológica do estudo foi realizada calculando o percentual de redução de *Enterococcus faecalis* a partir da contagem inicial e final de unidades formadoras de colônias nos diferentes grupos de protocolos de descontaminação final, utilizando a seguinte fórmula: Percentual de redução = $100 - [(Valor\ final/Valor\ inicial) \times 100]$.

Para a análise da capacidade de desinfecção dos protocolos de descontaminação final foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido pelo post-hoc de Tukey. Os valores de força de adesão obtidos no push out foram analisados pelo teste one-way ANOVA. A correlação entre a capacidade de desinfecção e força de adesão foi verificada pelo coeficiente de correlação de Pearson. Os padrões de falha foram analisados pelo teste chi-quadrado. Todas as análises utilizaram um nível de significância de 5%. Os dados foram analisados utilizando o programa SPSS versão 17.0 (SPSS, Chicago, IL, Estados Unidos).

A figura 16 demonstra um fluxograma da metodologia utilizada.

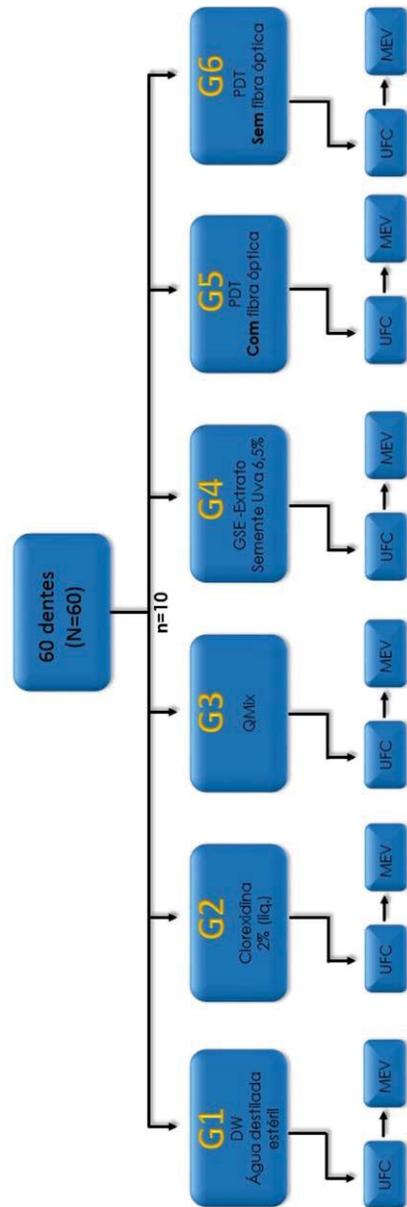


Figura 16A – Fluxograma da metodologia utilizada: teste microbiológico e MEV.

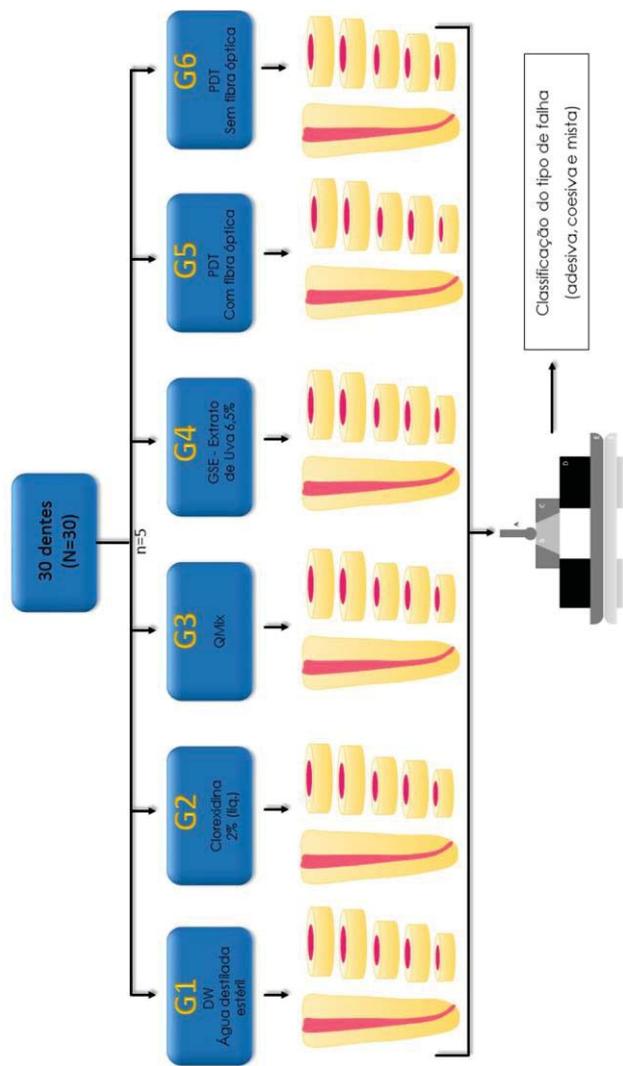


Figura 16B – Fluxograma da metodologia utilizada: Push out.

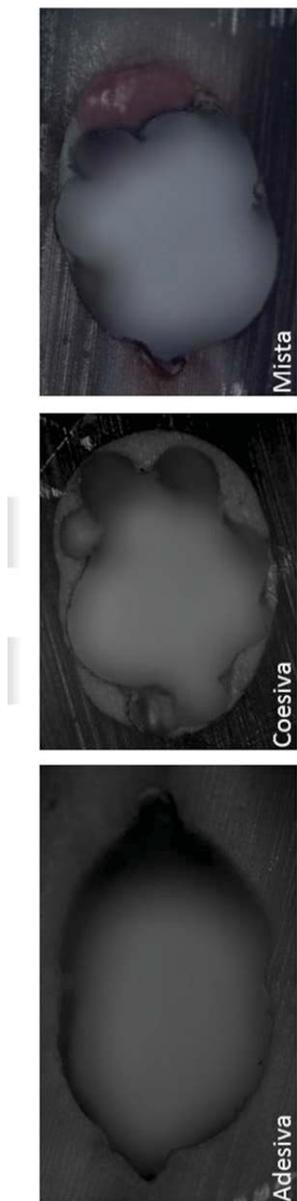


Figura 16C – Fluxograma da metodologia utilizada: Padrões de falha.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média e desvio padrão do percentual de redução do *Enterococcus faecalis* estão expressos na Tabela 1. A força de adesão do teste de push out e o padrão de falha do material obturador estão expressos na Tabela 2.

A maior capacidade de redução bacteriana foi observada nos grupos 2-clorexidina líquida 2%, 3-QMix e 4-extrato de semente de uva 6,5% ($p>0.05$), tendo a clorexidina alcançado 100% de redução. No entanto não foram verificadas diferenças significativas entre estes três grupos. Os grupos 5-PDT com fibra óptica e 6-PDT sem fibra óptica demonstraram uma redução bacteriana significativamente menor quando comparados aos grupos anteriores (2, 3 e 4) e estatisticamente superior ao grupo 1 (água destilada) ($p<0.05$). O grupo 1-água destilada resultou na menor capacidade de redução bacteriana dentre os grupos testados, com diferenças significativas quando comparado aos demais grupos ($p<0.05$). A figura 17 promove uma ilustração do efeito dos protocolos de descontaminação final propostos em

microscopia eletrônica de varredura, enquanto que a figura 18 promove uma ilustração das placas de petri onde a contagem de unidades formadoras de colônias (coleta inicial e final) foi realizada.

Para o teste de push out, os protocolos de descontaminação final demonstraram valores de força de adesão similares sem diferenças significativas, sugerindo que os mesmos não interferem na força de adesão do material obturador à dentina ($p > 0.05$). Uma correlação moderada na capacidade de redução bacteriana e força de adesão foi observada ($r = -0.543$). O teste chi-quadrado não demonstrou diferença estatística significativa para os padrões de falha dentre os grupos testados ($p = 0.782$). Contudo, foi verificada uma predominância do padrão de falha coesiva para todos os grupos, sendo as falhas dos tipos mista e adesiva menos frequentes.

TABELA 1. Média e desvio padrão do percentual de redução de *Enterococcus faecalis* (%).

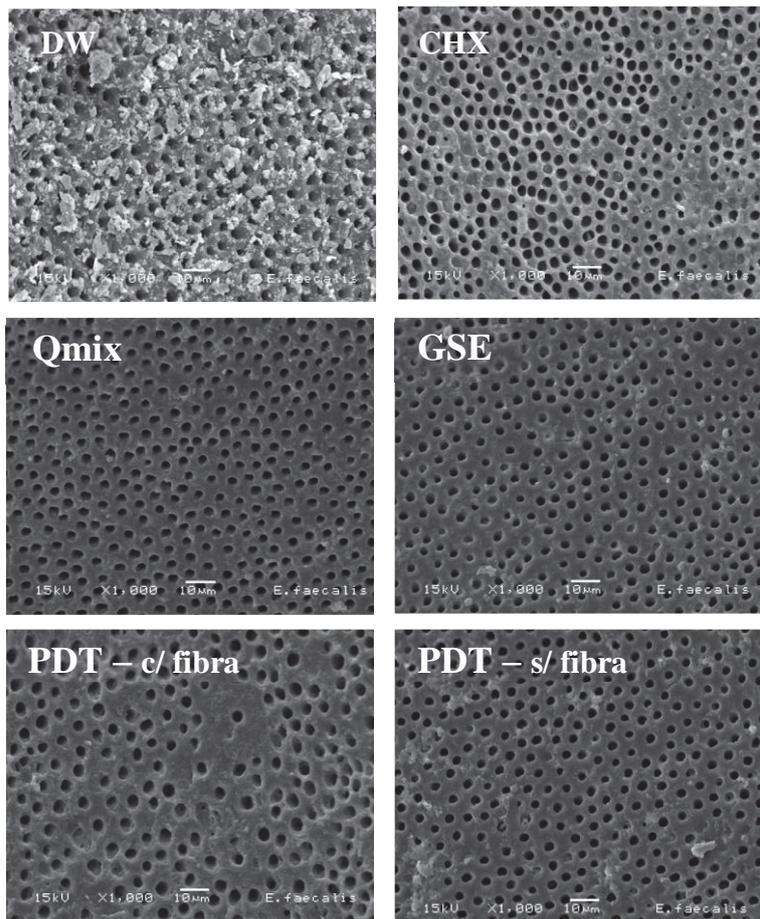
Groups	Bacterial reduction
DW	0.57 (0.59) ^c
CHX	100.00 (0.00) ^a
QMix	99.97 (0.03) ^a
GSE	98.02 (3.74) ^{ab}
PDT com fibra	96.67 (3.76) ^b
PDT sem fibra	96.04 (2.54) ^b

DW, água destilada; CHX, clorexidina 2% líquida; QMix, solução QMix, GSE, solução de extrato de semente de uva 6,5%; PDT, terapia fotodinâmica. Letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0.05$).

TABELA 2. Força de adesão do teste de push out (MPa) e padrão de falha do material obturador (%)

Groups	Push Out Bond Strength	Failure mode		
		Adhesive	Mixed	Cohesive
DW	1.03 (0.64) ^a	8.00	20.00	72.00
CHX	0.69 (0.44) ^a	12.00	12.00	76.00
QMix	0.78 (0.50) ^a	12.00	24.00	64.00
GSE	0.93 (0.55) ^a	4.00	28.00	68.00
PDT com fibra	0.68 (0.64) ^a	8.00	24.00	68.00
PDT sem fibra	1.03 (0.80) ^a	12.00	20.00	68.00

DW, água destilada; CHX, clorexidina 2% líquida; QMix, solução QMix, GSE, solução de extrato de semente de uva 6,5%; PDT, terapia fotodinâmica. Letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0.05$).



*Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura: imagens de microscopia eletrônica de varredura ilustrando a efetividade de redução de *Enterococcus faecalis* de cada protocolo de descontaminação final. DW = água destilada; CHX = clorexidina líquida 2%; QMix; GSE = extrato de semente de uva 6,5%; PDT = terapia fotodinâmica.*

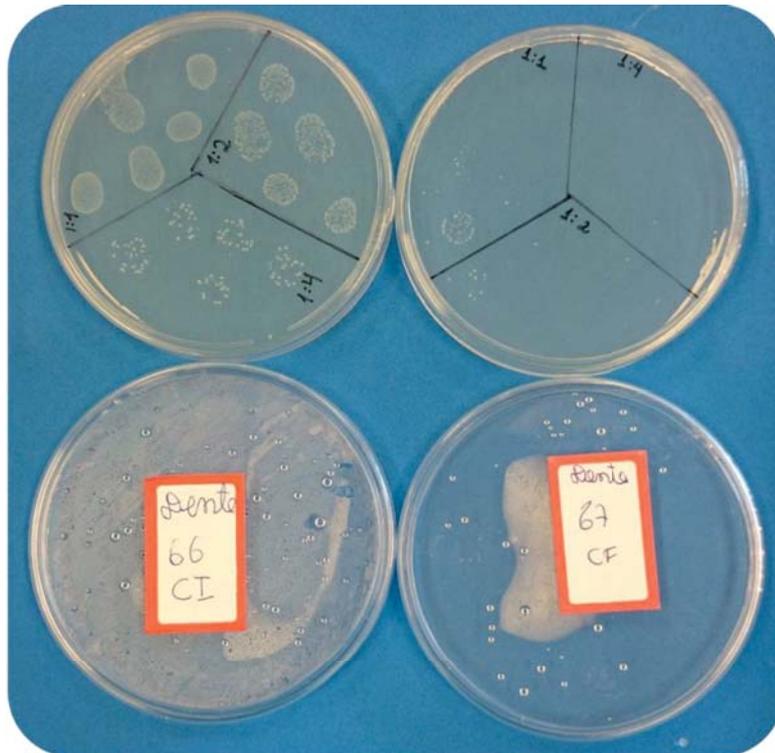


Figura 18 - Unidades formadoras de colônias: imagem das placas de Petri exemplificando a coleta inicial e a coleta final de uma das amostras de um dos grupos de tratamento, comparando a efetividade da redução de *Enterococcus faecalis* - (Grupo 6 – terapia fotodinâmica sem fibra).

O objetivo principal do tratamento endodôntico é realizar uma adequada limpeza e modelagem do sistema de canais radiculares. Isso se deve ao fato de que a grande maioria das alterações patológicas que acometem a polpa e, conseqüentemente, os tecidos periapicais, apresenta etiologia microbiana (Sundqvist, 1976). Neste cenário, os microorganismos desempenham um papel fundamental na indução e, principalmente, na perpetuação destas condições (Kakehashi *et al.*, 1965), sendo necessário um adequado processo de descontaminação através do uso de substâncias químicas e recursos auxiliares, que irão contribuir para a limpeza de todo o sistema, e de instrumentos endodônticos, que irão contribuir para a modelagem do espaço principal do canal radicular. Além disso, o sucesso do tratamento endodôntico vai depender, além de uma adequada descontaminação e modelagem, da obturação tridimensional do sistema de canais radiculares (Schilder, 1974), usando materiais que apresentem propriedades biológicas e físico-químicas ideais para o preenchimento deste espaço. Estes materiais devem apresentar capacidade de controlar a infiltração marginal e possibilitar a criação de um ambiente

favorável para a regeneração tecidual na região periapical (Sjogren *et al.*, 1990; Gutmann, 1992).

De acordo com Peters (2004) e Vaudt *et al.* (2009), existem áreas das paredes do canal radicular principal que não são tocadas pelos instrumentos endodônticos durante a realização do preparo químico-mecânico. Nesse sentido, diferentes substâncias químicas auxiliares têm sido apontadas no intuito de efetuar a limpeza e eliminar os agentes irritantes concomitantemente com a ação mecânica dos instrumentos endodônticos durante o preparo dos canais radiculares. O hipoclorito de sódio (NaOCl) é conhecido pela sua atividade antimicrobiana (Siqueira *et al.*, 1998; Du *et al.*, 2013; Niazi *et al.*, 2014) e a capacidade de promover a dissolução da matéria orgânica (Okino *et al.*, 2004). No entanto, a presença das complexidades anatômicas representa uma dificuldade no processo de descontaminação do sistema de canais radiculares, podendo haver a permanência de microorganismos e detritos orgânicos nesta região (George *et al.*, 2005), trazendo a necessidade da utilização de protocolos auxiliares de descontaminação, realizados após o preparo químico-mecânico convencional.

O *Enterococcus faecalis* é um microrganismo anaeróbio facultativo que é altamente resistente ao preparo químico-mecânico convencional e frequentemente é encontrado nos casos de insucesso do tratamento endodôntico (Pinheiro *et al.*, 2003). Este microrganismo tem vários fatores de virulência e é capaz de resistir a longos períodos de limitação de nutrientes, persistindo como um patógeno no canal radicular (Figdor *et al.*, 2003; Tendolkar *et al.*, 2003). O modelo de crescimento bacteriano utilizado no presente estudo já havia sido relatado em estudos anteriores que se concentravam em estratégias antimicrobianas contra *Enterococcus faecalis* (De Almeida *et al.*, 2014; Ghinzelli *et al.*, 2014). Este microrganismo foi escolhido devido a sua capacidade de penetrar túbulos dentinários e colonizar o sistema de canais radiculares (Sedgley *et al.*, 2005). No entanto, não há consenso na literatura sobre o tempo necessário para realizar esse crescimento bacteriano, com estimativas variando de 24 horas (Chavez De Paz *et al.*, 2010) a 50 dias (Grundling *et al.*, 2011). No presente estudo, foi adotado o período de 15 dias de contaminação, acreditando ser um tempo suficiente para propiciar o crescimento bacteriano e garantir que os protocolos de descontaminação

pudessem ser efetivamente testados, simulando a situação clínica da melhor forma.

O modelo de contaminação com *Enterococcus faecalis* foi realizado em dentes humanos extraídos no presente estudo, ao contrário de alguns estudos prévios onde foram utilizados dentes bovinos como modelo para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de descontaminação (Menezes *et al.*, 2004; Grundling *et al.*, 2011; De Almeida *et al.*, 2014). Os dentes bovinos podem ser facilmente obtidos e têm demonstrado uma estrutura morfológica padronizada, uma vez que os animais são abatidos com a mesma idade, assegurando características similares e evitando algumas variáveis que são encontradas em dentes humanos. Além disso, a dentina dos dentes bovinos apresenta semelhança com a dentina humana, no que diz respeito à estrutura, composição e quantidade de túbulos dentinários (Orstavik e Haapasalo, 1990), o que justifica a utilização deste modelo em estudos prévios. Os dentes humanos utilizados no presente estudo foram obtidos junto ao Biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, onde existe um rigoroso controle de armazenamento e divisão por faixa etária dos dentes extraídos, o que, além de assegurar uma

padronização morfológica e estrutural das amostras, contribui para a simulação das reais condições clínicas em que são utilizados os protocolos de descontaminação.

Diferentes recursos auxiliares de descontaminação têm sido utilizados na endodontia no intuito de contribuir para o processo de descontaminação do sistema de canais radiculares após a realização do preparo químico-mecânico convencional, criando condições adequadas para obturação e, posteriormente, para o reparo da região periapical acometida por um processo de infecção microbiana. O presente estudo propôs a comparação de cinco protocolos de descontaminação final e sua influência na força de adesão do material obturador à dentina radicular: clorexidina líquida 2%, uma base forte com propriedade antimicrobiana (Ferraz *et al.*, 2001), QMix, um novo irrigante endodôntico que contém EDTA, clorexidina e agente surfactante em sua composição (Stojicic *et al.*, 2012), extrato de semente de uva 6,5%, um recurso natural que possui atividade antimicrobiana (Cecchin, Farina, *et al.*, 2015), e a terapia fotodinâmica, uma nova modalidade terapêutica que envolve a combinação de uma fonte de luz de baixa intensidade e um fotosensibilizador não-tóxico (De Oliveira *et al.*, 2011), sendo esta avaliada com

e sem a presença de fibra óptica intracanal. O tempo de permanência destas substâncias no interior do canal radicular foi de 5 minutos, uma vez que, de acordo com instruções do fabricante, o fotossensibilizador utilizado na terapia fotodinâmica precisa permanecer por este tempo em contato com as paredes do canal antes do processo de irradiação com a luz de baixa intensidade. Dessa forma, o mesmo período foi padronizado para as demais substâncias. Além disso, a ampliação dos canais radiculares foi realizada previamente à contaminação e execução dos protocolos de descontaminação, de forma similar a estudos prévios (De Almeida *et al.*, 2014; Ghinzelli *et al.*, 2014; Cecchin, Farina, *et al.*, 2015). Isso assegura uma adequada padronização do diâmetro do canal radicular e criação de um espaço adequado para o crescimento bacteriano, além do fato que a realização do preparo após a contaminação, possivelmente eliminaria consideravelmente a contaminação, impossibilitando a avaliação da desinfecção dos protocolos finais testados.

Atualmente, existem diferentes metodologias laboratoriais para que seja avaliado o grau de descontaminação proporcionado por um determinado protocolo. A contagem de unidades formadoras de colônias

(UFCs) foi utilizada para avaliar os efeitos dos tratamentos propostos no presente estudo. Este método foi escolhido com base em estudos anteriores (Evans *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2004; Grundling *et al.*, 2011; De Almeida *et al.*, 2014; Ghinzelli *et al.*, 2014; Cecchin, Farina, *et al.*, 2015) uma vez que permite, de uma forma aceitável, a quantificação de bactérias a partir do espaço do canal radicular (Peters *et al.*, 1995). Apesar de a técnica ser executada de forma muito similar entre os estudos, a maior diferença encontrada é em relação aos momentos que a coleta foi realizada. O presente estudo estabeleceu dois momentos de coleta: inicial e final, com o objetivo de verificar a quantidade de contaminação prévia ao tratamento proposto, e o grau de descontaminação final de cada amostra, através de um percentual de redução microbiana, após execução do tratamento, além de ilustrar a eficácia dos tratamentos propostos através da microscopia eletrônica de varredura. No entanto, as amostras microbiológicas só foram coletadas a partir do canal principal. Dessa forma, não foi possível avaliar a presença de bactérias na profundidade dos túbulos dentinários ou o número de células viáveis, como no caso de estudo prévio (Böttcher *et al.*, 2015), onde a viabilidade bacteriana foi

quantificada através de médias, a partir da realização de microscopia laser confocal.

A clorexidina é considerada uma base forte da família das bisbiguanidas que apresenta propriedades catiônicas (Nerurkar *et al.*, 1995). De acordo com os resultados do presente estudo, o grupo 2 (clorexidina líquida 2%) demonstrou uma capacidade de neutralização completa de *Enterococcus faecalis* do interior do canal radicular. Estes achados estão em acórdância com estudos prévios, onde foi demonstrada uma efetiva ação antimicrobiana contra patógenos endodônticos nos grupos onde foram utilizadas diferentes formulações de clorexidina 2% (Ferraz *et al.*, 2001; Menezes *et al.*, 2004; Dametto *et al.*, 2005). O mecanismo de ação antimicrobiana desta substância pode ser explicado através da interação entre as moléculas de clorexidina carregadas positivamente e a parede celular bacteriana carregada negativamente, trazendo como consequência uma alteração do equilíbrio osmótico celular. Dessa forma, haverá um aumento da permeabilidade da parede celular, o que permite a penetração das moléculas de clorexidina no interior da bactéria. A ação bactericida destas moléculas irá promover

uma precipitação do conteúdo citoplasmático, ocasionando a morte celular bacteriana (Gomes *et al.*, 2003).

Além de uma efetiva ação antimicrobiana contra patógenos endodônticos, entre os quais se incluem o *Enterococcus faecalis*, a clorexidina também apresenta substantividade. Através de um processo de adsorção, as moléculas de clorexidina entram em contato com superfícies cobertas com proteínas ácidas, entre as quais se incluem a hidroxiapatita, sendo lentamente liberada na medida em que sua concentração no meio decresce (Carrilho *et al.*, 2010). De acordo com estudo prévio de Souza *et al.* (2012), a clorexidina, gel e líquida, permaneceu retida na dentina radicular por até 90 dias. Ao mesmo tempo, Böttcher *et al.* (2015), demonstraram uma redução significativa do percentual de células bacterianas viáveis de *Enterococcus faecalis* após 30 dias da utilização de clorexidina líquida 2% na dentina radicular humana. Além disso, em conjunto com a ação antimicrobiana e a substantividade, a clorexidina não interfere na estabilidade de união entre o material restaurador e a dentina (Carrilho, Carvalho, *et al.*, 2007) e apresenta ausência de citotoxicidade (Ribeiro *et al.*, 2005). Por essas razões, a clorexidina líquida pode ser considerada um efetivo

protocolo no auxílio ao processo de descontaminação do sistema de canais radiculares, posteriormente à realização do preparo químico-mecânico convencional.

A associação de diferentes substâncias químicas auxiliares pode ser uma alternativa no intuito de contribuir para o processo de descontaminação do sistema de canais radiculares. O efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina 0,2%, usados em combinação, pode resultar numa maior redução do conteúdo microbiano quando comparado ao uso isolado do hipoclorito de sódio na mesma concentração (Kuruvilla e Kamath, 1998). No entanto, a associação das duas substâncias resulta na formação de um precipitado de coloração marrom escura (Basrani *et al.*, 2007), que apresenta paracloroanilina em sua composição e, conseqüentemente, possui potencial cancerígeno (Arslan *et al.*, 2015). Além disso, esse precipitado atua como uma *smear layer* química, obliterando os túbulos dentinários, reduzindo a permeabilidade dentinária à penetração de substâncias químicas auxiliares e material obturador (Akisue *et al.*, 2010) e podendo interferir na resistência de união do material obturador à dentina radicular (Khayat e Jahanbin, 2005). Nesse sentido, uma irrigação efetiva, com um agente irrigante

intermediário, deve ser realizada entre o uso das duas substâncias.

Os resultados do presente estudo demonstraram que os grupos 3 (QMix) e 4 (extrato de semente de uva 6,5%) foram estatisticamente similares ao grupo 2 (clorexidina líquida 2%) quanto à capacidade de limpeza dos canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*. O QMix, substância proposta para ser utilizada como irrigante final após o preparo químico convencional, apresenta clorexidina e um agente surfactante em sua composição. Estes componentes contribuem para a redução de microorganismos do interior dos canais radiculares, ao passo que a clorexidina apresenta amplo espectro antimicrobiano (Ferraz *et al.*, 2001; Menezes *et al.*, 2004; Dametto *et al.*, 2005) e o agente surfactante diminui a tensão superficial do produto, tornando mais efetiva a penetração do mesmo no sistema de canais radiculares (Giardino *et al.*, 2006). Por outro lado, o extrato de semente de uva 6,5% apresenta em sua composição proantocianidinas e compostos fenólicos. De acordo com estudos prévios, estes componentes possuem propriedades antimicrobianas contra bactérias gram positivas e gram negativas (Al-Habib *et al.*, 2010; Kao *et al.*, 2010; Furiga *et al.*, 2014), bem como atuam

no combate de patógenos endodônticos, tais como cepas de *Streptococcus ssp* (Thimothe *et al.*, 2007; Furiga *et al.*, 2009), o que ajuda a explicar sua efetiva capacidade de neutralização do *Enterococcus faecalis* no presente estudo.

Além da ação antimicrobiana, relatada em estudos prévios e confirmada no presente estudo, as formulações de QMix e extrato de semente de uva apresentam propriedades que podem agregar aspectos positivos dentro da terapia endodôntica. O QMix apresenta na sua composição o EDTA, um agente quelante que promove descalcificação da porção inorgânica da dentina (De-Deus *et al.*, 2008) e que apresenta, reconhecidamente, a capacidade de remover de forma efetiva a *smear layer* das paredes dos canais radiculares (Prado *et al.*, 2011; Stojicic *et al.*, 2012; Castagna *et al.*, 2013). Além disso, apesar da presença do EDTA em sua composição, o QMix promove uma baixa erosão na estrutura dentinária (Torabinejad *et al.*, 2003; Saghiri *et al.*, 2009). O extrato de semente de uva, por sua vez, apresenta na sua composição proantocianidinas, que interferem positivamente nas propriedades mecânicas da dentina (Cecchin, Pin, *et al.*, 2015), além de reduzir a absorção de água e estabilizar a degradação do colágeno na estrutura dentinária (Aguiar *et al.*,

2014; Vidal *et al.*, 2014). Estas propriedades, de ambas substâncias, irão contribuir para a manutenção da qualidade do substrato dentinário para posterior obturação endodôntica e restauração coronária utilizando materiais resinosos. Dessa forma, o QMix e o extrato de semente de uva podem ser considerados alternativas auxiliares de irrigação final, contribuindo tanto para o processo de descontaminação do sistema de canais radiculares, como, também, para a manutenção a longo prazo do dente tratado endodonticamente.

A terapia fotodinâmica tem sido considerada uma nova modalidade terapêutica no intuito de potencializar a desinfecção do sistema de canais radiculares, que envolve a associação entre uma fonte de luz gerada por uma laser de baixa intensidade e um fotosensibilizador não tóxico (De Oliveira *et al.*, 2011). Apesar dos resultados do presente estudo terem demonstrado uma redução de *Enterococcus faecalis* significativamente menor dos grupos 5 (PDT com fibra intracanal) e 6 (PDT sem fibra intracanal), quando comparado aos grupos 2 (CHX líquida 2%), 3 (QMix) e 4 (GSE 6,5%), o potencial de descontaminação dos grupos onde foi realizada a terapia fotodinâmica pode ser considerado

elevado, uma vez que mostrou-se significativamente superior ao grupo controle (água destilada), atingiu índices de redução microbiana superiores a 96% e, na prática clínica, atuará como um complemento ao preparo químico-mecânico convencional (Vaziri *et al.*, 2012). Resultados similares foram encontrados em estudos prévios, onde a terapia fotodinâmica apresentou uma efetiva eliminação bacteriana variando entre 73% e 100%, sendo eficaz no combate ao *Enterococcus faecalis* (Soukos *et al.*, 2006; Garcez *et al.*, 2007; Garcez *et al.*, 2010; Nagayoshi *et al.*, 2011; Ng *et al.*, 2011; Rios *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2012; Vaziri *et al.*, 2012; Komine e Tsujimoto, 2013; Yildirim *et al.*, 2013; Zand *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica pode ser explicado através da reação que ocorre entre a fonte de luz do laser de baixa intensidade e o oxigênio molecular, produzindo moléculas de oxigênio consideradas altamente reativas. Estas moléculas irão atuar em componentes celulares bacterianos através de reações de óxido-redução, induzindo a morte de espécies microbianas (Demidova e Hamblin, 2004; Dai *et al.*, 2009). Além de uma efetiva ação antimicrobiana, a terapia fotodinâmica se constitui uma técnica não invasiva e de rápida aplicação no

canal radicular, apresenta baixa toxicidade, as complexidades anatômicas não se constituem uma barreira para a fonte de luz no processo de descontaminação e não causa efeitos adversos nos tecidos adjacentes (Soukos *et al.*, 2006; Convissar, 2011; Nagayoshi *et al.*, 2011). Além disso, Xu *et al.* (2009), sugerem a existência de uma janela terapêutica segura pela qual a terapia fotodinâmica pode inativar os patógenos endodônticos sem afetar a viabilidade das células do hospedeiro. Dessa forma, o presente estudo também sugere a utilização da terapia fotodinâmica, após o preparo químico-mecânico convencional, como protocolo de descontaminação final no tratamento endodôntico.

A principal desvantagem da terapia fotodinâmica é que não existe na literatura um protocolo padrão de aplicação desta modalidade terapêutica, bem como o alto custo, devido a necessidade de aquisição do dispositivo laser. Fotossensibilizadores, tempo de pré-irradiação, comprimento de onda, energia desprendida e potência são algumas das variáveis da terapia fotodinâmica que são encontradas na literatura. No presente estudo, foi utilizado o fotosensibilizador azul de metileno na concentração de 0,01%, estabelecendo um tempo de contato com o conteúdo microbiano de 5

minutos, sendo este realizado previamente à irradiação e estando de acordo com estudos prévios (Fonseca *et al.*, 2008; Zand *et al.*, 2014). O comprimento de onda, tempo de irradiação, a energia desprendida e a potência utilizados foram os preconizados pelo fabricante do dispositivo, sendo de 600nm, 90 segundos, 9J e 100mW, respectivamente, estando de acordo com a literatura (Convissar, 2011; Yildirim *et al.*, 2013).

Além das variáveis já mencionadas referentes ao protocolo de execução da terapia fotodinâmica, também deve ser levada em consideração a forma de entrega da luz laser de baixa intensidade, com ou sem a utilização de fibra óptica intracanal. Garcez *et al.* (2013), conduziram um estudo com intuito de verificar a necessidade da utilização de uma fibra óptica intracanal. Os resultados obtidos demonstraram maior sanificação dos canais radiculares com a introdução de uma fibra óptica intracanal. No entanto, Nunes *et al.* (2011), concluem, em estudo prévio, que não há diferenças significantes de descontaminação com ou sem uso de fibra óptica intracanal. Estes resultados estão em concordância com os resultados do presente estudo, onde não houve diferença significativa entre os grupos 5 (PDT com fibra intracanal) e

6 (PDT sem fibra intracanal). Possivelmente a ausência de um protocolo estabelecido para a realização da terapia fotodinâmica é o motivo de conclusões divergentes na literatura. Além disso, a presença ou ausência da porção coronária também pode ser considerado um fator relevante e que influencia os resultados desta modalidade terapêutica.

A força de adesão é um princípio físico que pode ser definido como a força de atração entre corpos de espécies químicas diferentes. Na odontologia, o teste de *push-out* tem sido utilizado como um dos principais recursos no intuito de quantificar a força de adesão entre diferentes materiais e estruturas dentárias, sendo inicialmente aplicado para mensurar a adesão de pinos no interior dos canais radiculares (Patierno *et al.*, 1996) e, mais recentemente, aplicado para avaliar a força de adesão de materiais obturadores à dentina radicular (Dias *et al.*, 2014; Grazielle Magro *et al.*, 2014). Neste teste, discos ou fatias radiculares, com uma espessura de 1 mm, são confeccionados perpendicularmente ao longo eixo do material de preenchimento (Goracci *et al.*, 2004) e a força de adesão é determinada através da mensuração da força compressiva necessária para deslocar o segmento do pino ou material obturador, utilizando um dispositivo de menor

diâmetro em contato com este material. A partir disso, é feito um cálculo entre a carga necessária para o deslocamento do material e a área interfacial entre o material e a parede do canal, quantificando a força de adesão (Chandra e Ghonem, 2001).

De acordo com a literatura, o teste de *push-out* é compatível com a situação clínica (Sousa-Neto *et al.*, 2005; Huffman *et al.*, 2009); permite uma padronização acurada das amostras (Sousa-Neto *et al.*, 2005); produz forças mais efetivas de deslocamento do material (Drummond *et al.*, 1996); e produz menor stress na interface de adesão durante a confecção dos discos ou fatias radiculares, quando comparado aos testes de tensão e cisalhamento convencionais (Ungor *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2008). Por essas razões, o teste de *push-out* foi utilizado no presente estudo para avaliar a influência dos cinco protocolos de descontaminação final sobre a força de adesão do material obturador à dentina radicular, além de analisar a incidência e o padrão de falha do material obturador, após a realização deste teste.

No presente estudo, os canais radiculares foram obturados com cones de guta-percha convencionais e o cimento endodôntico AH Plus após a realização dos

protocolos de descontaminação final, estando em acórdância com a metodologia proposta por (Prado *et al.* (2013); Dias *et al.* (2014); Grazielle Magro *et al.* (2014); Topcuoglu *et al.* (2014)). Isso porque a utilização do cimento endodôntico isoladamente para obturação não é sugerida clinicamente, uma vez que este material pode dissolver com o passar do tempo e produzir microinfiltrações (Jainaen *et al.*, 2007; Vilanova *et al.*, 2012), criando um ambiente propício para a recontaminação por parte dos microorganismos. Dessa forma, é preferível a associação do cimento endodôntico com cones de guta-percha, contribuindo para um adequamento selamento do sistema de canais radiculares. O AH Plus, por sua vez, foi o cimento endodôntico de escolha para ser utilizado na obturação dos canais radiculares no presente estudo. Isso se deve ao fato de ser um cimento resinoso de fácil manipulação, apresentar ausência de stress de polimerização, adequado escoamento e, principalmente, elevada força de adesão à estrutura dentinária (Souza *et al.*, 2009; Carneiro *et al.*, 2012).

De acordo com a literatura, a clorexidina, que se apresenta na forma pura e na composição do QMix, não interfere negativamente na capacidade de adesão dos

cimentos endodônticos à dentina (Mohammadi e Abbott, 2009), além de inibir a ação de metaloproteinases (Carrilho, Geraldeli, *et al.*, 2007; Breschi *et al.*, 2010) e cisteínas catepsinas (Scaffa *et al.*, 2012), proteínas diretamente envolvidas no processo de deterioração do colágeno e que prejudicam a adesão à estrutura dentinária. O extrato de semente de uva, por sua vez, apresenta proantocianidinas em sua composição, que também possui efeito inibitório sobre o grupo de enzimas acima citado (Epasinghe *et al.*, 2013) e apresenta capacidade de mediar ligações cruzadas em tecidos à base de colágeno, tais como a dentina, melhorando a adesão nestas superfícies (Bedran-Russo *et al.*, 2014). E, por fim, Sousa-Neto *et al.* (2005), afirmam que a irradiação com laser de baixa intensidade (terapia fotodinâmica) propicia um aumento da resistência de união do cimento endodôntico AH Plus à dentina radicular. No entanto, de acordo com os resultados do presente estudo, os protocolos de descontaminação final demonstraram valores de força de adesão similares após a realização do teste de *push out*, sem diferenças significativas entre os grupos testados e o grupo controle (água destilada), sugerindo que a clorexidina líquida 2%, o QMix, o extrato de semente de uva 6,5% e a terapia

fotodinâmica, com e sem fibra óptica intracanal, não interferem na força de adesão do cimento AH plus as paredes dentinárias dos canais radiculares, após o período de 20 dias de armazenamento. Um período maior de armazenamento destas amostras talvez fosse necessário para que se pudessem observar diferenças significativas entre os grupos, uma vez que a clorexidina e o extrato de semente de uva tendem a melhorar a força de adesão à estrutura dentinária à longo prazo (Cecchin *et al.*, 2014; Cecchin, Farina, *et al.*, 2015).

Ao observar e classificar os padrões de falha do material obturador, após a realização do teste de *push out*, pode ser observada uma maior incidência de falha coesiva nas amostras do presente estudo. Estes resultados estão em acordância com os achados de Prado *et al.* (2013), e Dias *et al.* (2014), que verificaram a presença da falha coesiva como a mais frequente quando utilizados o cimento endodôntico AH plus e gutta-percha como material obturador. Por outro, lado Grazielle Magro *et al.* (2014) relatam o padrão de falha misto como predominante quando utilizada a combinação de AH plus e gutta-percha para obturação do canal radicular.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que o uso da clorexidina líquida 2%, QMix e solução de extrato de semente de uva 6,5% são protocolos de descontaminação final efetivos no combate ao *Enterococcus faecalis*, demonstrando-se superiores a terapia fotodinâmica. Estes protocolos de descontaminação final não influenciam nos valores de força de adesão do cimento endodôntico AH plus as paredes dentinárias do canal radicular, sendo o padrão de falha coesiva o mais frequente apresentado pelo material obturador dos canais.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, T. R. et al. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. **J Dent Res**, v. 93, n. 4, p. 417-22, Apr 2014.
- AKISUE, E. et al. Effect of the combination of sodium hypochlorite and chlorhexidine on dentinal permeability and scanning electron microscopy precipitate observation. **J Endod**, v. 36, n. 5, p. 847-50, May 2010.
- AL-HABIB, A. et al. Bactericidal effect of grape seed extract on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **J Toxicol Sci**, v. 35, n. 3, p. 357-64, Jun 2010.
- ANTUNES, H. S. et al. Total and Specific Bacterial Levels in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-treatment Apical Periodontitis. **J Endod**, v. 41, n. 7, p. 1037-42, Jul 2015.
- ARIAS-MOLIZ, M. T. et al. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. **J Endod**, v. 35, n. 5, p. 711-4, May 2009.
- ARSLAN, H. et al. Evaluation of orange-brown precipitate formed in root canals after irrigation with chlorhexidine and QMix and spectroscopic analysis of precipitates produced by a mixture of chlorhexidine/NaOCl and QMix/NaOCl. v. 48, n. 12, p. 1199-203, Dec 2015.
- BASRANI, B. R. et al. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. **J Endod**, v. 33, n. 8, p. 966-9, Aug 2007.
- BEDRAN-RUSSO, A. K. et al. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. **Dent Mater**, v. 30, n. 1, p. 62-76, Jan 2014.
- BEUS, C. et al. Comparison of the effect of two endodontic irrigation protocols on the elimination of bacteria from root canal system: a prospective, randomized clinical trial. **J Endod**, v. 38, n. 11, p. 1479-83, Nov 2012.

BÖTTCHER, D. E. et al. Evaluation of the Effect of Enterococcus faecalis Biofilm on the 2% Chlorhexidine Substantivity: An In Vitro Study. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 8, p. 1364-1370, 8// 2015.

BRESCHI, L. et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. **Dent Mater**, v. 26, n. 4, p. 320-5, Apr 2010.

BROWN, J. C. et al. Antibacterial effects of grape extracts on Helicobacter pylori. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 3, p. 848-52, Feb 2009.

CARNEIRO, S. M. et al. Push-out strength of root fillings with or without thermomechanical compaction. **Int Endod J**, v. 45, n. 9, p. 821-8, Sep 2012.

CARRILHO, M. R. et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. **J Dent Res**, v. 86, n. 1, p. 90-4, Jan 2007.

CARRILHO, M. R. et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. **Dent Mater**, v. 26, n. 8, p. 779-85, Aug 2010.

CARRILHO, M. R. et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. **J Dent Res**, v. 86, n. 6, p. 529-33, Jun 2007.

CASTAGNA, F. et al. Effect of passive ultrasonic instrumentation as a final irrigation protocol on debris and smear layer removal--a SEM analysis. **Microsc Res Tech**, v. 76, n. 5, p. 496-502, May 2013.

CECCHIN, D. et al. Influence of chlorhexidine application time on the bond strength between fiber posts and dentin. **J Endod**, v. 40, n. 12, p. 2045-8, Dec 2014.

CECCHIN, D. et al. Evaluation of antimicrobial effectiveness and dentine mechanical properties after use of chemical and natural auxiliary irrigants. **Journal of Dentistry**, v. 43, n. 6, p. 695-702, 6// 2015.

CECCHIN, D. et al. Bond Strength between Fiber Posts and Root Dentin Treated with Natural Cross-linkers. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 10, p. 1667-1671, 10// 2015.

CHANDRA, N.; GHONEM, H. Interfacial mechanics of push-out tests: theory and experiments. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 32, n. 3–4, p. 575-584, 3// 2001.

CHAVEZ DE PAZ, L. E. Development of a multispecies biofilm community by four root canal bacteria. **J Endod**, v. 38, n. 3, p. 318-23, Mar 2012.

CHAVEZ DE PAZ, L. E.; BERGENHOLTZ, G.; SVENSATER, G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. **J Endod**, v. 36, n. 1, p. 70-7, Jan 2010.

CHENG, X. et al. Evaluation of the bactericidal effect of Nd:YAG, Er:YAG, Er,Cr:YSGG laser radiation, and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in experimentally infected root canals. **Lasers Surg Med**, v. 44, n. 10, p. 824-31, Dec 2012.

CHIVATXARANUKUL, P.; DASHPER, S. G.; MESSER, H. H. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. **Int Endod J**, v. 41, n. 10, p. 873-82, Oct 2008.

COGULU, D. et al. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 106, n. 3, p. 443-9, Sep 2008.

CONVISSAR, R. A. **Princípios e práticas do laser na odontologia**. 1. Rio de Janeiro: 2011. 344 ISBN 9788535244311.

CUEVA, C. et al. Antibacterial activity of wine phenolic compounds and oenological extracts against potential respiratory pathogens. **Lett Appl Microbiol**, v. 54, n. 6, p. 557-63, Jun 2012.

D'AMATO-PALUMBO, S. et al. Retrospective study of microorganisms associated with vascular access infections in hemodialysis patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 115, n. 1, p. 56-61, Jan 2013.

DAI, L. et al. The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. **J Endod**, v. 37, n. 1, p. 80-4, Jan 2011.

DAI, T.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections--state of the art. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 6, n. 3-4, p. 170-88, Sep-Dec 2009.

DAMETTO, F. R. et al. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 99, n. 6, p. 768-72, Jun 2005.

DE-DEUS, G. et al. Dentine demineralization when subjected to EDTA with or without various wetting agents: a co-site digital optical microscopy study. **Int Endod J**, v. 41, n. 4, p. 279-87, Apr 2008.

DE ALMEIDA, A. P. et al. Comparative evaluation of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite associated with passive ultrasonic irrigation on antimicrobial activity of a root canal system infected with *Enterococcus faecalis*: an in vitro study. **J Endod**, v. 40, n. 12, p. 1953-7, Dec 2014.

DE OLIVEIRA, R. R. et al. The effect of a single episode of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of experimental periodontitis. Microbiological profile and cytokine pattern in the dog mandible. **Lasers Med Sci**, v. 26, n. 3, p. 359-67, May 2011.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 17, n. 3, p. 245-54, Sep-Dec 2004.

DIAS, K. C. et al. Influence of drying protocol with isopropyl alcohol on the bond strength of resin-based sealers to the root dentin. **J Endod**, v. 40, n. 9, p. 1454-8, Sep 2014.

DRUMMOND, J. L. et al. Testing mode and surface treatment effects on dentin bonding. **J Biomed Mater Res**, v. 32, n. 4, p. 533-41, Dec 1996.

DU, T. et al. Effect of modified nonequilibrium plasma with chlorhexidine digluconate against endodontic biofilms in vitro. **J Endod**, v. 39, n. 11, p. 1438-43, Nov 2013.

ELAKANTI, S. et al. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of QMix 2 in 1, sodium hypochlorite, and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **J Conserv Dent**, v. 18, n. 2, p. 128-31, Mar-Apr 2015.

EPASINGHE, D. J. et al. The inhibitory effect of proanthocyanidin on soluble and collagen-bound proteases. **J Dent**, v. 41, n. 9, p. 832-9, Sep 2013.

ERCAN, E. et al. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. **J Endod**, v. 30, n. 2, p. 84-7, Feb 2004.

EVANS, M. D. et al. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. **J Endod**, v. 29, n. 5, p. 338-9, May 2003.

FERRAZ, C. C. et al. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **J Endod**, v. 27, n. 7, p. 452-5, Jul 2001.

FIGDOR, D.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. **Oral Microbiol Immunol**, v. 18, n. 4, p. 234-9, Aug 2003.

FIMPLE, J. L. et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. **J Endod**, v. 34, n. 6, p. 728-34, Jun 2008.

FONSECA, M. B. et al. Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. **Photomed Laser Surg**, v. 26, n. 3, p. 209-13, Jun 2008.

FOUAD, A. F. et al. Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 99, n. 1, p. 112-8, Jan 2005.

FURIGA, A.; LONVAUD-FUNEL, A.; BADET, C. In vitro study of antioxidant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of a grape seed extract. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1037-1040, 4/15/ 2009.

FURIGA, A.; ROQUES, C.; BADET, C. Preventive effects of an original combination of grape seed polyphenols with amine fluoride on dental biofilm formation and oxidative damage by oral bacteria. **J Appl Microbiol**, v. 116, n. 4, p. 761-71, Apr 2014.

GARCEZ, A. S. et al. The use of optical fiber in endodontic photodynamic therapy. Is it really relevant? **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 1, p. 79-85, Jan 2013.

GARCEZ, A. S. et al. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. **J Endod**, v. 36, n. 9, p. 1463-6, Sep 2010.

GARCEZ, A. S. et al. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. **J Endod**, v. 34, n. 2, p. 138-42, Feb 2008.

GARCEZ, A. S. et al. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. **Lasers Surg Med**, v. 39, n. 1, p. 59-66, Jan 2007.

GEORGE, S.; KISHEN, A.; SONG, K. P. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. **J Endod**, v. 31, n. 12, p. 867-72, Dec 2005.

GHINZELLI, G. C. et al. Influence of ultrasonic activation on photodynamic therapy over root canal system infected with *Enterococcus faecalis* – an in vitro study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, n. 4, p. 472-478, 12// 2014.

GHONMODE, W. N. et al. Comparison of the antibacterial efficiency of neem leaf extracts, grape seed extracts and 3% sodium hypochlorite against *E. faecalis* - An in vitro study. **J Int Oral Health**, v. 5, n. 6, p. 61-6, Dec 2013.

GIARDINO, L. et al. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. **J Endod**, v. 32, n. 11, p. 1091-3, Nov 2006.

GOMES, B. P. et al. Enterococcus faecalis in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, n. 2, p. 247-53, Aug 2006.

GOMES, B. P. et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against Enterococcus faecalis in bovine root dentine in vitro. **Int Endod J**, v. 36, n. 4, p. 267-75, Apr 2003.

GORACCI, C. et al. The adhesion between fiber posts and root canal walls: comparison between microtensile and push-out bond strength measurements. **Eur J Oral Sci**, v. 112, n. 4, p. 353-61, Aug 2004.

GRAZIELE MAGRO, M. et al. Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and several formulations containing chlorhexidine and its effect on the radicular dentin--SEM and push-out bond strength analysis. **Microsc Res Tech**, v. 77, n. 1, p. 17-22, Jan 2014.

GRUNDLING, G. L. et al. Effect of ultrasonics on Enterococcus faecalis biofilm in a bovine tooth model. **J Endod**, v. 37, n. 8, p. 1128-33, Aug 2011.

GUERREIRO-TANOMARU, J. M. et al. Comparative analysis of Enterococcus faecalis biofilm formation on different substrates. **J Endod**, v. 39, n. 3, p. 346-50, Mar 2013.

GURSOY, H. et al. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. **Clin Oral Investig**, v. 17, n. 4, p. 1113-25, May 2013.

GUTMANN, J. L. Clinical, radiographic, and histologic perspectives on success and failure in endodontics. **Dent Clin North Am**, v. 36, n. 2, p. 379-92, Apr 1992.

HUFFMAN, B. P. et al. Dislocation resistance of ProRoot Endo Sealer, a calcium silicate-based root canal sealer, from radicular dentine. **Int Endod J**, v. 42, n. 1, p. 34-46, Jan 2009.

JAINAEN, A.; PALAMARA, J. E.; MESSER, H. H. Push-out bond strengths of the dentine-sealer interface with and without a main cone. **Int Endod J**, v. 40, n. 11, p. 882-90, Nov 2007.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SELVI, T.; SAKARIAH, K. K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Research International**, v. 36, n. 2, p. 117-122, // 2003.

JURIC, I. B. et al. Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy, Nd:YAG laser and QMiX solution against *Enterococcus faecalis* biofilm. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, Jul 29 2015.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FITZGERALD, R. J. THE EFFECTS OF SURGICAL EXPOSURES OF DENTAL PULPS IN GERM-FREE AND CONVENTIONAL LABORATORY RATS. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 20, p. 340-9, Sep 1965.

KALRA, M. et al. The effect of proanthocyanidins on the bond strength and durability of resin sealer to root dentine. **Int Endod J**, v. 46, n. 2, p. 169-78, Feb 2013.

KAO, T. T. et al. Grape seed extract inhibits the growth and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* by interfering with dihydrofolate reductase activity and folate-mediated one-carbon metabolism. **Int J Food Microbiol**, v. 141, n. 1-2, p. 17-27, Jun 30 2010.

KHAYAT, A.; JAHANBIN, A. The influence of smear layer on coronal leakage of Roth 801 and AH26 root canal sealers. **Aust Endod J**, v. 31, n. 2, p. 66-8, Aug 2005.

KOMINE, C.; TSUJIMOTO, Y. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. **J Endod**, v. 39, n. 3, p. 411-4, Mar 2013.

KURUVILLA, J. R.; KAMATH, M. P. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. **J Endod**, v. 24, n. 7, p. 472-6, Jul 1998.

LIM, Z. et al. Light activated disinfection: an alternative endodontic disinfection strategy. **Aust Dent J**, v. 54, n. 2, p. 108-14, Jun 2009.

MA, J. et al. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. **J Endod**, v. 37, n. 10, p. 1380-5, Oct 2011.

MEHRVARZFAR, P. et al. Additive effect of a diode laser on the antibacterial activity of 2.5% NaOCl, 2% CHX and MTAD against *Enterococcus faecalis* contaminating root canals: an in vitro study. **J Oral Sci**, v. 53, n. 3, p. 355-60, Sep 2011.

MEIRE, M. A. et al. Evaluation of Nd:YAG and Er:YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms. **Int Endod J**, v. 45, n. 5, p. 482-91, May 2012.

MENEZES, M. M. et al. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. **Int Endod J**, v. 37, n. 5, p. 311-9, May 2004.

MOHAMMADI, Z.; ABBOTT, P. V. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. **Int Endod J**, v. 42, n. 4, p. 288-302, Apr 2009.

MUNOZ-GONZALEZ, I. et al. Red wine and oenological extracts display antimicrobial effects in an oral bacteria biofilm model. **J Agric Food Chem**, v. 62, n. 20, p. 4731-7, May 21 2014.

MURAD, C. F. et al. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. **J Endod**, v. 40, n. 7, p. 899-906, Jul 2014.

NAGAYOSHI, M. et al. Bactericidal Effects of Diode Laser Irradiation on *Enterococcus faecalis* Using Periapical Lesion Defect Model. **ISRN Dent**, v. 2011, p. 870364, 2011.

NERURKAR, M. J.; ZENTNER, G. M.; RYTTING, J. H. Effect of chloride on the release of chlorhexidine salts from methyl methacrylate:

2-hydroxyethyl methacrylate copolymer reservoir devices. **Journal of Controlled Release**, v. 33, n. 3, p. 357-363, 3// 1995.

NG, R. et al. Endodontic photodynamic therapy ex vivo. **J Endod**, v. 37, n. 2, p. 217-22, Feb 2011.

NIAZI, S. A. et al. The effectiveness of enzymic irrigation in removing a nutrient-stressed endodontic multispecies biofilm. **Int Endod J**, v. 47, n. 8, p. 756-68, Aug 2014.

NUNES, M. R. et al. Effectiveness of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis*, with and without the use of an intracanal optical fiber: an in vitro study. **Photomed Laser Surg**, v. 29, n. 12, p. 803-8, Dec 2011.

OK, E. et al. Effect of photoactivated disinfection on bond strength of root canal filling. **J Endod**, v. 39, n. 11, p. 1428-30, Nov 2013.

OKINO, L. A. et al. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. **Int Endod J**, v. 37, n. 1, p. 38-41, Jan 2004.

ORDINOLA-ZAPATA, R. et al. Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral-infected dentin biofilm model. **J Endod**, v. 39, n. 1, p. 115-8, Jan 2013.

ORSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. **Endod Dent Traumatol**, v. 6, n. 4, p. 142-9, Aug 1990.

PAIVA, S. S. et al. Supplementing the antimicrobial effects of chemomechanical debridement with either passive ultrasonic irrigation or a final rinse with chlorhexidine: a clinical study. **J Endod**, v. 38, n. 9, p. 1202-6, Sep 2012.

PATIERNO, J. M. et al. Push-out strength and SEM evaluation of resin composite bonded to internal cervical dentin. **Endod Dent Traumatol**, v. 12, n. 5, p. 227-36, Oct 1996.

PETERS, L. B.; WESSELINK, P. R.; MOORER, W. R. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. **Int Endod J**, v. 28, n. 2, p. 95-9, Mar 1995.

PETERS, O. A. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. **J Endod**, v. 30, n. 8, p. 559-67, Aug 2004.

PINHEIRO, E. T. et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Int Endod J**, v. 36, n. 1, p. 1-11, Jan 2003.

PRADO, M. et al. Scanning electron microscopic investigation of the effectiveness of phosphoric acid in smear layer removal when compared with EDTA and citric acid. **J Endod**, v. 37, n. 2, p. 255-8, Feb 2011.

PRADO, M.; SIMAO, R. A.; GOMES, B. P. Effect of different irrigation protocols on resin sealer bond strength to dentin. **J Endod**, v. 39, n. 5, p. 689-92, May 2013.

RAN, S. et al. Assessment of dentinal tubule invasion capacity of *Enterococcus faecalis* under stress conditions ex vivo. **Int Endod J**, v. 48, n. 4, p. 362-72, Apr 2015.

RIBEIRO, D. A. et al. Genotoxicity of antimicrobial endodontic compounds by single cell gel (comet) assay in Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 99, n. 5, p. 637-40, May 2005.

RIOS, A. et al. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. **J Endod**, v. 37, n. 6, p. 856-9, Jun 2011.

SAGHIRI, M. A. et al. A study of the relation between erosion and microhardness of root canal dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 108, n. 6, p. e29-34, Dec 2009.

SASSONE, L. M. et al. Microbiological evaluation of primary endodontic infections in teeth with and without sinus tract. **Int Endod J**, v. 41, n. 6, p. 508-15, Jun 2008.

SCAFFA, P. M. et al. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. **J Dent Res**, v. 91, n. 4, p. 420-5, Apr 2012.

SCHILDER, H. Cleaning and shaping the root canal. **Dent Clin North Am**, v. 18, n. 2, p. 269-96, Apr 1974.

SEDGLEY, C. M.; LENNAN, S. L.; APPELBE, O. K. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. **Int Endod J**, v. 38, n. 10, p. 735-42, Oct 2005.

SILVA, L. A. et al. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. **J Endod**, v. 38, n. 3, p. 360-6, Mar 2012.

SIQUEIRA, J. F., JR. et al. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. **J Endod**, v. 24, n. 6, p. 414-6, Jun 1998.

SJOGREN, U. et al. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. **J Endod**, v. 16, n. 10, p. 498-504, Oct 1990.

SOARES, C. J. et al. Finite element analysis and bond strength of a glass post to intraradicular dentin: comparison between microtensile and push-out tests. **Dent Mater**, v. 24, n. 10, p. 1405-11, Oct 2008.

SOUKOS, N. S. et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. **J Endod**, v. 32, n. 10, p. 979-84, Oct 2006.

SOUSA-NETO, M. D. et al. Ex vivo study of the adhesion of an epoxy-based sealer to human dentine submitted to irradiation with Er : YAG and Nd : YAG lasers. **Int Endod J**, v. 38, n. 12, p. 866-70, Dec 2005.

SOUZA, L. C. et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. **J Endod**, v. 36, n. 2, p. 292-6, Feb 2010.

SOUZA, M. et al. Evaluation of chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. **J Endod**, v. 38, n. 9, p. 1249-52, Sep 2012.

SOUZA, S. F. et al. Polymerization stress, flow and dentine bond strength of two resin-based root canal sealers. **Int Endod J**, v. 42, n. 10, p. 867-73, Oct 2009.

STOJICIC, S. et al. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. **Int Endod J**, v. 45, n. 4, p. 363-71, Apr 2012.

SUNDQVIST, G. **Bacteriological Studies of Necrotic Dental Pulps**. Department of Oral Microbiology, University of Umeå, 1976. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=JOtpAAAAMAAJ> >.

TENDOLKAR, P. M.; BAGHDAYAN, A. S.; SHANKAR, N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 12, p. 2622-36, Dec 2003.

TENNERT, C. et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. **J Endod**, v. 40, n. 5, p. 670-7, May 2014.

THIMOTHE, J. et al. Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis interspecific hybrids*) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 25, p. 10200-7, Dec 12 2007.

TOPCUOGLU, H. S. et al. The effect of different final irrigant activation techniques on the bond strength of an epoxy resin-based endodontic sealer: a preliminary study. **J Endod**, v. 40, n. 6, p. 862-6, Jun 2014.

TORABINEJAD, M. et al. A new solution for the removal of the smear layer. **J Endod**, v. 29, n. 3, p. 170-5, Mar 2003.

UNGOR, M.; ONAY, E. O.; ORUCOGLU, H. Push-out bond strengths: the Epiphany-Resilon endodontic obturation system compared with different pairings of Epiphany, Resilon, AH Plus and gutta-percha. **Int Endod J**, v. 39, n. 8, p. 643-7, Aug 2006.

VAUDT, J. et al. Ex vivo study on root canal instrumentation of two rotary nickel-titanium systems in comparison to stainless steel hand instruments. **Int Endod J**, v. 42, n. 1, p. 22-33, Jan 2009.

VAZIRI, S. et al. Comparison of the bactericidal efficacy of photodynamic therapy, 2.5% sodium hypochlorite, and 2% chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in root canals; an in vitro study. **Dent Res J (Isfahan)**, v. 9, n. 5, p. 613-8, Sep 2012.

VENGERFELDT, V. et al. Highly diverse microbiota in dental root canals in cases of apical periodontitis (data of illumina sequencing). **J Endod**, v. 40, n. 11, p. 1778-83, Nov 2014.

VIDAL, C. M. et al. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. **Acta Biomater**, v. 10, n. 7, p. 3288-94, Jul 2014.

VILANOVA, W. V. et al. Effect of intracanal irrigants on the bond strength of epoxy resin-based and methacrylate resin-based sealers to root canal walls. **Int Endod J**, v. 45, n. 1, p. 42-8, Jan 2012.

WANG, Z.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. **J Endod**, v. 38, n. 10, p. 1376-9, Oct 2012.

WEBER, C. D. et al. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. **J Endod**, v. 29, n. 9, p. 562-4, Sep 2003.

XU, Y. et al. Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. **J Endod**, v. 35, n. 11, p. 1567-72, Nov 2009.

YILDIRIM, C. et al. Antimicrobial efficiency of photodynamic therapy with different irradiation durations. **Eur J Dent**, v. 7, n. 4, p. 469-73, Oct 2013.

ZAND, V. et al. Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy and sodium hypochlorite on monoculture biofilms of *Enterococcus faecalis* at different stages of development. **Photomed Laser Surg**, v. 32, n. 5, p. 245-51, May 2014.

ZEHNDER, M. Root canal irrigants. **J Endod**, v. 32, n. 5, p. 389-98, May 2006.

ZHANG, R. et al. Antibacterial and residual antimicrobial activities against *Enterococcus faecalis* biofilm: A comparison between EDTA, chlorhexidine, cetrimide, MTAD and QMix. **Sci Rep**, v. 5, p. 12944, 2015.

ZHU, X. et al. Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. **J Endod**, v. 36, n. 12, p. 1950-5, Dec 2010.