

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Huriel Scartazzini Palhano

**Avaliação da ação antimicrobiana de medicações
intracanaais à base de produtos fitoterápicos
associadas ou não a clorexidina e sua influência
na alteração de cor da estrutura dentinária**

Passo Fundo

2017

Huriel Scartazzini Palhano

**Avaliação da ação antimicrobiana de medicações
intracanaís à base de produtos fitoterápicos
associadas a um veículo biologicamente ativo e
sua influência na alteração de cor da estrutura
dentinária**

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

2017

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

Agradeço primeiramente a Deus pela força para superar as adversidades, aos meus pais por todo o amor e apoio durante esse período, aos familiares e amigos que de algum modo contribuíram para a conclusão de mais essa etapa.

Agradeço a Universidade de Passo Fundo e aos órgãos financiadores que auxiliaram com equipamentos, materiais e financeiramente para o término desse trabalho.

Ao meu orientador Prof^o Dr. Matheus Albino Souza, por todo o auxílio prestado para a realização dessa dissertação, também pela paciência, pela amizade e por me presentear com a Carol como afilhada.

E um agradecimento, muito especial para minha noiva, companheira, parceira, amiga, por atravessar esses dois anos de mestrado ao meu lado, me auxiliando, ajudando e aguentando os melhores e piores dias. Sempre serei grato por todos os momentos que passamos juntos.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	7
SUMÁRIO	8
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	19
2.2 Digluconato de clorexidina	28
2.3 Hidróxido de cálcio.....	39
2.4 Extrato de semente de uva (GSE)	50
2.5 Extrato de gengibre (GE)	56
2.6 Alteração de cor das estruturas dentárias	61
3. PROPOSIÇÃO	66
4. MATERIAIS E MÉTODOS	68
4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana	68
Obtenção e preparo das amostras	68
Controle de esterilização.....	70
Preparo do inóculo	71
Contaminação dos canais radiculares.....	72
Classificação dos grupos de tratamento	73
Realização das coletas e análise microbiológica.....	76

4.2 Avaliação da alteração de cor	78
Obtenção e preparo das amostras.....	78
Análise estatística	81
5. RESULTADOS.....	83
6. DISCUSSÃO	85
7. CONCLUSÕES	101
8. REFERÊNCIAS	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média (desvio padrão) do percentual de redução de *Enterococcus faecalis* (%).....80

Tabela 2: Mediana (mínimo-máximo) dos scores de alteração de cor para os dois períodos de observação e os grupos testados.....80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Padronização das raízes. A – remanescente radicular, B – Odontometria, C – Sistema Rotatório Protaper Universal.	69
Figura 2 – Disposição das amostras. A e B – fixação das amostras impermeabilizadas em eppendorf, C – distribuição em caixa de polipropileno.....	70
Figura 3 – Contaminação dos canais radiculares e controle de contaminação. A – contaminação dos canais radiculares, B – cone de papel em contato com as paredes do canal, C – cone de papel em 1ml de solução salina estéril, D – homogeinização em agitador, E – técnica de gotas, F – análise da morfologia.	73
Figura 4 – Inserção e preparo das medicações intracanal. A – inserção de solução salina estéril, B – pasta de GE + CHX, C – inserção da medicação com lântulo, D – vedamento com cimento provisório.	75
Figura 5 – Realização das coletas e análise microbiológica. A – Ponta de papel absorvente no interior do canal radicular, B – Homogeinização em agitador tipo vortex, C – técnica de gotas, D – placas com PCA após incubação.	77
Figura 6 – Esquema das coletas microbiológicas.	78
Figura 7 – Bloco produzido a partir das coroas bovinas.	79
Figura 8 – Bloco de dentina recoberto por medicação(GSE+CHX).	80
Figura 9 – Aparelho Vita Easyshade Compact.	81

LISTA DE ABREVIATURAS

CHX	Clorexidina
NaOCl	Hipoclorito de sódio
CaOH ₂	Hidróxido de cálcio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ribonucleic Acid
DNA	Deoxiribonucleic Acid
BHI	Brain Heart Infusion
UFC	Unidade Formadora de Colônia
IRM	Material Restaurador Intermediário
GSE	Grape Seed Extract
GE	Ginger Extract

Avaliação da ação antimicrobiana de medicações intracanais à base de produtos fitoterápicos associadas a um veículo biologicamente ativo e sua influência na alteração de cor da estrutura dentinária.

Huriel Scartazzini Palhano*

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana de medicações intracanais à base de produtos fitoterápicos associadas a um veículo biologicamente ativo e sua influência na alteração de cor na estrutura dentinária. Para avaliação da ação antimicrobiana, oitenta dentes unirradiculares humanos extraídos foram selecionados. Os canais radiculares foram inoculados por 15 dias com 100 µl de cultura de *Enterococcus faecalis* e, após este período, foram divididos aleatoriamente em 8 grupos (n=10) conforme as diferentes medicações intracanal testadas: água destilada (DW) (controle negativo); clorexidina gel 2% (CHX) (controle positivo); hidróxido de cálcio, extrato de semente de uva (GSE) e extrato de gengibre (GE), associados a água destilada ou clorexidina gel 2%. As medicações intracanais permaneceram no interior dos canais radiculares por 14 dias. A avaliação da descontaminação dos tratamentos propostos foi realizada por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs), antes e 14 dias após os tratamentos propostos. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA, seguido por Post-Hoc de Tukey ($\alpha=0.05$). Para avaliação da alteração de cor, foram confeccionados, a partir da coroa de dentes bovinos, 80 blocos de dentina que permaneceram em contato com as medicações acima testadas durante o período de 14 dias. A mensuração da cor foi realizada antes e após a imersão das amostras nas medicações por meio de espectrofotometria digital. Os escores obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando o teste não paramétrico de Wilcoxon ($\alpha=0.05$). A maior capacidade de redução bacteriana foi observada nos grupos 4 (GSE+DW), 6 (Ca(OH)₂+CHX), 7 (GSE+CHX) e 8 (GE+CHX), sem diferença estatisticamente significativa entre

*Aluno do Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade de Passo Fundo

estes grupos ($p < 0.05$). Além disso, foi possível observar que, após 14 dias de tratamento, as amostras dos grupos 4 (GSE+DW) e 7 (GSE+CHX) apresentaram as maiores medianas de alteração de cor da estrutura dentinária, sendo estas medianas estatisticamente superiores às de todos os demais grupos testados ($p < 0.05$). A adição de clorexidina gel 2% aumentou a ação antimicrobiana das medicações à base de produtos fitoterápicos; no entanto, estas medicações induziram alteração de cor significativa na estrutura dentinária.

Palavras-chave: alteração de cor, clorexidina, *Enterococcus faecalis*, extrato de gengibre, extrato de semente de uva, hidróxido de cálcio.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the antimicrobial activity of intracanal dressings composed by natural products associated to a biological active vehicle and its influence in color change of dentinal structure. To evaluate antimicrobial activity, eighty single rooted extracted human teeth were selected. The root canals were inoculated for 14 days with 100 µl of *Enterococcus faecalis* and, after this period, were randomly divided in 8 groups (n=10) according to different intracanal dressings: distilled water (DW) (negative control); 2% chlorhexidine gel (CHX) (positive control); calcium hydroxide; grape seed extract (GSE); and ginger extract (GE); the last three associated to distilled water or 2% chlorhexidine gel. The intracanal dressings remained into the root canals for 14 days. The decontamination evaluation of proposed treatments was performed by counting of colony forming units (CFUs), before and after 14 days of proposed treatments. Statistical analysis was performed by ANOVA, followed by Tukey's post hoc procedure ($\alpha=0.05$). For evaluation of change color, eighty dentin blocks were obtained from crowns of bovine teeth, remaining in contact with intracanal dressings described above during 14 days. The color measurement was performed before and after immersion of samples in the proposed treatments by digital spectrophotometry. Scores were obtained and submitted to statistical analysis by non-parametric Wilcoxon test ($\alpha=0.05$). The highest ability to promote bacterial reduction was observed in groups 4 (GSE+DW), 6 (Ca(OH)₂+CHX), 7 (GSE+CHX) and 8 (GE+CHX), with no statistical significant difference between them ($p<0.05$). Furthermore, it was possible to observe that after 14 days of treatment, the samples of groups 4 (GSE+DW) and 7 (GSE+CHX) have showed the highest medians of change color of dentinal structure, being these medians statistically higher to all other tested groups ($p<0.05$). The addition of 2% chlorhexidine gel improved the antimicrobial activity of intracanal dressings composed to natural products; however, these protocols induced significant change color in the dentinal structure.

Key-words: calcium hydroxide, change color, chlorhexidine, *Enterococcus faecalis*, ginger extract, grape seed extract.

Abstract: Antimicrobial activity of intracanal dressings composed by natural products associated to chlorhexidine and its influence on colour change of dentinal structure

1. INTRODUÇÃO

A maioria das bactérias encontradas na microbiota endodôntica pode ser removida por meio da ação mecânica dos instrumentos endodônticos e ação química das substâncias químicas auxiliares. No entanto, devido a complexidade anatômica do sistema de canais radiculares, bactérias e resíduos orgânicos podem não ser alcançados e podem permanecer neste ambiente, havendo a necessidade de protocolos de descontaminação auxiliares, como, por exemplo, o uso de medicações intracanaís (SJÖGREN *et al.*, 1990).

A medicação intracanal mais utilizada na endodontia é a pasta de hidróxido de cálcio, sendo aceita em razão de apresentar relativa ação antimicrobiana, neutralizar toxinas bacterianas, ser biocompatível com os tecidos periapicais e estimular o processo de mineralização (LEONARDO *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 2002; LEONARDO *et al.*, 2006). Além disso, funciona como barreira física, inibindo o fluxo de nutrientes e a recolonização bacteriana (SIQUEIRA-JÚNIOR & LOPES, 1999). No entanto, microorganismos da microbiota endodôntica como o *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), apresentam-se resistentes a este tipo de medicação (EVANS *et al.*, 2002), podendo proliferar e dar início a um novo processo de contaminação do sistema de canais radiculares. Além disso, medicações intracanaís à base de hidróxido de cálcio promovem a formação de *smear layer* química, obliterando túbulos

dentinários e impedindo a penetração do material obturador nas ramificações do canal principal (GOLDBERG *et al.*, 2002), podendo promover o enfraquecimento da estrutura dentinária, aumentando o risco de fratura radicular (ANDREASEN *et al.*, 2002).

Diante das limitações de medicações à base de hidróxido de cálcio, substâncias com potencial antimicrobiano tem sido pesquisadas para serem utilizadas na terapia endodôntica. A adição de substâncias químicas como veículo biologicamente ativo às medicações intracanaís usualmente preconizadas, representa uma alternativa ao processo de descontaminação do sistema de canais radiculares (GOMES *et al.*, 2006). Entre essas substâncias está o digluconato de clorexidina, que apresenta um amplo espectro antimicrobiano (GOMES *et al.*, 2001; DAMETTO *et al.*, 2005) e substantividade, permitindo, desse modo, um tempo de atuação prolongado no interior do canal radicular (BÖTTCHER *et al.*, 2015). Além disso, a possibilidade de utilizar produtos fitoterápicos na terapia endodôntica vem sendo analisada, a partir do momento em que a literatura tem demonstrado potencial antimicrobiano acerca dessas substâncias como, por exemplo, o extrato de semente de uva (CECCHIN *et al.*, 2015) e o extrato de gengibre (MAEKAVA *et al.*, 2013).

Além da necessidade de uma adequada descontaminação do sistema de canais radiculares, a manutenção da estética dentária durante e após a realização do tratamento endodôntico também é um fator levado em consideração, sendo de grande importância para os pacientes, principalmente no que diz respeito à coloração da estrutura dentária (Qualtrough & Burke, 1994).

Diante do exposto, torna-se justificável a realização da presente dissertação no intuito de avaliar a ação antimicrobiana de medicações intracanáis à base de produtos fitoterápicos associadas a um veículo biologicamente ativo e sua influência na alteração de cor na estrutura dentinária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Desde que a natureza microbiana tem sido reconhecida como a responsável pela etiologia de diversas patologias orais inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas no intuito de combater os microrganismos envolvidos nessas enfermidades. Entre essas patologias se encontra a periodontite apical, que representa uma resposta imune local à progressão de microrganismos da polpa dentária para o forâmen apical, resultando em um processo de reabsorção óssea e levando ao comprometimento dos tecidos de suporte dos elementos dentários (Martón & Kiss, 2000; Liapatas *et al.*, 2003).

Neste cenário, bactérias e seus subprodutos desempenham um papel fundamental na indução e, principalmente, na progressão das alterações patológicas que acometem a polpa e os tecidos periapicais (Takehashi *et al.*, 1965; Sundqvist, 1976), havendo a necessidade da utilização de recursos auxiliares de descontaminação que poderão contribuir de maneira expressiva para a limpeza dos canais radiculares.

2.1 *Enterococcus faecalis*

Fouad *et al.*, em 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. Quarenta casos de retratamento foram selecionados, 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, pois 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, seis (19%) eram de não diabéticos e dois (33%) de pacientes diabéticos. Filogeneticamente, todas as sequências de amostras positivas corresponderam a *E. faecalis*, sendo a única espécie de *enterococcus* detectada, com uma prevalência geral de 22%.

Sedgley *et al.*, em 2005, testaram três hipóteses: (i) *E. faecalis* pode sobreviver por longos períodos em dentes obturados sem nutrientes adicionais, (ii) a densidade celular inicial influencia a sobrevivência de *E. faecalis* em canais radiculares instrumentados e (iii) capacidade de produção de nutrientes influencia na sobrevivência de *E. faecalis* em canais radiculares. Cento e cinquenta dentes unirradiculares extraídos foram instrumentados, padronizados e divididos em seis grupos de 25. Dentro de cada grupo 10 canais foram inoculados com o *E. faecalis* OG1-S e os outros 10 com *E. faecalis* OG1-X defeituoso para produção de gelatinase. Cinco canais por grupo foram mantidos como controle não inoculados. Os canais dos grupos 1 e 2 foram inoculados com 10^6 , as bactérias foram incubadas durante 48h a 37°C, em seguida, preenchidas com guta-percha e óxido de zinco-eugenol. Entre os grupos 3 a 6 os canais foram inoculados com 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 respectivamente e deixados sem preenchimento. Todos os dentes foram selados

coronalmente com cimento de ionômero de vidro. Depois de seis (grupos 1, 3 - 6) e de 12 meses (grupo 2) de incubação a 37° C em 100% de umidade, as raízes foram analisadas para a presença de *E. faecalis*, usando cultura microbiológica, reação em cadeia da polimerase e métodos histológicos. Células viáveis de *E. faecalis* foram encontradas em todos os dentes obturados e entre 95 – 100% dos elementos inoculados e não preenchidos. A produção inicial de gelatinase não influenciou na recuperação de células viáveis das estirpes testadas. Produtos de RNAr de *E. faecalis* 16S estavam presentes em todos os dentes inoculados e ausente em todos os controles não inoculadas. E a infecção dos túbulos dentinários foi evidente em microscopia óptica após 48h, 6 e 12 meses de incubação.

Gomes *et al.*, em 2006, pesquisaram a presença de *E. 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 espécies do 16S DNAr. Cultura e PCR detectaram o *E. faecalis* em 23 dos 100 e 79 dos 100 dos dentes, respectivamente. A espécie alvo foi cultivada em dois (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%) nas infecções primárias e 38 (76%) nas infecções secundárias.

Cogulu *et al.*, em 2008, avaliaram a presença de patógenos em amostras de canais radiculares, de dentes decíduos e permanentes,

utilizando o método de PCR e determinar 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.*, em 2008, verificaram a microbiota de infecções endodônticas primárias em dentes com ou sem fístula. As amostras foram coletadas após instrumentação com 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 DNA-DNA. As espécies encontradas com maior prevalência foram: *F. nucleatum sp. vincentii*, *P. gingivalis*, *Veillonella parvula*, *E. faecalis*, *Campylobacter gracilis* e *Neisseria mucosa*. As contagens bacterianas totais foram semelhantes entre os dentes com e sem uma fístula. *E. faecalis*, *Streptococcus anginosus*, *Capnocytophaga sputigena* e *Capnocytophaga gingivalis* tinham contagens significativamente mais elevadas na ausência de fístula. Níveis mais elevados de *P. gingivalis* e *F. nucleatum sp. nucleatum* foram observadas em casos com uma fístula. *Buccalis leptotrichia* e *Porphyromonas endodontalis* foram associados a indivíduos com maior chance de fístula.

Chivatxaranukul *et al.*, em 2008, analisaram capacidade de invasão e a predileção de *E. faecalis* nas paredes dos túbulos dentinários. A capacidade de invasão dos túbulos dentinários foi medida após oito semanas de incubação em dentes humanos *ex vivo*. Extensão e profundidade máxima de invasão tubular foram avaliados histologicamente; a aderência foi avaliada após a fratura vertical, exposição dos túbulos dentinários e contaminação com estirpes resistentes a eritromicina de *E. faecalis* aerobicamente por 2 horas e analisadas com microscopia eletrônica de varredura calculando no número de células por 100 μ . A invasão dos túbulos dentinários mostrou-se moderada após oito semanas, no estudo de adesão havia significativamente mais bactérias aderidas a linha de fratura que nas paredes dos túbulos dentinários. Com relação à 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 que em solução salina tamponada com fosfato.

Zhu *et al.*, em 2010, investigaram a prevalência, o fenótipo e o genótipo de *E. 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 no últimos 2 anos. Para identificação do *E. faecalis* foram utilizados os testes API20 STREP e 16S RNAr, 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 da saliva apresentaram maior resistência a gentamicina e os genes, *ace*, *asa*, *gelE*, *cylA*, e *efaA*, apresentaram correlação em todas as amostras.

Chávez de Paz, em 2012, testou a capacidade de quatro bactérias do canal radicular em estabelecer uma comunidade multiespecies e determinando as características estruturais, fisiológicas e a composição desta comunidade. Foram isolados as seguintes estirpes *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus gordonii*, e *E. faecalis*, e cultivados juntos 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.*, em 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 *E. 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.*, em 2013, analisaram a contribuição do *E. 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 observado 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 era semelhante.

Tennert *et al.*, em 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 morfolologicamente 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. O *E. faecalis* foi mais frequentemente isolado em infecções endodônticas secundárias e a *Moraxella osloensis* foi isolada a partir de uma infecção endodôntica secundário com obturação do canal radicular insuficiente acompanhada de uma leve sensação de dor.

Murad *et al.*, em 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 as seguintes espécies: *E. 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.*, em 2014, realizaram uma pesquisa com pacientes que não foram submetidos ao 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 [PA]) e caracterizado 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. *E. faecalis* foi encontrado apenas em pacientes com PAC secundário.

De acordo com Antunes *et al.*, em 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 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 *E. faecalis* foi encontrados em apenas tres casos dominantes em 2.

Ran *et al.*, em 2015, analisaram a capacidade de invasão de túbulos dentinários de *E. faecalis*. Foram infectados 40 dentes humanos unirradiculares em pH alcalino e condições de estresse nutricional. Os canais foram padronizados e após quatro semanas de contaminação as raízes foram dividida 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 por microscopia laser confocal. A estirpe de *E. faecalis* resultou na formação de biofilme e invasão dos túbulos dentinários sob todas as condições de estresse com exceção dos pH 11 e 12, no entanto, a distância de penetração tubular foi drasticamente reduzida nestas condições de stress em comparação com em caldo tríptico de soja (TBS) 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 em meio de privação de energia.

2.2 Digluconato de clorexidina

Ferraz *et al.*, em 2001, testaram a clorexidina (CHX) gel como substancia química auxiliar e sua ação contra *E. faecalis* em canais radiculares. Microscópio eletrônico de varredura foi utilizado para analisar a capacidade de desinfecção da CHX gel comparado com outros irrigantes comumente utilizados nos tratamentos endodônticos como hipoclorito de sódio (NaClO) e CHX líquida. Os resultados indicaram que o gel de CHX resultou em uma superfície do canal radicular limpa e teve uma capacidade antimicrobiana comparável aos resultados obtidos com as outras soluções testadas. Concluiu-se que a CHX gel tem potencial para uso na endodontia.

Gomes *et al.*, em 2001, avaliaram a eficácia de várias concentrações de NaClO (0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25%) e duas formas de gluconato de clorexidina (gel e líquido) em três concentrações (0,2%, 1% e 2%) na eliminação de *E. faecalis*. Para esse teste foram utilizadas colônias puras de *E. faecalis*, cultivadas em *Brain Heart Infusion* (BHI) com 10% de sangue de carneiro e placas contendo agar para o crescimento bacteriano. A suspensão foi preparada com solução estéril de NaCl a 0,85% e a turbidez determinada por espectrofotômetro na escala *McFarland* 0,5. Em cada poço foram adicionados 1 ml da solução a ser testada e 2 ml da suspensão bacteriana misturados pela ação de ultrassom por 10s. Seis poços foram utilizados para cada período de tempo e concentração irrigante. A cada período de tempo 1 mL de cada poço foi transferido para tubos contendo 2 ml de neutralizador preparado BHI a fim de evitar uma ação residual dos irrigantes. Os tubos foram incubados a 37°C durante sete dias. Considerou-se crescimento positivo

aqueles que apresentaram turbidez média durante o período de incubação. Todos os irrigantes foram eficazes contra o *E. faecalis*, mas em momentos diferentes. A CHX líquida em todas as concentrações testadas (0,2%, 1% e 2%) e NaOCI (5,25%) foram os mais eficazes irrigantes. No entanto, o tempo necessário para CHX líquida 0,2% e CHX gel 2% promover culturas negativas foi de apenas 30s e 1 minuto, respectivamente. Todas as substâncias testadas possuem ação antimicrobiana, porém o tempo necessário para a ação depende do tipo e da concentração da solução irrigadora.

Gomes *et al.*, em 2003, analisaram, *in vitro*, a eficácia do gel de CHX 2% e do hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) como medicação intracanal contra *E. faecalis*. Foram selecionados 180 incisivos centrais bovinos extraídos e infectados durante sete dias com *E. faecalis*. As amostras foram divididas em quatro grupos de acordo com a medicação utilizada: Grupo 1: CHX gel 2%; Grupo 2: Ca(OH)₂ em um veículo viscoso (polietilenoglicol 400); Grupo 3: CHX gel 2% + gel de Ca(OH)₂ e Grupo 4: BHI como grupo controle. As medicações foram colocadas dentro da luz do canal e deixadas pelos períodos experimentais de 1, 2, 7, 15 e 30 dias. Para remover a medicação foi utilizada solução salina estéril e a secagem dos canais foi realizada com cones de papel também estéreis. Raspas de dentina dos canais foram obtidas através da utilização sequencial de brocas de baixa rotação e imediatamente colocadas em tubos contendo caldo BHI, que permaneceram a 37°C e foram observados diariamente, para, de acordo, com a turbidez determinar o crescimento bacteriano. A CHX gel inibiu completamente o crescimento bacteriano após 1, 2, 7 e 15 dias, o Ca(OH)₂ permitiu o crescimento microbiano em todos os momentos experimentais. A combinação de

CHX e Ca(OH)₂ foi eficaz após 1 e 2 dias, demonstrando 100% de ação antibacteriana; no entanto, a sua atividade antibacteriana reduziu entre 7 e 15 dias. A CHX gel 2% sozinha foi mais eficaz contra o *E. faecalis* que o Ca(OH)₂ (P <0,05). No entanto, sua atividade antibacteriana dependeu do tempo em que ela permaneceu no interior do canal radicular.

Kontakiotis *et al.*, em 2008, determinaram a influência de duas medicações intracanal (Ca(OH)₂, CHX gel 2%), utilizadas isoladamente ou combinadas e sua capacidade de vedação após obturação a curto e longo prazo de canais radiculares permanentes. Para este estudo foram selecionados 90 incisivos centrais superiores divididos em quatro grupos experimentais. Todos os canais foram instrumentados com a técnica *step-back* em seguida tratados da seguinte forma: grupo I, curativo intracanal com Ca(OH)₂ por 2 semanas em seguida obturação por compactação lateral da guta-percha e cimento AH26; grupo II, CHX gel 2% por duas semanas e obturação como grupo I; grupo III, medicação com uma nova pasta feita pela mistura de Ca(OH)₂ + CHX gel 2% durante duas semanas e obturação como descrito anteriormente; grupo IV, foram imediatamente obturados. Para medir a capacidade de vedação foi utilizado o modelo de fluido de transporte. As medidas iniciais foram realizadas após 24h para estabilização do cimento e durante o período de 3h e não observou-se nenhuma diferença entre os grupos. A infiltração foi novamente medida após seis meses e novamente não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Com base nesses resultados pode-se sugerir a utilização clínica desses materiais, pois os tratamentos não afetaram a vedação da obturação radicular.

Kandaswamy *et al.*, em 2010, investigaram a atividade antimicrobiana de CHX gel 2%, própolis, suco de *Morinda citrifolia*

(MCJ), 2% de iodo povidona (PVP-I), e Ca(OH)₂ em canais radiculares infectados com *E. faecalis* em duas profundidades diferentes (200μ e 400μ), e três diferentes intervalos de tempo (dias 1, 3 e 5). Cento e oitenta dentes humanos extraídos foram contaminados com *E. faecalis* por 21 dias e divididos em seis amostras: Grupo I (salino) (controle negativo), Grupo II (Própolis), Grupo III (MCJ), Grupo IV (2% PVP-I), Grupo V (CHX gel 2%), Grupo VI (Ca(OH)₂). No final do 1º, 3º, e 5º dias, a população bacteriana vital remanescente foi avaliada. Raspas de dentina foram coletadas nas duas profundidades pré-determinadas e os números totais de unidades formadoras de colônia foram analisados. Não houve diferença entre as profundidades coletadas, já entre as medicações a CHX gel 2% obteve a melhor ação antimicrobiana (100%), seguida de PVP-I (87%), própolis (71%), MCJ (69%), e Ca(OH)₂ (55%).

Delgado *et al.*, em 2010, avaliaram a eficácia do Ca(OH)₂ e CHX gel sobre a eliminação intratubular de *E. faecalis*. Dentes humanos unirradiculares foram contaminados e medicados com Ca(OH)₂, CHX gel 2%, Ca(OH)₂ + CHX gel 2% e uma solução salina (NaCl a 0,9%) como controle negativo. A contagem bacteriana foi realizada através das unidades formadoras de colônias (UFCs) e a viabilidade foi analisada por microscopia de fluorescência após 14 dias de incubação. Foi observado diminuição de UFCs e *E. faecalis* viáveis após a utilização de ambos os tratamentos quando comparados ao grupo controle. A CHX gel teve maior ação antimicrobiana quando comparada ao Ca(OH)₂. E entre a CHX gel 2% com e sem a adição do Ca(OH)₂ não houve diferença significativa. Sendo assim, ambas as medicações possuem ação antimicrobiana sobre o *E. faecalis*.

Rasimick *et al.*, em 2010, investigaram a estabilidade da CHX e da doxiciclina em dentina adjacente ao canal radicular. Para isso, foram utilizados dentes humanos extraídos preparados e irrigados com MTAD ou Endo-CHX, permanecendo estocados a 37°C. Os canais foram ampliados por 0,3mm e as raspas de dentina recolhidas e analisadas por cromatografia líquida de elevado desempenho de fase reversa. Após um dia de estocagem os canais continham 3,4 +/- 1,3mcg doxiciclina ou 43 +/- 20mcg clorexidina. A meia - vida da doxiciclina a da CHX foi calculada em três semanas e 14 semanas, respectivamente. Grupos de monitoramento de decomposição diluído em doxiciclina ou CHX em água tiveram meia - vida de 5,8 semanas e 40 semanas, respectivamente. Nesse caso, a clorexidina se mostrou muito mais estável em relação à doxiciclina.

Baca *et al.*, em 2011, avaliaram a atividade antimicrobiana residual de quatro protocolos finais de irrigação em raízes contaminadas com *E. faecalis*. O biofilme foi cultivado durante quatro semanas em dentes unirradiculares, após as raízes terem sido preparadas mecanicamente, sendo divididas entre os seguintes protocolos: grupo 1: EDTA - NaOCl, (EDTA 17% seguido de NaOCl 5,25%); grupo 2: MA - NaOCl, (ácido maleico 7% seguido de NaOCl 5,25%); grupo 3 CHX + EDTA - CTR, (EDTA 17% seguido por CHX 2% (CHX) + cetrimida 0,2%); e grupo 4 de MA - CHX + CTR, (MA 7%, seguido por CHX 2% + CTR 0,2%). As amostras foram coletadas durante 60 dias para indicar a presença de crescimento bacteriano. Todos os canais onde o último irrigante foi o NaOCl 5,25% mostrou culturas positivas ao final do quinto dia. Grupos com EDTA - CHX + CTR e MA - CHX + CTR e irrigação final com CHX 2% + CTR 0,2% mostrou 72,1% e 66,8% sem

crescimento bacteriano em 60 dias, respectivamente, não ocorrendo diferença estatística significativa entre esses grupos. A combinação de CHX 2% + CTR 0,2% seria uma alternativa eficaz para irrigação final regime dada a sua ação antimicrobiana ao longo do tempo.

Lima *et al.*, em 2012, avaliaram a eficácia do Ca(OH)₂ como base para medicação intracanal quando contaminados com *E. faecalis*. Cento e seis dentes humanos unirradiculares foram inoculados com *E. faecalis* (ATCC 29212) e incubado em um ambiente com restrições de oxigênio por 21 dias. Os dentes foram divididos de acordo com o medicamento e o período testado: G1 - Calen (7 dias); G2 - Calen (14 dias); G3 - Calen / paramonoclorofenol canforado (PMCC) (7 dias); G4 - Calen / PMCC (14 dias); G5 - Calen / 0,4% de CHX (7 dias); G6 - Calen / CHX 0,4% (14 dias); G7 - Calen / CHX 1% (7 dias); G8 - Calen / CHX 1% (14 dias); G9 - preparo químico-mecânico sem medicação e G10 - sem preparo químico-mecânica e medicação. As amostras foram coletadas imediatamente após a remoção da medicação e novamente coletadas sete dias após a remoção da medicação. Todos os medicamentos foram associados a uma redução de *E. faecalis* logo após a remoção da medicação. No entanto, todas as substâncias testadas foram associadas com um aumento nos valores de UFC mL (-1) após sete dias. Calen / PMCC e Calen / CHX apresentaram os menores valores UFC mL (-1) ($p < 0,05$). Nesse caso, todas as combinações de medicação foram capazes de diminuir significativamente o número de UFC de *E. faecalis*.

Souza *et al.*, em 2012, analisaram a substantividade da CHX gel em canais radiculares durante o período de 24 horas, 30 e 90 dias. Para realizarem o estudo foram utilizados 45 dentes humanos anteriores

extraídos, separados em três grupos de acordo com a solução utilizada no preparo do canal radicular, CHX líquida 2%, CHX gel 2%; e água destilada como grupo de controle. O comprimento de trabalho foi determinado através de uma lima #10 K-file introduzida dentro do canal radicular até o momento em que fosse observada sua saída através do forame apical e recuado 1 mm, sendo as raízes preparadas até o instrumento #45. As raízes foram seccionadas resultando em 30 amostras por grupo, sendo essas, divididas aleatoriamente em três subgrupos para avaliação da substantividade nos períodos pré-determinados. A quantidade de CHX (em micrometros) foi medida por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de fase inversa. Foram encontradas quantidades significativas de CHX líquida e gel retidas do substrato de dentina indiferente do tempo de incubação, sendo que a CHX líquida apresentou maior substantividade nas primeiras duas análises, diferentemente da amostra com 90 dias de incubação. Já a CHX gel apresentou nas amostras de 30 e 90 dias valores semelhantes entre si. Nesse caso, as duas substâncias se mostraram eficientes quanto à substantividade por até 90 dias.

De Lucena *et al.*, em 2013, avaliaram a efetividade da CHX comparada a octenidina em raízes de dentes humanos infectados com *E. faecalis*. Foram produzidos 40 segmentos de dentes humanos infectados, amostras de dentina radicular foram colhidas na quarta semana e serviram como base de dados. Na oitava semana as amostras foram divididas aleatoriamente em quatro grupos testes: pasta de Ca(OH)₂ (CH), CHX gel (5,0 %), clorexidina / guta-percha (CHX - GP) e gel de octenidina (OCT-gel) (5,0%), seguido por incubação de 4 semanas. A viabilidade da bactéria foi avaliada por dois corantes fluorescentes

determinando: porcentagem de bactérias viáveis (PBV%) e número de UFCs. Células bacterianas viáveis foram detectadas em todas as amostras de dentina radicular nas semanas 4 e 8. O tratamento com CHX gel, CHX - GP e OCT – gel, resultaram em PBV% significativamente mais baixo com 15,4%, 3,5% e 0% respectivamente. Na semana 12 não foi registrado UFCs, quando analisado o CH a PBV% apresentou-se aumentada mas sem mudanças nas UFCs. Quando comparados ambas as medicações tem potencial efeito sobre o *E. faecalis*, já entre todos os grupos a OCT apresentou um melhor potencial como medicação intracanal.

Arias-Moliz *et al.*, em 2014, analisaram efeito antimicrobiano do NaClO 2,5% sozinho e associado a 9% ácido etidrônico (HEBP) (NaOCl/HEBP), ácido peracético 2% (PAA) e CHX 2%, sobre a viabilidade de *E. faecalis* ligados a dentina. Para isso, foram produzidos blocos de dentina que permaneceram em contato com o *E. faecalis* durante cinco dias para contaminação e por 3min em contato com a solução a ser testada, como controle foi utilizado água destilada. O volume total e a porcentagem de células mortas na dentina infectada foram analisados por microscopia confocal e pela técnica life/dead. Nas soluções de NaOCl, NaOCl/HEBP pode-se observar um percentual significativamente maior de células mortas, seguindo da solução de PAA. Nenhum efeito antimicrobiano significativo de CHX foi observado em comparação com o grupo de controle. O volume total diminuiu significativamente em NaOCl, NaOCl/HEBP e PAA, em comparação ao grupo de controle e a CHX. As soluções de NaOCl e NaOCl/HEBP foram as mais eficazes contra um biofilme de *E. faecalis*.

Niazi *et al.*, em 2014, investigaram a dinâmica da desinfecção utilizando soluções com de tripsina 1% e proteinase K 1%, combinado com CHX 2% (com ou sem uso do ultrassom) em um modelo de múltiplas espécies bacterianas encontradas em tratamentos endodônticos. O biofilme composto por: *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Actinomyces radicidentis*, *Streptococcus mitis* e *E. faecalis*, foram cultivadas em dentes unirradiculares. Os grupos de tratamento eram compostos por: tripsina 1% e CHX 2%, proteinase K 1% e CHX 2% (com e sem ultrassom). CHX 2% foi o controle positivo e solução salina estéril (com e sem ultrassom) foi o controle negativo. Para avaliar o modelo bacteriano foi utilizada microscopia confocal de varredura laser e a técnica life/dead. O grupo de tripsina e CHX com ultrassom foi significativamente mais eficaz na redução da contagem de bactérias viáveis e na redução da cobertura de substrato que todos os outros grupos. A contagem das bactérias viáveis do grupo proteinase K associada a CHX com ou sem o uso do ultrassom, foram significativamente menores em comparação ao controle não tratado e a solução salina. Já a CHX sem a associação com a tripsina e a proteinase K, foi menos eficaz quanto a ruptura do biofilme em comparação aos grupos associados. O grupo tripsina e CHX com ultrassom foi significativamente mais eficaz na redução de contagens de bactérias viáveis e ruptura do biofilme.

Bailón-Sánchez *et al.*, em 2014, avaliaram a atividade antimicrobiana e a capacidade de inibição e formação de biofilme de *E. faecalis*, fazendo uso cimento endodôntico AH Plus, sozinho e com a adição de CHX, cetrímide (CTR), e combinações dos dois. O cimento AH Plus foi misturado a CHX 1% e 2%, e a CTR 0,1% e 0,5% e

combinações de ambos foram analisadas de acordo com sua atividade antimicrobiana pelo teste de contato direto e tiveram a determinação da inibição da formação do biofilme em 24h, o cimento sozinho foi usado como controle. AH Plus + CHX mostrou uma baixa atividade antimicrobiana em relação ao controle em ambas as concentrações. AH Plus + CTR mostraram uma relação direta entre a concentração e efeito antimicrobiano, atingindo uma redução e inibição da formação de biofilme em 0,2%. As combinações de CHX + CTR, foram necessárias concentrações mais baixas para o mesmo efeito, sendo alcançadas erradicação e inibição de biofilme. A adição de CHX, CTR, ou a combinação destes ao AH Plus mostrou uma inibição na formação de biofilme de *E. faecalis*.

Du *et al.*, em 2014, avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes soluções desinfetantes utilizadas em tratamentos endodônticos. Os blocos de dentina contaminados com *E. faecalis*, foram incubados por um dia e três semanas e submetidos a exposição as seguintes soluções: água esterilizada, CHX 2%, NaOCl 2% e NaOCl 6%, durante 3, 10, e 30 minutos. Após os tratamentos as amostras foram analisadas por microscopia confocal de varredura e pela técnica LIFE/DEAD de viabilidade bacteriana. A proporção de células mortas foi menor aos 3min de exposição quando comparado aos outros dois tempos, porém pode-se observar que nos primeiros 3min a morte bacteriana foi mais rápida, diminuindo significativamente aos 10min. A solução de NaOCl 6% foi a mais eficaz contra ambos os tempos de incubação, já a CHX 2% e o NaOCl 2% não apresentaram diferença significativa entre eles. Ainda, observou-se, que as amostras com um dia de incubação apresentaram maior morte bacteriana em relação às

amostras incubadas por três semanas. A solução desinfetante é dependente do tempo para promover a ação, no entanto não mostrou-se necessário um período superior a 10min de exposição.

Böttcher *et al.*, em 2015, correlacionaram a viabilidade bacteriana após a utilização de uma solução de CHX 2% na dentina por meio de microscopia de varredura e cromatografia líquida de alto desempenho, durante 48 horas, 7 dias e 30 dias. Para isso, utilizou-se, 123 dentes humanos extraídos, divididos em quatro grupos de acordo com a solução utilizada, CHX ou soro fisiológico, e presença de *E. faecalis*. As amostras foram mantidas em contato, durante 5 minutos, em 5ml de uma das soluções utilizadas, sendo que, cada grupo foi dividido em três subgrupos para realizar as análises. Houve uma correlação negativa entre a porcentagem de células vivas e a quantidade restante de CHX. Após as primeiras 48h a CHX reduziu significativamente o número de células viáveis em comparação com soro fisiológico, igualmente ao analisado no sétimo dia. Na última amostra, 30 dias após, a CHX apresentou um aumento de células viáveis tornando-se semelhante à solução salina. Simultaneamente observou-se uma redução significativa na CHX remanescente nas amostras de 30 dias. Observou-se que a solução de CHX 2% foi detectada durante 48 horas e sete dias com uma baixa porcentagem de células viáveis e que a presença de microrganismos na dentina humana não afetou de manutenção CHX.

Wilson *et al.*, em 2015, investigaram se a variabilidade genética de *E. faecalis* altera a formação de biofilme após a exposição a soluções irrigantes e medicamentos endodônticos. Foram coletadas cinco diferentes amostras de *E. faecalis* de diferentes pacientes. Os biofilmes foram cultivados em placas de microtitulação na presença de NaOCl,

Ca(OH)₂, CHX, tetraciclina ou clindamicina e quantificados por coloração violeta cristal e a densidade óptica determinada com um leitor de microplacas. A produção de muco foi determinada qualitativamente por crescimento em placas de ágar com vermelho Congo. Modelos lineares mistos foram utilizados para determinar o crescimento das diferentes variabilidades de bactérias na presença das soluções ou medicações. De maneira geral todas as substâncias inibiram o crescimento de *E. faecalis*. Duas cepas apresentaram resistência significativa na presença de tetraciclina e uma na presença de NaOCl. Qualitativamente a produção de muco variou de acordo com a produção de biofilme. Os resultados indicam que as cepas de *E. faecalis* que formam biofilme quando exposta a diferentes soluções endodônticas podem ter maior probabilidade de sobreviver tratamento.

2.3 Hidróxido de cálcio

Tanomaru Filho *et al.*, em 2002, avaliaram a recuperação apical em cães com necrose pulpar e lesão periapical crônica após o tratamento endodôntico. Para isso, foram utilizados 72 canais radiculares de quatro cães submetidos a preparo químico/mecânico com NaOCl 5,25% ou CHX 2% como solução de irrigante. Alguns canais eram obturados imediatamente após o tratamento com Sealapex e técnica de condensação lateral dos cones de gutta-percha, e outros eram preenchidos com Ca(OH)₂ como medicação intracanal durante 15 dias. Passado esse período, eram também obturados com Sealapex. Duzentos e dez dias depois, os animais foram sacrificados e obtidos cortes histológicos corados com hematoxilina para análise em microscopia

óptica da reparação apical e periapical. Não observou-se diferença entre as raízes seladas imediatamente e preenchidas com medicação, porém notou-se melhores resultados nos preparos realizados com clorexidina.

Tanomaru *et al.*, em 2003, investigaram efeito do preparo biomecânico com diferentes soluções irrigadoras e Ca(OH)₂ como medicação intracanal em canais radiculares de cães com presença de endotoxina bacteriana (lipopolissacarídeos – LPS). Cento e quarenta raízes de pré-molares de sete cães foram preenchidas com *Escherichia coli* LPS por 10 dias, sendo que três raízes foram perdidas no processamento histológico. Para o preparo químico/mecânico foram utilizadas as seguintes soluções irrigadoras: NaOCl 1%, 2,5% e 5%; CHX 2 % e soro fisiológico, um grupo irrigado com soro fisiológico e utilização de Ca(OH)₂ como medicação intracanal e outro mantido contaminado durante todo o experimento. Os animais foram sacrificados 60 dias após e analisados os seguintes parâmetros: (a) infiltrado inflamatório, (b) a espessura ligamento periodontal, (c) a reabsorção do cimento e (d) reabsorção óssea. Os exames histopatológicos revelaram que todos os grupos tratados apresentavam maior infiltrado inflamatório e espessamento periodontal, e maior reabsorção tanto de cimento quanto óssea, em comparação ao grupo que recebeu a medicação com Ca(OH)₂. Nesse caso, observou-se que o preparo químico/mecânico não inativa o efeito das endotoxinas, mas o Ca(OH)₂ como medicação parece inativar o efeito das mesmas.

Gomes *et al.*, em 2003, demonstraram o tempo necessário para recontaminação de canais radiculares selados com Ca(OH)₂, CHX gel 2% ou a combinação de ambas as medicações. Foram selecionadas 80 raízes de pré-molares humanos, livres de cáries e com ápice formado.

Após o preparo biomecânico de 75 dentes, eles foram divididos aleatoriamente em nove grupos de acordo com a medicação intracanal e selamento coronal com 'Intermediate Restorative Material' (IRM) da seguinte forma: (i) 10 dentes medicados com CHX gel 2%, sem selamento coronal; (ii) 10 dentes medicado com CaOH₂, sem selamento coronal; (iii) 10 dentes medicado com CaOH₂ + CHX gel 2%, sem selamento coronal; (iv) 10 dentes medicado com CHX gel 2% + selamento coronal; (v) 10 dentes medicados com CaOH₂ + selamento coronal;; (vi) 10 dentes medicado com CHX gel 2% + CaOH₂ + selamento coronal;; (vii) 10 dentes sem medicação intracanal e selamento coronal;; (viii) 5 dentes sem medicação intracanal e sem selamento coronal, utilizado como grupo controle positivo (PC); (ix) cinco dentes com as coroas intactas serviram de grupo controle negativo (NC). Frascos de vidro foram preenchidos com caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), de modo que apenas o ápice estava em contacto com o caldo, enquanto a coroa foi imersa em saliva humana + BHI (3:1). Os frascos foram então incubados a 37 ° C numa atmosfera de CO₂ a 10%, e o crescimento microbiano foi verificado diariamente. A recontaminação foi detectada após um período médio de 3,7 dias nos canais sem selamento medicados com CHX gel 2%, 1,8 dias no grupo medicado com CaOH₂ e 2,6 dias no grupo medicado com CaOH₂ + CHX gel 2%. Quando as coroas foram seladas com IRM, a recontaminação foi detectado dentro de 13,5 dias nos canais medicados com CHX gel 2%, após 17,2 dias no grupo medicado com CaOH₂ e após 11,9 dias no grupo medicado com CHX gel 2% + CaOH₂. O grupo sem medicação, mas selado com IRM, mostrou recontaminação após 8,7 dias. O selamento coronal aumenta o tempo para que ocorra uma

recontaminação dos canais radiculares, já os de medicamentos utilizados não se mostraram significativamente diferentes quando a atividade antimicrobiana.

Delgado *et al.*, em 2010, avaliaram a eficácia do Ca(OH)₂ e da CHX gel 2% na eliminação de *E. faecalis* da região intratubular de dentes humanos unirradiculares. As raízes foram contaminadas e posteriormente receberam os seguintes tratamentos: Ca(OH)₂, CHX gel 2%, Ca(OH)₂ mais CHX gel 2%, ou de solução salina (NaCl a 0,9%) como controle negativo. Observou-se uma diminuição significativa no número de UFC e no percentual de células viáveis quando comparados os grupos de Ca(OH)₂ e CHX gel 2% ao grupo controle. A CHX gel 2% apresentou resultados significativamente maiores quando comparada ao Ca(OH)₂, já quando associada ao Ca(OH)₂ a CHX não apresentou melhoras nas propriedades antimicrobianas. Ambas as substâncias apresentaram ação antimicrobiana sobre o *E. faecalis*, porém a CHX apresentou atividade aumentada em relação ao Ca(OH)₂ e na união das duas substâncias não se obteve um ganho na atividade antimicrobiana permanecendo semelhante a CHX sozinha.

Rôças & Siqueira, em 2011, avaliaram os efeitos antimicrobianos do preparo químico-mecânico associado ao uso de medicação intracanal. Foram colhidas amostras de 24 canais com polpa necrosada que serviram de grupo controle (S1), foi realizado o preparo químico-mecânico com NaOCl 2,5% (S2), e como medicação intracanal, durante sete dias, foi utilizado pasta de Ca(OH)₂ com glicerina ou paramonoclorofenol canforado / glicerina (S3). A presença de microrganismos foi avaliada por meio da técnica de PCR e a identificação através da *closed-ended reverse-capture*. Todas as amostras foram positivas para bactérias e

negativas para outros microrganismos, como fungos, sendo todos os procedimentos eficazes na redução do número de bactérias. Em 46% das amostras S2 e 62,5% de amostras S3 a análise por PCR foi negativa. Exceto nas comparações com o grupo S1, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados. No entanto, a presença de níveis detectáveis de bactérias persistentes em muitos casos, indica que a busca de estratégias mais eficazes de tratamento antimicrobianos deve ser estimulada.

Wagner *et al.*, em 2011, pesquisaram a eficácia da associação de um inibidor de bomba de prótons (omeprazol) com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ como medicação intracanal em ratos com lesões periapicais induzidas. Trinta e seis ratos wistar machos foram selecionados e tiveram a lesão induzida no primeiro molar inferior direito. Após 28 dias foi realizado o preparo do canal, que receberam as seguintes medicações: grupo controle negativo polietileno glicol 400 (PEG400); grupo de controle positivo, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + PEG400; e grupo de teste $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + omeprazol + PEG400; selamento com amálgama durante 15 ou 28 dias. Amostras microbiológicas foram coletadas em três períodos: S1, após 28 dias de indução da lesão; S2, após o preparo químico-mecânico; e S3, após a medicação (15 e 28 dias). A análise radiográfica e histológica revelou que tanto $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou $\text{Ca}(\text{OH})_2$ com omeprazol produziu uma redução de lesões periapicais em 28 dias, quando comparado com o grupo controle negativo. A redução das lesões periapicais e de células de infiltrado inflamatório foi visivelmente melhorada na associação do omeprazol com $\text{Ca}(\text{OH})_2$, com um aumento das áreas ósseas reparadoras. A avaliação microbiológica mostrou uma diminuição significativa de UFCs, mas não foram observadas diferenças entre S2 e S3 e os períodos

de tempo ou entre os grupos experimentais dentro do período S3. Além disso, a caracterização bacteriana mostrou uma possível atividade seletiva dos medicamentos. Os dados mostraram que a associação entre Ca(OH)_2 + omeprazol mostrou-se mais eficaz na recuperação das lesões periapicais induzidas no ratos e pareceu exercer diferente atividade antimicrobiana seletiva em comparação com a medicação convencional de Ca(OH)_2 .

Oliveira *et al.*, em 2012, investigaram os efeitos do tratamento endodôntico utilizando diferentes irrigantes em canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical e seus possíveis efeitos citotóxicos. Foram selecionados 36 canais radiculares, divididos em três grupos de 12 canais de acordo com a solução irrigadora utilizada: CHX gel 2% + hidróxido de cálcio (0,14% água de cal) (CHX + LW); CHX gel 2% + polimixina B (CHX + PmB); CHX + solução salina (controle). As amostras foram coletadas antes (S1) e após a instrumentação (S2), a terceira amostra (S3) foi realizada após o EDTA e S4 após medicação intracanal (CHX + Ca(OH)_2 durante 14 dias). As endotoxinas foram quantificadas pelo ensaio cromogênico amebócitos lisado de *Limulus*, e os efeitos citotóxicos foram avaliados pela produção de citocinas (interleucina-1 β , fator alfa de necrose tumoral) em macrófagos (RAW 264.7 estimuladas) com o conteúdo do canal radicular. Endotoxinas foram detectadas em todos os canais radiculares antes instrumentação (S1). No grupo CHX + LW ocorreu a maior redução após a instrumentação (99,18%), semelhante ao grupo CHX + PmB (96,42%, $P > 0,05$) e diferente do grupo CHX (90,78%, $P < 0,05$). A medicação intracanal promoveu uma importante neutralização das endotoxinas, com uma redução de 99,2% para 100%. O conteúdo do canal radicular

induziu um aumento da produção de fator de necrose tumoral, quando comparado as amostras S1 com as amostras obtidas após o tratamento. Sendo, a combinação de água de cal e CHX como irrigante mais eficaz na redução de endotoxinas nos canais radiculares, e a medicação intracanal na neutralização dos efeitos citotóxicos.

Pavaskar *et al.*, em 2012, avaliaram a eficácia como medicação intracanal do Ca(OH)₂, Vitapex (VP), linezolid (LZ), uma combinação de LZ com Ca(OH)₂ (LC) contra *E. faecalis*. Pré-molares unirradiculares humanos foram padronizados com instrumentos F3 do sistema ProTaper. As raízes foram inoculadas com *E. faecalis* e incubadas. Após 72 horas de uso da medicação foram selecionadas seis amostras de cada grupo pesquisado e extraído raspas de dentina, que foram colocadas em infusão cérebro/coração (BHI), sendo realizadas diluições do BHI em ágar sangue para contagem das UFCs, o procedimento foi repetido após oito e 14 dias. No grupo Ca(OH)₂, os valores após 72 horas, 8 dias e 14 dias foram de $1,17 \pm 1,16$, $3,33 \pm 1,97$, $4,17 \pm 1,17$ respectivamente, no grupo VP, a média de UFCs foi $0,83 \pm 0,75$, $4,00 \pm 1,67$ e $4,83 \pm 1,72$. No grupo LZ, as UFCs após 72 horas e oito dias foram de $0,17 \pm 0,41$, não sendo encontradas UFCs ao 14º dia. Já no grupo LC, as UFCs após 72 horas e oito dias após foram de $0,50 \pm 0,84$, ocorrendo um aumento para $1,33 \pm 1,51$ no 14º dia. O grupo LZ se mostrou mais eficaz contra *E. faecalis* seguido por LC, Ca(OH)₂ e VP.

Beus *et al.*, em 2012, compararam os resultados de um protocolo de irrigação único não ativado (NAI) com NaOCl 1%, com outro de irrigação passiva ultrassônica (PUI) que utilizou NaOCl 1%, EDTA 17%, e clorexidina 2% em canais livre de bactérias. Além disso, o efeito da eliminação bacteriana de uma segunda instrumentação após a

utilização de medicação intracanal com Ca(OH)_2 . Foram selecionados 50 pacientes com necessidade de tratamento endodôntico em dentes posteriores. Os elementos foram aleatoriamente tratados de acordo com os protocolos NAI ou PUI, sendo realizado em ambos os grupos a utilização de medicação intracanal. As amostras para cultura bacteriana foram obtidos em quatro períodos: (1) antes de instrumentação, (2) após o protocolo de irrigação, (3) após a medicação com Ca(OH)_2 , e (4) antes da obturação. A análise estatística foi realizada em dados usando o teste exato de Fisher e análise multivariada. Os protocolos NAI e PUI mostraram 80% e 84% dos canais livre de bactérias, respectivamente, no final da primeira visita. Depois da medicação Ca(OH)_2 o total das amostras (NAI + PUI) aumentaram para 87% livre de bactérias, e após a segunda instrumentação obteve-se um total de 91% bactérias livres. Não houve diferença estatística entre os métodos de irrigação. Cada protocolo resultou em uma alta frequência de culturas negativas, que estão provavelmente relacionadas a um aumento do volume e profundidade de irrigação em comparação aos protocolos previamente reportados.

Pan *et al.*, em 2013, analisaram a viabilidade da utilização de tratamento de plasma frio de canais radiculares infectados com *E. faecalis*. Setenta dentes unirradiculares foram selecionados, divididos em sete grupos e infectados com *E. faecalis*. Grupo 1: controle negativo (sem tratamento) e Grupo 7: controle positivo, dentes medicados com Ca(OH)_2 durante 7 dias. Grupos de 2 a 6 dentes tratados por plasma frio por 2, 4, 6, 8, e 10 minutos, respectivamente. A desinfecção foi avaliada por UFCs, microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar as mudanças estruturais do biofilme e microscopia confocal foi utilizada para investigar a vitalidade dos microrganismos no biofilme antes e

depois do tratamento de plasma. Uma diminuição significativa no número de UFCs foi observada após tratamento com plasma frio. Quando comparado com o grupo controle positivo, os tratamentos de 8 ou 10 minutos (grupos 5 e 6) tiveram uma eficácia antimicrobiana significativamente maior ($P < 0,05$). A análise microscópica eletrônica de varredura mostrou que a membrana das bactérias foi rompida e a estrutura do biofilme foi completamente destruída pelo plasma. Já a microscopia confocal indicou que o tratamento com plasma induziu o *E. faecalis* a morte e a destruição do biofilme.

Soares *et al.*, em 2013, relataram o uso da pasta de Ca(OH)_2 associada a CHX gel 2% no processo de descontaminação, medicação intracanal e revascularização de um incisivo superior esquerdo que sofreu um intrusão dental e exposição pulpar causada por fratura de esmalte e dentina. Sendo o tratamento realizado com instrumentação manual dos terços cervical e médio e utilização da pasta de pasta de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% durante 21 dias, após esse período o coágulo sanguíneo foi estimulado até o terço cervical e realizado selamento com agregado trióxido mineral (MTA) mais restauração. Observou-se durante os dois anos de acompanhamento uma diminuição progressiva na largura do canal radicular e fechamento apical, uma tomografia computadorizado cone-beam confirmou esses achados. Assim, a associação do Ca(OH)_2 e CHX gel 2% se mostrou eficaz em casos de tratamento com revascularização.

Agrafioti *et al.*, em 2013, avaliaram as alterações de pH do Ca(OH)_2 , da CHX gel 2% e da combinação das duas substâncias, após a adição de dentina pó obtida das paredes dos canais radiculares e do assoalho da câmara pulpar de dentes bovinos. Os valores de pH das

misturas foram avaliados imediatamente após a preparação, 24 horas depois, 7 e 14 dias posteriormente. Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância e teste t de Student ($P = 0,05$). Os valores do pH do Ca(OH)_2 foram sempre superiores a 12 durante os 14 dias de testes, observou-se uma diminuição significativa do pH no 14º dia quando adicionado dentina das paredes do canal radicular. A CHX gel 2% teve seu pH aumentado significativamente na presença de dentina. Já na associação das substâncias não ocorreu alteração do pH quando adicionado dentina das paredes do canal, apenas uma redução no 14º dia, quando adicionado dentina do assoalho da câmara pulpar não sofreu nenhuma alteração. Dessa forma, o pH das medicações intracanal podem sofrer alterações de acordo com o tipo de dentina ao qual fica exposto.

Atila-Pektas *et al.*, em 2013, compararam a atividade antimicrobiana Activ Point, Ca(OH)_2 Plus Point, Ca(OH)_2 , CHX gel 1% e bioactive glass (S53P4) contra *E. faecalis* e *S. mutans*. Foram selecionados 120 dentes humanos unirradiculares extraídos, que tiveram suas coroas seccionadas e preparados com sistema ProTaper. Após autoclavagem os elementos foram incubados a 37°C com *E. faecalis* e *S. mutans* durante 1 semana. As amostras foram divididas em cinco grupos de tratamento para cada microrganismo de acordo com a medicação intracanal utilizada. Em cada grupo experimental, 10 raízes foram incluídas como tratamento, uma raiz como controle positivo e uma raiz como o controle de esterilidade. Cones de papel estéreis foram utilizados para obter as amostras dos canais radiculares, posteriormente foram inoculadas em agar sangue e incubados durante a noite. Foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias e os resultados foram

testados estatisticamente usando testes de comparações múltiplas não paramétricas de Conover Kruskal-Wallis. CHX gel, Activ Point e Ca(OH)_2 foram significativamente mais eficazes contra *E. faecalis* que Ca(OH)_2 Plus Point e bioactive glass, respectivamente. Por outro lado, quando comparado o Ca(OH)_2 , CHX Gel, Activ Point e bioactive glass produziu contagens de colônias significativamente mais baixas de *S. mutans*. Quando comparado com ao grupo controle positivo, o tratamento com Ca(OH)_2 Plus Point não produziu contagens de colônias significativamente mais baixas de *E. faecalis* e *S. mutans*. Na comparação das medicações que possuem pH alcalino com as que possuem CHX na sua composição esses também se mostraram eficazes contra *E. faecalis* e *S. mutans*.

Ferreira *et al.*, em 2015, em seu estudo clínico determinaram o perfil microbiológico resistentes a diferentes medicações intracanaís em infecções endodônticas primárias usando a cultura microbiológica e a técnica checkerboard de hibridização DNA-DNA. Vinte canais radiculares com infecção primária foram selecionados e instrumentados. Após foram separados aleatoriamente em dois grupos de acordo com a medicação intracanal utilizada: Ca(OH)_2 ou Ca(OH)_2 + CHX. As amostras foram coletadas antes e depois dos procedimentos endodônticos e submetidas à cultura microbiológica e processamento para a hibridização. Não foram encontradas diferenças entre os grupos Ca(OH)_2 (99,98%) e Ca(OH)_2 + CHX (99,76%) em relação aos valores médios das bactérias cultiváveis. Nas amostras iniciais as espécies mais frequentemente detectadas foram *Capnocytophaga ochracea* (70%) e *Fusobacterium nucleatum ssp. Vincentii* (70%). Após a instrumentação, a espécie mais frequentemente detectada foi *E. faecium* (60%). Após os

tratamentos endodônticos e uso das medicações intracanaís, as espécies mais frequentemente detectadas foram *F. nucleatum ssp. Vincentii* (90%) e *E. faecium* (40%), respectivamente. Ambos os tratamentos diminuíram significativamente o número de espécies de bactérias em comparação com a amostra inicial, porém o uso do Ca(OH)_2 associada a CHX como medicação intracanal apresentou melhores resultados, agindo sobre os microorganismos gram-positivos e gram-negativos.

Van der Waal *et al.*, em 2015, avaliaram o tratamento realizado com hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 em biofilmes mistos contendo *Enterococcus faecalis*. Os biofilmes foram cultivados a partir de estirpes laboratoriais de *E. faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, ou de material coletado de infecções endodônticas primárias. A proporção de *E. faecalis* e *P. aeruginosa* e a sua susceptibilidade à desinfecção foram avaliados em um ensaio de viabilidade. No ensaio de espécies mistas, a presença e as proporções de *E. faecalis*, antes e depois de Ca(OH)_2 foram avaliadas por PCR - quantitativa. Após o tratamento com Ca(OH)_2 em biofilmes, contendo apenas as duas estirpes citadas, a proporção de *E. faecalis* tinham aumentado, ao passo que o número total de UFCs por biofilme era igual. Observou-se que o Ca(OH)_2 favorece o *E. faecalis* em biofilmes de duas espécies. Também pode-se observar a presença do *E. faecalis* em biofilmes multiespécies e em infecções endodônticas primárias.

2.4 Extrato de semente de uva (GSE)

Houde *et al.*, em 2006, investigaram os efeitos da prontocianidina presente no extrato de sementes de uva (GSE) e de

polifenóis comerciais na produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e reativas ao nitrogênio (RNS) na expressão da proteína sintetizadora de óxido nítrico induzível (NOSi) por macrófagos estimulados por lipopolissacáridos (LPS) de periodontopatógenos. Os macrófagos (RAW 264.7) foram tratados com concentrações não tóxicas de polifenóis comerciais ou GSE e estimulados com LPS de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ou *Fusobacterium nucleatum*, a expressão de NOSi foi avaliada por imunofluorescência. A produção de óxido nítrico (NO) foi quantificada utilizando o ensaio colorimétrico de Griess, ao passo que a produção de ROS foi medida com o corante fluorescente dihydrorhodamine-123. O GSE diminuiu significativamente a produção de NO e ROS e a expressão NOSi por macrófagos estimulados com LPS. O polifenol comercial, ácido gálico, também revelou um forte efeito inibidor sobre a produção de NO, sem afetar a expressão NOSi aumentando ligeiramente a produção de ROS. Já o polifenol EGCG mostraram um efeito inibitório sobre a produção de NO e de ROS e na expressão de NOSi por macrófagos. Os resultados mostraram que as proantocianidinas têm potentes propriedades antioxidantes devendo ser consideradas como um agente na prevenção de doenças periodontais.

Xie *et al.*, em 2008, avaliaram o fortalecimento dos tecidos à base de colágeno, aumentando as ligações cruzadas. Utilizou-se um modelo *in vitro* de ciclagem de pH para avaliar o efeito da GSE na remineralização de raízes com lesões de cáries provocadas. Fragmentos de dentes humanos obtidos da porção cervical de raízes foram armazenados em uma solução para desmineralização durante 96 horas a 37°C para induzir lesões artificiais cáries de raiz. Os fragmentos foram

então divididos em três grupos de tratamento: 6,5% GSE; fluoreto de sódio (NaF) 1.000ppm e um controle (sem tratamento). As amostras foram desmineralizada, por ciclagem do pH, através de soluções de tratamento, tampão ácido e tampão neutro durante oito dias a seis ciclos por dia. Posteriormente foram avaliados usando teste de microdureza, microscopia de luz polarizada (PLM) e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). Os dados foram analisados por meio de testes de ANOVA e Fisher ($p < 0,05$). GSE e fluoreto aumentaram a dureza das lesões ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. A análise de PLM revelou uma banda precipitação mineral na camada superficial significativamente mais espessa que nas lesões tratadas com GSE quando comparado aos outros grupos ($p > 0,05$), o que foi confirmado pelo CLSM. O extrato de semente de uva afetou positivamente os processos de desmineralização e/ou remineralização de lesões de cárie provocadas, desse modo, o GSE pode ser um agente natural para a terapia não invasiva de cárie radicular.

Bronw *et al.*, em 2009, investigaram os efeitos de diversas variedades de extratos de uva contra o *Helicobacter pylori* na tentativa de determinar uma correlação entre anti - *H. pylori* e a atividade dos extratos fenólicos. A atividade anti - *H. pylori* foi determinada através de diluição de ágar, microscopia confocal, e ensaios de proliferação de células após tratamento com vários extratos de uva. Os compostos extraídos da casca da variedade Muscadine possuíam uma atividade mais forte, porém não demonstraram ser mais eficaz. A microscopia confocal revelou menos células bacterianas presentes na superfície das células hospedeiras logo após o tratamento com os GSEs. Os compostos foram eficazes na inibição de *H. pylori in vitro*, com melhores resultados para o

extrato da casca de Muscadine, sendo que, os resultados sugerem que os anticorpos para *H. pylori* não necessariamente se relacionam com maior teor de compostos fenólicos.

Mageshwaran *et al.*, em 2012, determinaram o efeito das proantocianidinas presentes no GSE e do licopeno presente no extrato de tomate em espécies reativas de oxigênio (ROS), quando utilizados como medicação intracanal. E a eficácia antibacteriana dessas substâncias associadas a CHX e ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$ contra *E. faecalis*. Quatro grupos foram preparados, grupo I: CHX 2% (grupo de controle); grupo II: 125mg de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ misturado a CHX 2%; grupo III 125mg de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ misturado a 1ml de CHX 2% mais 1ml de solução de proantocianidinas 5% e grupo IV, 125mg de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ misturado a 1ml de CHX 2% mais 1ml de solução de licopeno 5%. Os grupos foram analisados para a formação de ROS usando o espectrômetro de massa imediatamente após a preparação. A propriedade antibacteriana foi avaliada usando o método de difusão em ágar e os resultados foram analisados estatisticamente pela ANOVA e Tukey-Kramer testes de comparação múltipla. O valor de pico de 196,96 indica a formação de ROS, o grupo II apresenta um valor de pico mais elevado do que outros grupos, já o grupo IV mostra uma redução drástica nesse valor quando comparado aos outros três grupos. A eficácia antibacteriana foi maior no grupo IV, seguido de grupo III, grupo II e grupo I. O licopeno e as proantocianidinas reduziram o ROS significativamente em virtude de sua propriedade antioxidante.

Ghonmode *et al.*, em 2013, investigaram a eficácia antimicrobiana de plantas medicinais na desinfecção do sistema de canais radiculares comparadas ao NaOCl. Foi preparada uma infusão em BHI com *E. faecalis* (ATCC 29212) e o teste de difusão em ágar foi realizada

para medir a zona de inibição das seguintes soluções: extratos de folhas de *neem*, GSE, NaOCl 3% e etanol absoluto. Extrato de folhas e GSE mostraram zonas de inibição sugerindo que eles tinham propriedades antimicrobianas. O extrato de folhas de *neem* mostrou zonas significativamente maiores de inibição quando comparadas ao NaOCl 3%. Já o GSE apresentou resultados interessantes para zonas de inibição, mas não foram tão significativos como o extrato folhas de *neem*. Este estudo demonstra a possibilidade de uso do extrato de folhas de *neem* como medicação intracanal.

Zhao *et al.*, em 2014, pesquisaram, *in vitro*, a influência do GSE em um modelo de biofilme formado por *S. mutans* na formação no processo de lesões cáries em esmalte dentário. Foram preparados fragmentos de esmalte bovino e divididos em seis grupos (n=12) de acordo com o tratamento recebido: inoculados com caldo cérebro/coração mais 1% de sacarose (BHIS), 1 mg/ml de GSE, 2mg/ml GSE, 3mg/ml de GSE, 10ppm fluoreto como NaF e não inoculadas BHIS. Para a formação de biofilme, os fragmentos dos dentes foram incubadas anaerobicamente em placas de poliestireno com seis poços de cultura de tecidos contendo BHIS, os respectivos agentes, e *S. mutans* (1×10^5 (5) CFU/ml) durante 24 h a 37 ° C. O meio de cultura foi substituído por BHIS fresco e os respectivos agentes diariamente ao longo de sete dias. Após a formação da lesão de cárie, a profundidade da lesão (LD) e a densidade óptica relativa (ROD) foram determinadas por microscopia de luz polarizada (PLM) e microscopia confocal (CLSM), respectivamente, para avaliar a progressão da lesão. A LD do grupo 2mg/ml GSE ($122,86 \pm 13,41\mu\text{m}$) e do grupo 3mg/ml GSE ($111,92 \pm 11,39\mu\text{m}$) foram significativamente menores do que os do grupo 1mg/ml

GSE ($198,33 \pm 17.70\mu\text{m}$) e do grupo de controle ($210,86 \pm 15.50\mu\text{m}$) ($p < 0,05$). Quando comparado a ROD os grupos 2mg/ml e 3mg/ml, controle e 1mg/ml de GSE mostraram valores significativamente mais baixos que $200\mu\text{m}$, indicando maior perda mineral. O estudo mostrou que o GSE, dependendo da dose, suprime o crescimento do *S. mutans*, formação de biofilme e conseqüentemente a formação de lesões cáries, sendo um agente antimicrobiano natural na prevenção de cáries.

Silva *et al.*, em 2015, avaliaram no seu estudo *in vitro* a eficácia de um tratamento com o GSE, para minimizar ou mesmo prevenir o aparecimento da cárie em esmalte e dentina. Blocos de esmalte e dentina foram obtidos de incisivos bovinos e selecionados através de teste de microdureza de superfície. Os blocos foram divididos aleatoriamente em três grupos ($n = 15$): GC (grupo controle), GSE, GF (fluoreto - 1000 ppm). E submetidos a seis ciclos de pH diário durante 8 dias, sendo armazenadas em solução tamponada. Os blocos foram então analisados por dureza da superfície perpendicular e microscopia de luz polarizada, utilizando como testes estatísticos ANOVA e testes PLSD de Fisher ($p < 0,05$). No teste de SH em esmalte os maiores valores apresentados foram do grupo GF, assim como na dentina, seguido do grupo GSE. Em relação aos valores de dureza transversal, todos os grupos apresentaram comportamento semelhante, tanto em esmalte quanto dentina, sendo GSE e GF estatisticamente maiores que o GC. Sugere-se que o GSE atua como inibidor da desmineralização de lesões de cárie em esmalte e dentina, porém em menor quantidade que o fluoreto.

Cecchin *et al.*, em 2015, investigaram o efeito como agente antimicrobiano do GSE, NaOCl, CHX e do QMix contra um biofilme de

E. faecalis e a influência dessas substâncias na resistência coesiva e à flexural da dentina radicular. As amostras foram divididas em cinco grupos n = 10 de acordo com o material utilizado: NaOCl 2,5%, CHX 2%, GSE 6,5%, Qmix e grupo controle (água destilada) (DW), sendo realizada uma irrigação final com EDTA 17%, exceto no grupo DW. A ação antimicrobiana foi avaliada através da contagem de UFC e palitos de dentina foram utilizados para avaliar a resistência à flexão e ampulhetas para avaliar a resistência coesiva dos diferentes tratamentos. Foi observado uma menor contaminação bacteriana nos grupos que utilizaram CHX e GSE, NaOCl e QMix mostraram atividade antimicrobiana reduzida ($p > 0,05$). NaOCl e QMix também reduziram significativamente as propriedades mecânicas da dentina (resistência à flexão e coesiva) ($p < 0,05$) e não foi encontrada diferença estatística entre CHX, GSE e DW ($p > 0,05$). A CHX e o GSE foram mais eficazes que o NaOCl e QMix contra *E. faecalis*. E se mostraram não prejudiciais as propriedades mecânicas de dentina como observado para NaOCl e QMix.

2.5 Extrato de gengibre (GE)

Valera *et al.*, em 2013, pesquisaram a atividade antimicrobiana de substâncias químicas auxiliares e extratos naturais sobre *C. albicans* e *E. faecalis* inoculados por 21 dias em 72 canais radiculares de dentes humanos extraídos. Os grupos foram divididos de acordo com a substância química auxiliar: G1, NaOCl 2,5%; G2, CHX gel 2%; G3, óleo de rícino; G4, extrato glicólico de Aloe vera; G5, extrato de gengibre (GE) glicólico; e G6, solução salina estéril como controle. As

amostras foram coletadas após a primeira instrumentação e sete dias depois, ambas foram incubadas por 48 horas a 37°C. O NaOCl e CHX eliminaram completamente os microrganismos dos canais radiculares, o óleo de rícino e o GE reduziu significativamente o número de UFC de todas as bactérias testadas. Sendo que, a redução das UFC/ml na primeira e na segunda coleta nos grupos G1, G2, G3 e G4 foram maiores quando comparadas com os grupos G5 e G6. O NaOCl 2,5% e CHX gel 2% se mostraram mais eficientes na eliminação dos microrganismos testados, seguido de óleo de rícino e o GE glicólico. O extrato de aloe vera não mostrou atividade antimicrobiana.

Maekawa *et al.*, em 2013, investigaram eficácia do extrato própolis glicólico (PRO) e GE, Ca(OH)₂, a CHX gel e suas combinações como medicação intracanal (MIC) contra *C. albicans*, *E. faecalis*, *Escherichia coli* e endotoxinas em canais radiculares. Após 28 dias de contaminação, os canais foram instrumentados e, em seguida, divididos de acordo com a MIC: Ca(OH)₂ + solução salina; CLX + Ca(OH)₂; PRO + Ca(OH)₂; GIN + Ca(OH)₂; e apenas solução salina. A atividade antimicrobiana e quantificação de endotoxinas foram avaliadas após a instrumentação e aplicação por 14 dias de MIC e 7 dias após a remoção da MIC pelo teste cromogênico de amebócitos lisados de *Limulus*. Observou-se que todas as MICs foram capazes de eliminar os microrganismos nos canais radiculares e reduzir a quantidade de endotoxinas. No entanto, Ca(OH)₂ foi mais eficaz na neutralização de endotoxinas e menos eficaz contra a *C. albicans* e *E. faecalis*, exigindo a utilização de combinações de medicamentos para se obter maior sucesso.

Valera *et al.*, em 2014, no seu estudo *in vitro*, pesquisaram a ação do preparo químico-mecânico contra microrganismos e suas

endotoxinas utilizando o NaOCl e uma MIC contendo GE com ou sem Ca(OH)_2 . Dentes unirradiculares foram contaminados, e instrumentados com NaOCl 2,5%. As amostras foram divididas em 4 grupos: imediatamente após o preparo químico-mecânico, sete dias após o preparo químico-mecânico, 14 dias após a MIC e sete dias após a remoção da MIC. De acordo com os testes estatísticos Kruskal-Wallis e Dunn mostrou que o NaOCl eliminou 100% dos microrganismos dos canais radiculares e reduziu 88,8% de endotoxinas imediatamente após o preparo biomecânico, e 83,2% em 7 dias após o preparo biomecânico.

Nassan & Mohamed, em 2014, avaliaram a atividade antimicrobiana, *in vitro*, por meio do método de difusão em ágar de diferentes extratos naturais: extrato aquoso bruto de pimenta preta, gengibre e tomilho. Foram utilizados 50 ratos adultos, machos e albinos, divididos em cinco grupos cada um contendo 10 animais. Grupo 1: grupo controle negativo, receberam solução salina via intragástrica diariamente; Grupo 2: grupo controle positivo, injetados suspensão bacteriana mista de *S. aureus* e *E. coli* como um modelo de pielonefrite, em seguida, receberam solução salina via intragástrica diariamente; Grupo 3: injetado a mesma dose de suspensão bacteriana, em seguida, receberam 100mg de extrato / kg / dia de pimenta preta via intragástrica; Grupo 4: injetado suspensão bacteriana, em seguida, receberam 500mg / kg / dia de extrato de gengibre intragastricamente. Grupo 5: injetado suspensão bacteriana, em seguida, receberam 500 mg / kg / dia de extrato de tomilho intragastricamente. Todos os grupos foram sacrificados depois de uma ou quatro semanas. As amostras de soro e de sangue foram recolhidas para estimar a atividade de lisozima usando lysoplate de agarose, a medição da produção de óxido nítrico, e teste de

transformação dos linfócitos, assim como para a contagem de ambos os leucócitos e eritrócitos totais e diferenciais. Amostras de rim foram testadas histopatologicamente. Tanto *in vivo* quanto *in vitro* confirmaram a eficiência dos extratos naturais como antimicrobianos e sugerem a possibilidade da sua utilização em diversos tratamentos.

Jain *et al.*, em 2015, compararam a atividade antibacteriana de seis extratos de plantas indianas e CHX 0,2% contra estirpes clínicas de *S. mutans*, isoladas das amostras de placa de 45 pacientes pediátricos. Seis extratos vegetais foram preparados em três formas diferentes, extratos aquosos, extratos à base de solventes orgânicos e extratos crus. Os testes de sensibilidade antimicrobiana foram realizados através do método de difusão em ágar e a atividade antimicrobiana dos extratos foi determinada medindo a zona de inibição (mm) produzida contra os isolados bacterianos. Os resultados mostraram que o extrato de alho cru apresentou maior atividade antibacteriana que a CHX. O extrato aquoso de amla e o extrato à base de solvente orgânico de gengibre mostraram a máxima atividade antibacteriana contra *S. mutans*, enquanto o extrato aquoso de tulsi (manjeriço) e extrato de base solvente orgânico de amla mostrou atividade antibacteriana mínima. Os extratos mostraram ter potencial para o controle de *S. mutans*, podendo ser utilizados como uma solução alternativa para a prevenção de cáries dentárias ou sob a forma de bochechos de forma segura e econômica.

Revati *et al.*, em 2015, tiveram como objetivo principal da sua pesquisa explorar a ação antibacteriana *in vitro* de sete extratos etanólicos de especiarias contra *Enterococos* resistentes à gentamicina isolado a partir de amostras clínicas humanas. Duzentos e quinze estirpes de *Enterococos* foram isoladas a partir de amostras clínicas e os extratos

foram preparados a partir de: extrato etanólico de cominho (*Cuminum cyminum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), gengibre (*Zingiber officinale*), feno - grego ou alforva (*Trigonella foenum-graecum*), cravo (*Syzygium aromaticum*), cardamomo (*Elettaria cardamomum Maton*) e pimenta preta (*Piper nigrum*) foram preparados utilizando um aparelho de Soxhlet. O efeito antibacteriano dos extratos foram medidos utilizando o método de difusão em poços. Apenas a canela e o gengibre demonstraram atividade contra todos os isolados bacterianos, enquanto cominho e cravo tiveram um efeito variável sobre as cepas. O feno-grego, pimenta preta e cardamomo não mostraram efeito sobre o microrganismo. O diâmetro de zona de inibição obtidos para canela, gengibre, cravo e cominho ficaram em torno de 31-34 mm, 27-30 mm, 25-26 mm e 19-20 mm, respectivamente. As espécies utilizadas no estudo mostram um potencial para agente antimicrobiano podendo ser utilizadas em tratamentos anti-enterococcal.

Jain *et al.*, em 2015, pesquisaram a atividade antimicrobiana de seis plantas de origem indiana, usadas na medicina tradicional, contra cepas padrão de *S. mutans*, através do método de difusão em ágar. Dessa forma foi analisada a concentração inibitória mínima para o produto bruto, com base em solvente orgânico e extratos aquosos. Em todos os extratos aquosos e com base em solvente orgânico avaliados foram encontradas atividades antimicrobianas variáveis contra o patógeno oral. O extrato bruto de alho foi o mais eficaz contra *S. mutans* com a maior zona de inibição (24,62 milímetros), seguido do extrato aquoso de amla (19,47 milímetros) e extrato de gengibre em base de solvente orgânico (18,76 milímetros). O estudo demonstra o potencial das substâncias fitoterápicas na atividade antimicrobiana.

2.6 Alteração de cor das estruturas dentárias

Lenherr *et al.*, em 2012 utilizaram dentes bovinos para avaliar a alteração de cor de diferentes medicações intracanaís. Para isso foram preparados 210 blocos de dentina/esmalte do terço médio de coroas bovinas, onde cavidades padronizadas foram preparadas nas paredes da câmara pulpar deixando 2mm de esmalte e dentina na parede vestibular da coroa e separados em 14 grupos. As medicações endodônticas foram distribuídas da seguinte forma: Grupo A: controle, grupo B: sangue, grupo C: hidróxido de cálcio, grupo D: ApexCal, grupo E: Ultracal XS, grupo F: Ledermix, grupo G: pasta triplo antibiótico (3Mix), grupo H: MTA cinza (GMTA), o grupo I: GMTA + sangue, grupo J: MTA branco (WMTA), o grupo K: WMTA + sangue, grupo L: cimento Portland (PC), o grupo M: PC + sangue e grupo N: AH Plus. As cavidades foram seladas com compósito e armazenadas em água destilada. A mensuração da cor foi realizada com VITA EasyShade compacto nos seguintes intervalos: antes (T0) e após a colocação da medicação (T1), uma semana (T2), um mês (T3), 3 meses (T4), 6 meses (T5) e após 1 ano (T6). A mudança dos valores de cor (AE) foram calculados através de uma análise de duas vias de variância e os valores médios calculados através do teste Tukey ($\alpha = 0,05$). Após 12 meses foram encontradas diferenças significativas entre os materiais. Os valores mais baixos de mudança de cor foram observados nos grupos N (AH Plus, $3,2 \pm 1,5$), A (controle, $3,8 \pm 1,4$), L (PC, $4,1 \pm 1,7$), C (hidróxido de cálcio, $4,7 \pm 1,5$), E (Ultracal XS, $5,1 \pm 1,9$) e J (WMTA, $7,9 \pm 6,7$). A maior alteração foi medida nos grupos grupos G (3Mix, $66,2 \pm 9,9$) e F (Ledermix, $46,2 \pm 11,6$). PC sozinho mostrou a melhor estabilidade de

cor entre os materiais à base deste cimento, no entanto, quando contaminados com sangue (grupo M), um valor AE significativamente maior ($13,6 \pm 4,2$) foi detectado ($P = 0,032$). Este estudo demonstrou que materiais endodônticos podem alterar a coloração dos dentes, portanto a escolha material não deve basear-se unicamente em critérios biológicos e funcionais, mas também levar em consideração questões estéticas do elemento tratado.

Souza *et al.*, em 2013 analisaram as alterações de cor em esmalte e dentina promovida pelo uso isolado ou pela interação de CHX 2% com substâncias químicas auxiliares (NaClO e EDTA) comumente utilizadas na terapia endodôntica. Foram selecionados 75 incisivos bovinos que tiveram as coroas seccionadas sendo preparados 150 blocos de dentina/esmalte divididos em 10 grupos de acordo com o tipo de tratamento recebido. G1, solução de soro fisiológico a 0,9% (NaCl, grupo controle); G2, NaOCl 5,25%; G3, CHX gel 2%; G4, NaOCl 5,25% + EDTA 17%; G5, CHX gel 2% + EDTA 17%; G6, CHX gel 2% + NaOCl 5,25%; G7, CHX gel 2% + NaOCl 5,25% + EDTA 17%; G8, NaOCl 5,25% + CHX gel 2% + EDTA 17%; G9, CHX 2% em solução aquosa (solução CHX) + NaOCl 5,25%; G10, solução CHX 2% + NaOCl 5,25% + EDTA 17%. Os blocos foram avaliados quanto a cor antes e depois da imersão nas soluções através da escala de cores 3M (St. Paul, Minnesota, EUA) afim de estabelecer uma comparação para a alteração da coloração das amostras. O avaliador foi cego e diferentes pontuações numéricas foram estabelecidas da seguinte forma: A1, 1; A2, 2; A3, 3; A3.5, 4; A4, 5; CY, 6; C4, 7; > C4, 8. O tratamento com CHX gel + NaOCl e CHX gel + NaOCl + EDTA promoveu uma mudança de cor significativa no esmalte e dentina ($P < 0,05$). Os grupos tratados com

CHX solução + NaOCl e CHX solução + NaOCl + EDTA mostraram uma mudança significativa na cor da dentina ($P < 0,05$), mas não em esmalte ($P > 0,05$). O tratamento com NaCl (controle), NaOCl, CHX gel, NaOCl + EDTA, CHX gel + EDTA e de NaOCl + CHX gel + EDTA não mostraram qualquer efeito sobre a cor do esmalte ou dentina ($P > 0,05$). Observou-se nesse estudo que a combinação de CHX e NaOCl devem ser evitados devido à possibilidade de alteração de cor e formação de precipitado nas estruturas dentais. No entanto, se a utilização combinada de CHX 2% com 5,25% de NaOCl é escolhida, este último deve ser introduzido primeiro no canal radicular e ser completamente removido por uma solução intermediária de irrigação, como uma solução salina fisiológica, antes da colocação de qualquer formulação de clorohexidina.

Koursoumis, Kerezoudis & Kakaboura, em 2014, avaliaram *in vitro* as alterações de cor nos dentes associados a dois irrigantes comumente utilizados no tratamento endodôntico, CHX e o NaOCl até 15 dias após o tratamento, também foi avaliada a possível influência do acesso endodôntico na manutenção da coloração do elemento dentário. Foram selecionados trinta dentes anteriores humanos intactos, uma fita adesiva preta com uma janela de 4mm foi confeccionada para padronizar a superfície de esmalte/dentina e possibilitar a realização da análise da cor. Os elementos foram divididos em três grupos, acessados e preparados com instrumentação rotatória e irrigação convencional com solução salina, CHX ou NaOCl. As superfícies de esmalte foram colorimetricamente avaliados antes do acesso, após a preparação da cavidade e 1, 3, 7 e 15 dias pós-tratamento. Os parâmetros de cor CIE $L^*a^*b^*$ foram registados com uma média para cada material e as

diferenças de cor (AE) correspondentes foram calculadas e analisadas estatisticamente. O fator mais importante na alteração de cor do dente, durante o tratamento endodôntico, foi a elaboração de acesso. CHX e NaOCl causaram alterações de cor no elemento dentário quando comparadas a solução salina. CHX e NaOCl não aumentaram as mudanças de cor em relação aos valores induzidos pela preparação de acesso. As duas soluções irrigantes não foram capazes de induzir a alteração de cor do dente para uma extensão maior do que a preparação de acesso.

Beatty & Svec, em 2015 compararam a descoloração de elementos dentais após a utilização de três diferentes materiais utilizados em tratamentos endodônticos (MTA ProRoot = PR, Biodentine = BD e Endosequence = ES). Foram selecionados 48 incisivos bovinos, sendo os canais preparados, os materiais condensados e os acessos selados. A cor foi avaliada em diferentes tempos até dois meses de acordo com o sistema CIE L*a*b* e a mudança de cor, AE, foi comparado entre os grupos e ao longo do tempo por meio de análise de variância. Houve um aumento acentuado na AE após a inserção de todos os materiais, depois de uma recuperação para a cor inicial, todos os materiais apresentaram uma tendência para a descoloração durante o período experimental. Ao final das oito semanas BD e ES alteraram significativamente a cor dos corpos de prova quando comparados ao PR.

Marconyk *et al.*, em 2016 estudaram a pigmentação em um modelo *in vitro* após a utilização dos seguintes materiais endodônticos ProRoot MTA, ProRoot MTA branco, Endosequence, MTA Angelus, e Biodentine. Terceiros molares recém extraídos foram coletados e armazenados em cloramina T 1%. Os dentes foram divididos

aleatoriamente em 6 grupos (n = 15) e armazenados individualmente em solução salina tamponada com fosfato a 37 ° C em 100% de humidade. Um acesso endodôntico padronizado foi realizado em 5 grupos. Um incremento de 3 mm de espessura de material de reparação era colocado no assoalho da câmara pulpar, coberto por ionómero de vidro, e o acesso restaurado com compósito. A cor foi avaliada com espectrofotômetro Vita Easy Shade (sistema CIE L*a*b*) na superfície vestibular após a preparação de acesso; após a colocação do material; depois de 1, 7, 30 e 60 dias. Não foi utilizado controle negativo e positivo foi utilizado o ProRoot MTA. Os resultados médios foram analisados dentro de cada grupo e entre os grupos utilizando o teste Friedman 2-way analysis post hoc test (P < .05). Não houve diferenças significativas entre ProRoot MTA branco, MTA Angelus, e o grupo controle positivo. Endosequence e Biodentine produziu significativamente menos descoloração do ProRoot MTA branco, MTA Angelus e ProRoot MTA.

3. PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivos gerais:

Avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana de medicações intracanalais à base de produtos fitoterápicos associadas a um veículo biologicamente ativo.

Avaliar, *in vitro*, a influência do uso de medicações intracanalais à base de produtos fitoterápicos associadas a um veículo biologicamente ativo na alteração de cor na estrutura dentinária.

Este estudo teve como objetivos específicos:

Avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana de medicações intracanalais à base de extrato de semente de uva e extrato de gengibre, associadas ou não à clorexidina gel 2%, em um modelo de canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias.

Comparar, *in vitro*, a ação antimicrobiana de medicações intracanalais à base de extrato de semente de uva e extrato de gengibre, associadas ou não à clorexidina gel 2%, com a ação antimicrobiana de medicações intracanalais à base de hidróxido de cálcio, associadas ou não à clorexidina gel 2%, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias.

Abstract: Antimicrobial activity of intracanal dressings composed by natural products associated to chlorhexidine and its influence on colour change of dentinal structure

Avaliar, *in vitro*, a influência do uso de medicações intracanáis à base de extrato de semente de uva e extrato de gengibre, associadas ou não à clorexidina gel 2%, na alteração de cor da estrutura dentinária, por meio da espectrofotometria digital.

As hipóteses testadas foram:

A adição de clorexidina gel 2% promove um aumento na atividade antimicrobiana das medicações intracanáis à base de produtos fitoterápicos testados, sendo esta atividade igual ou superior às medicações intracanáis à base de hidróxido de cálcio.

O uso de medicações intracanáis à base de produtos fitoterápicos, associadas ou não a um veículo biologicamente ativo, não promove alteração de cor na estrutura dentinária.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela comissão de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo, sob o número de protocolo 735.208.

4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Obtenção e preparo das amostras

Oitenta e oito dentes unirradiculares humanos extraídos, obtidos do Biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, foram utilizados para o presente estudo. A porção coronária foi seccionada com um disco diamantado (#911H - Brasseler, Savannah, GA, Estados Unidos) em 20.000 rotações por minuto, sob constante refrigeração, de modo que os remanescentes radiculares permanecessem com um comprimento de 15 mm (Figura 1A).

Todas as raízes foram preparadas utilizando o mesmo protocolo no intuito de remover o tecido pulpar e padronizar o diâmetro do canal. O comprimento de trabalho foi estabelecido através da introdução de uma lima tipo-K nº 10 no canal radicular, até que sua ponta tenha sido visualizada no foramen apical (Figura 1B). A partir desta medida foi reduzido 1 mm, estabelecendo o comprimento de trabalho. O preparo cervical foi realizado com broca Largo número 2 (Dentsply-Maillefer,

Ballaigues, Suíça) e a ampliação apical realizada o sistema rotatório ProTaper Universal (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) (Figura 1C) seguindo a seqüência de limas SX, S1, 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). 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 para a remoção de *smear layer*, e irrigação final com água destilada estéril - 5 ml.

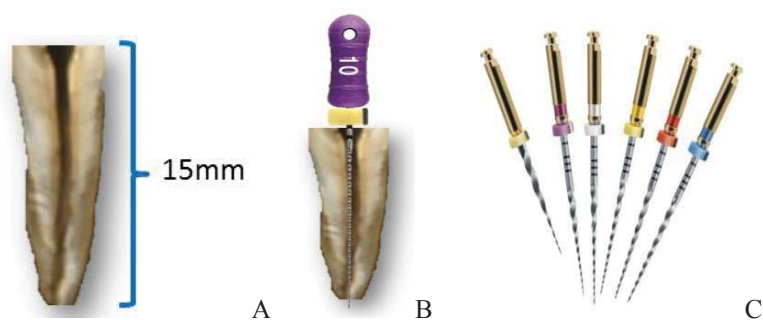


Figura 1 – Padronização das raízes. A – remanescente radicular, B – Odontometria, C – Sistema Rotatório Protaper Universal.

Após a conclusão do preparo químico-mecânico, foi realizado o vedamento do forâmen apical com resina fotopolimerizável Opallis (FGM, Joinville, SC, Brasil), para evitar o extravasamento das substâncias testadas durante o experimento. A impermeabilização externa das raízes também foi realizada através de duas aplicações de adesivo a base de cianoacrilato. (SuperBonder – Henkel, São Paulo, SP,

Brasil). Cada raiz foi fixada com silicona de condensação Putty-C para Impressão (Silon2APS - Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) em um microtubo plástico (Axygen Inc, Union City, CA, EUA), de modo que a porção cervical permanecesse posicionada para cima (Figura 2A e 2B). Os dentes foram divididos em oito grupos (n=11) e cada grupo alocado em uma caixa de polipropileno (Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, Estados Unidos) (Figura 2C) e esterilizadas à temperatura de 120°C em autoclave (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, BR) por 30 minutos.

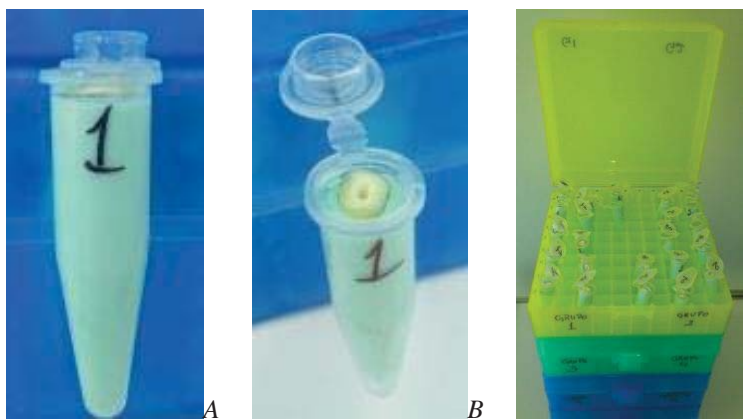


Figura 2 – Disposição das amostras. A e B – fixação das amostras impermeabilizadas em eppendorf, C – distribuição em caixa de polipropileno.

Controle de esterilização

Um dente de cada grupo foi selecionado aleatoriamente e submetido ao controle de esterilização. Cada dente selecionado foi preenchido com 2 mL de solução salina estéril (Decloquimis, São Paulo, SP, Brasil), e, após 5 minutos, um cone de papel estéril com calibre #30

(Tanari, Manaus, AM, Brasil) foi colocado em contato com as paredes do canal durante 30 segundos. Em seguida, o cone de papel foi transportado individualmente para microtubos plásticos (Axygen Inc, Union City, CA, EUA) contendo 1 ml de solução salina estéril (Decloquimis, São Paulo, SP, Brasil). O material foi homogeneizado e semeado em placas de Petri com meio de cultura PCA (Plate Count Agar) através da técnica da gota, sendo pingadas cinco gotas de 15 µL de cada amostra. As amostras foram incubadas a 37 °C durante 48h, a fim de verificar a ausência do crescimento bacteriano. As amostras que foram selecionadas para o controle de esterilização foram descartadas, restando oitenta dentes para a realização do experimento, distribuídos em oito grupos (n=10) de acordo com os protocolos testados.

Preparo do inóculo

A estirpe de referência microbiana utilizada foi *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*) (ATCC 29212), obtida no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo. As bactérias foram ativadas e cultivadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) durante 24h a 37 °C em uma estufa bacteriológica. Após o período de incubação, o grau de turbidez do inóculo foi ajustado de acordo com a escala 0,5 de McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, referente a uma absorvância de 625 nm de 0,8 a 0,10.

Contaminação dos canais radiculares

Em cada uma das 80 amostras previamente esterilizadas, foi realizada a inoculação com auxílio de micropipetas, onde uma alíquota de 100 µL do inóculo de *E.faecalis* contido no tubo de ensaio foi inserida no interior dos canais radiculares até o seu completo preenchimento (Figura 3A). A cultura de *E.faecalis* foi mantida durante 14 dias, a fim de promover o crescimento de bactérias e a formação de biofilme, renovando o caldo BHI a cada 48h. Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas em uma câmara de fluxo laminar.

A cada 48h, uma amostra de cada grupo foi escolhida aleatoriamente para ser submetida ao controle microbiano, no intuito de verificar a ausência de contaminação por outras espécies microbianas, garantindo uma cultura pura de *E.faecalis*. Um cone de papel estéril com calibre #30 (Tanari, Manaus, AM, Brasil) foi introduzido no canal radicular e mantido em contato com as paredes do canal radicular (Figura 3B), durante 30 segundos, em seguida, transferido para um microtubo de plástico estéril contendo 1 mL de solução salina estéril (Figura 3C), esse foi homogeneizado em um agitador (Figura 3D) e, então, realizada a semeadura através da técnica das gotas, sendo pingadas cinco gotas de 15 µL de cada amostra em placas de Petri contendo PCA (Figura 3E). As amostras foram incubadas a 37 °C durante 48h e, em seguida, foi realizada análise da morfologia das unidades formadoras de colônias (UFCs) (Figura 3F), bem como análise de coloração de Gram, a fim de verificar a confirmação de contaminação somente por *E.faecalis*.

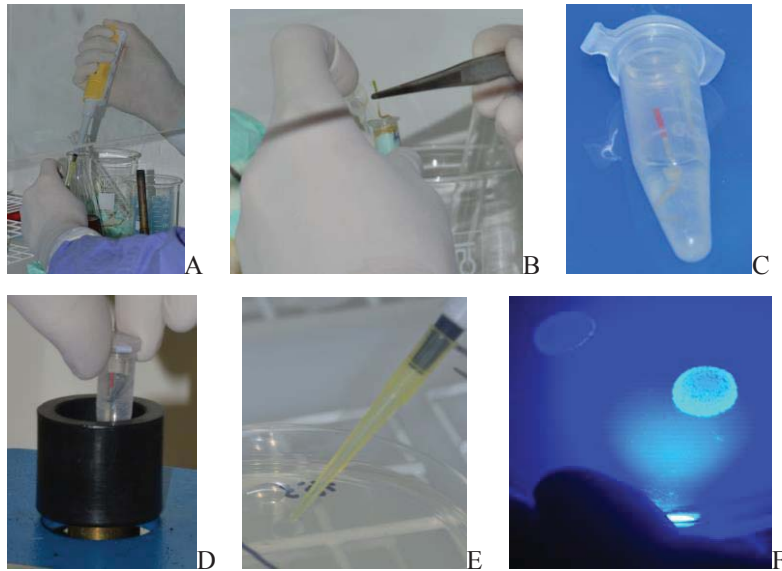


Figura 3 – Contaminação dos canais radiculares e controle de contaminação. A – contaminação dos canais radiculares, B – cone de papel em contato com as paredes do canal, C – cone de papel em 1ml de solução salina estéril, D – homogeneização em agitador, E – técnica de gotas, F – análise da morfologia.

Classificação dos grupos de tratamento

Após o período de 14 dias de contaminação com *E.faecalis*, as oitenta amostras foram irrigadas com 5 mL de água destilada estéril, aspiradas e secas com cones de papel absorvente calibre #30 (Tanari, Manaus, AM, Brasil). Em seguida, as amostras foram divididas em oito grupos (n=10), de acordo com o protocolo de medicação intracanal testado, conforme demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1: distribuição dos grupos (grupo, medicação intracanal, fabricante):

Grupo	Medicação Intracanal	Fabricante
1	Água destilada	Declomiquis, São Paulo, SP, Brasil
2	CHX gel 2%	Natupharma, Passo Fundo, RS, Brasil
3	Ca(OH) ₂ + água destilada	Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil
4	GSE + água destilada	Healthy Originis, Pittsburgh, CA, EUA
5	GE + água destilada	Apis Flora, Ribeirão Preto, SP, Brasil
6	Ca(OH) ₂ + CHX gel 2%	Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil
7	GSE + CHX gel 2%	Healthy Originis, Pittsburgh, CA, EUA
8	GE + CHX gel 2%	Apis Flora, Ribeirão Preto, SP, Brasil

* CHX = clorexidina; Ca(OH)₂ = hidróxido de cálcio; GSE = extrato de semente de uva; GE = extrato de gengibre.

Nos grupos 1 (água destilada – controle negativo) e 2 (clorexidina gel 2% - controle positivo), a medicação intracanal foi inserida com o auxílio de seringa descartável de 3 mL e agulha de calibre 30 (Navi-Tip - Ultradent, South Jordan, UT, Estados Unidos), até o completo preenchimento do canal radicular (Figura 4A).

Nos grupos 3 (Ca(OH)₂ + água destilada), 4 (GSE + água destilada) e 5 (GE + água destilada), a medicação intracanal foi obtida através da mistura de 1g da substância testada e 1 ml de água destilada, e inserida com o auxílio de um Mcspadden (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça), até o completo preenchimento do canal radicular.

Nos grupos 6 (Ca(OH)₂ + clorexidina gel 2%), 7 (GSE + clorexidina gel 2%) e 8 (GE + clorexidina gel 2%), a medicação

intracanal foi obtida através da mistura de 1g da substância testada e 1ml de clorexidina gel 2% (Figura 4B), e inserida com o auxílio de um Mcspadden (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça), até o completo preenchimento do canal radicular (Figura 4C).

Na seqüência, o vedamento do canal radicular foi realizado com cimento provisório Cavitec (Caitthec Industrial, Rio do Sul, SC) (Figura 4D), e as medicações intracanaís permaneceram no interior dos canais radiculares pelo período de 14 dias, sob armazenamento em estufa bacteriológica a 37°C.

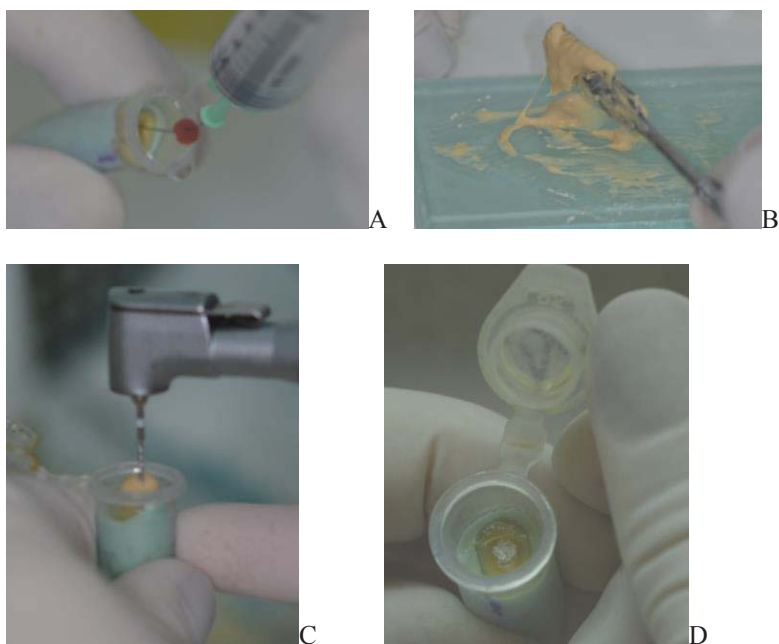


Figura 4 – Inserção e preparo das medicações intracanal. A – inserção de solução salina estéril, B – pasta de GE + CHX, C – inserção da medicação com lântulo, D – vedamento com cimento provisório.

Realização das coletas e análise microbiológica

A coleta do conteúdo microbiano do interior do canal radicular das amostras foi realizada em dois momentos. A primeira coleta (S1), foi realizada imediatamente após o período de contaminação das amostras (Figura 5A). Após o período de 14 dias de armazenamento das amostras contendo as medicações intracanaís, o selamento coronário foi removido, assim como a medicação intracanal de cada grupo, por meio de irrigação com 5 mL de água destilada, para realização da coleta final (S2).

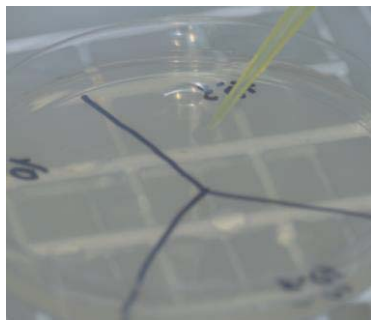
As coletas (S1 e S2) foram realizadas da mesma forma. O canal radicular foi preenchido com solução salina estéril e uma ponta de papel absorvente estéril calibre #30 foi introduzida no interior do canal radicular realizando movimentos circulares no intuito de encostar intencionalmente em todas as paredes do canal pelo período de 30 segundos (Figura 5A). Depois disso, a ponta de papel absorvente foi transferida para um microtubo contendo 1 ml de solução salina estéril. O material foi homogeneizado e diluído até 10^{-3} (Figura 5B). Alíquotas foram semeadas em placas de Petri contendo PCA através da técnica das gotas, no local correspondente da diluição utilizada (Figura 5C). As placas foram incubadas durante 48 horas a uma temperatura de 37°C. Após o período de incubação, a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi realizada (Figura 5D).



A



B



C



D

Figura 5 – Realização das coletas e análise microbiológica. A – Ponta de papel absorvente no interior do canal radicular, B – Homogeneização em agitador tipo vortex, C – técnica de gotas, D – placas com PCA após incubação.

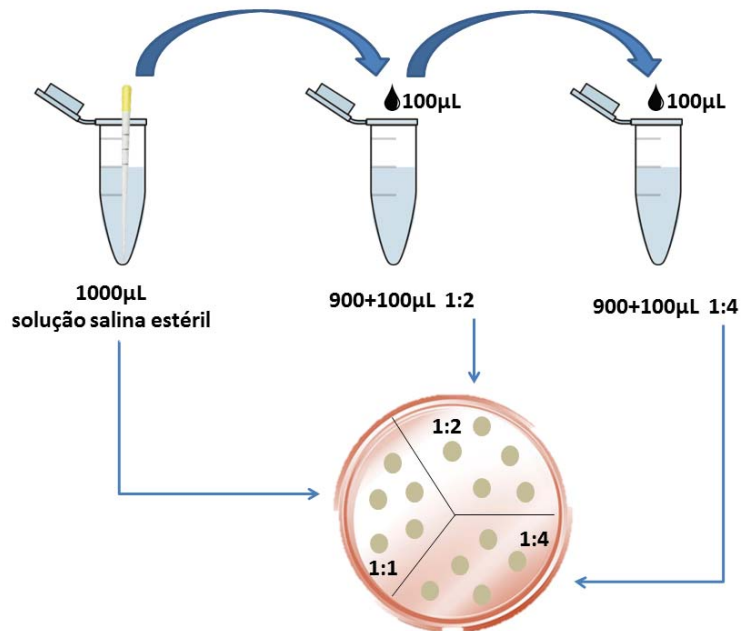


Figura 6 – Esquema das coletas microbiológicas.

4.2 Avaliação da alteração de cor

Obtenção e preparo das amostras

Oitenta dentes bovinos foram extraídos de animais abatidos para fins comerciais e utilizados para a presente dissertação. As coroas foram seccionadas na junção amelo-cementária utilizando um disco diamantado (#911H - Brasseler, Savannah, GA, Estados Unidos) em 20.000 rotações por minuto, sob constante refrigeração. A porção coronária foi fixada em bases de acrílico com o objetivo de proporcionar maior estabilidade durante o preparo das amostras, de forma que a

porção incisal ficasse voltada pra cima. A porção vestibular da coroa foi utilizada para confeccionar uma amostra por meio de cortadeira metalográfica (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) sob constante refrigeração, produzindo um bloco de medidas aproximadas de 5 mm de comprimento, 5 mm de largura e 2 milímetros espessura (Figura 7). Na sequência, foi realizado o polimento da porção vestibular com sequência de lixas até a exposição da dentina e, em seguida, os blocos com a dentina vestibular exposta foram lavados com água destilada sob agitação ultrassônica por 5 minutos para eliminar possíveis resíduos e secos com papel absorvente.

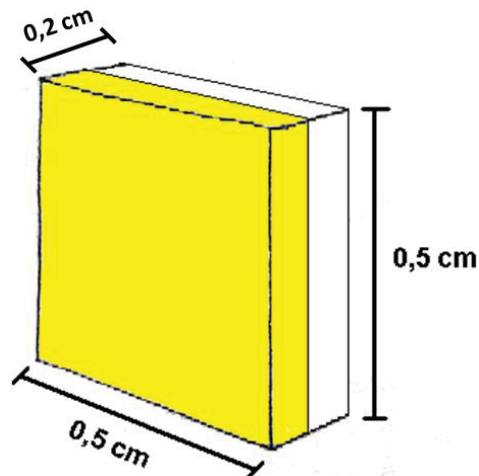


Figura 7 – Bloco produzido a partir das coroas bovinas.

Classificação dos grupos de tratamento

Os oitenta blocos com a dentina exposta foram divididos em oito grupos ($n=10$), de acordo com o protocolo de medicação intracanal em que foram imersos, conforme demonstrado anteriormente no Quadro 1.

A imersão dos blocos ocorreu em tubos de eppendorf contendo 2 ml das medicações testadas, de forma que os mesmos permanecessem completamente recobertos pela medicação (Figura 8).



Figura 8 – Bloco de dentina recoberto por medicação(GSE+CHX).

Após a imersão, os tubos de eppendorf foram colocados em caixas de polipropileno (Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, Estados Unidos) e armazenados em estufa bacteriológica pelo período de 14 dias a uma temperatura de 37°C. Após 14 dias de armazenamento, os blocos de dentina exposta foram removidos dos tubos de eppendorf, irrigados com 5 ml de água destilada e secos com papel absorvente.

Leitura da coloração da dentina

Antes e 14 dias depois da imersão dos blocos de dentina exposta nos respectivos protocolos de medicação intracanal testados, cada amostra foi avaliada em relação à coloração da dentina, utilizando um espectrofotômetro digital (Vita Easyshade Compact – Vita Zahnfabrik,

Bad Säckingen, Alemanha) (Figura 9), de forma que a ponta ativa do aparelho foi posicionada sobre o centro do bloco de dentina exposta e, a partir da leitura do aparelho, um escore de 1 (mais claro) a 16 (mais escuro) foi atribuído para cada amostra, de acordo com o guia do aparelho. A leitura antes e depois dos protocolos testados foi realizada no intuito de estabelecer uma comparação e analisar se as medicações testadas promoveriam a alteração de cor na estrutura dentinária.



Figura 9 – Aparelho Vita Easyshade Compact.

Análise estatística

Para o teste microbiológico, a análise estatística foi realizada calculando o percentual de redução de *E.faecalis* a partir da contagem inicial e contagem final de UFCs nos diferentes grupos de medicação intracanal, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Percentual de redução} = 100 - [(\text{Valor final} / \text{Valor inicial}) \times 100]$$

Após o cálculo do percentual de redução em cada amostra, Two-way ANOVA foi aplicado, seguido pelo procedimento de post hoc de

Tukey, para o estabelecimento da média do percentual de redução de *E.faecalis* de cada grupo, a 5% de nível de significância.

Para o teste de alteração de cor, a análise estatística foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Wilcoxon, seguido pelo teste de Mann-Whitney U, para o estabelecimento da mediana dos scores de alteração de cor.

Os dados, de ambos os testes, foram analisados utilizando o programa SPSS versão 17.0 (SPSS, Chicago, IL, Estados Unidos).

5. RESULTADOS

A média e o desvio padrão do percentual de redução de *E.faecalis* de cada grupo estão expressos na Tabela 1. Nenhum dos tratamentos propostos apresentou 100% de redução de *E.faecalis* após 14 dias no interior dos canais radiculares. A maior capacidade de redução bacteriana foi observada nos grupos 4 (GSE+DW), 6 (Ca(OH)₂+CHX), 7 (GSE+CHX) e 8 (GE+CHX), sem diferença estatisticamente significativa entre estes grupos ($p < 0.05$). O grupo 5 (GE+DW) foi estatisticamente superior aos grupos 1 (DW) e 3 (Ca(OH)₂+DW), porém, foi estatisticamente inferior ao grupo 2 (CHX) ($p < 0.05$).

A mediana e o valor mínimo-máximo dos scores de alteração de cor da estrutura dentinária de cada grupo estão expressos na Tabela 2. Após análise intragrupos, foi possível observar alteração de cor da estrutura dentinária nas amostras dos grupos 4 (GSE+DW), 5 (GE+DW), 7 (GSE+CHX) e 8 (GE+CHX), sendo que a mediana obtida após 14 dias de tratamento foi estatisticamente superior à obtida previamente ao tratamentos dos referidos grupos ($p < 0.05$). Após análise intergrupos, foi possível observar que, após 14 dias de tratamento, as amostras dos grupos 4 (GSE+DW) e 7 (GSE+CHX) apresentaram as maiores medianas de alteração de cor da estrutura dentinária, sendo estas medianas estatisticamente superiores às de todos os demais grupos testados ($p < 0.05$).

Tabela 1: Média (desvio padrão) do percentual de redução de *Enterococcus faecalis* (%).

Grupo	N	Redução bacteriana (%)	Valor P
1. DW ^a	10	11.72 (0.68)	P < 0.05
2. CHX ^b	10	70.83 (3.90)	P < 0.05
3. Ca(OH) ₂ +DW ^c	10	50.62 (3.33)	P < 0.05
4. GSE + DW ^d	10	96.45 (3.54)	P < 0.05
5. GE + DW ^e	10	58.79 (3.15)	P < 0.05
6. Ca(OH) ₂ +CHX ^d	10	98.69 (3.22)	P < 0.05
7. GSE + CHX ^d	10	96.93 (3.48)	P < 0.05
8. GE + CHX ^d	10	99.27 (3.74)	P < 0.05

* Letras diferentes representam diferença estatisticamente significante.

* DW= água destilada; CHX= clorexidina; Ca(OH)₂= hidróxido de cálcio; GSE= extrato de semente de uva; GE= extrato de gengibre.

Tabela 2: Mediana (mínimo-máximo) dos scores de alteração de cor para os dois períodos de observação e os grupos testados.

Grupo	N	Antes	14 dias depois
1. DW	10	1.8 (1.0-6.0) ^a	1.8 (1.0-6.0) ^{a,A}
2. CHX	10	2.0 (1.0-7.0) ^a	2.0 (1.0-3.0) ^{a,A}
3. Ca(OH) ₂ +DW	10	2.1 (1.0-7.0) ^a	2.1 (1.0-8.0) ^{a,A}
4. GSE + DW	10	1.0 (1.0-6.0) ^a	16.0 (9.0-16.0) ^{b,B}
5. GE + DW	10	2.0 (1.0-6.0) ^a	8.5 (2.0-16.0) ^{b,C}
6. Ca(OH) ₂ +CHX	10	2.0 (1.0-6.0) ^a	2.0 (2.0-8.0) ^{a,A}
7. GSE + CHX	10	1.5 (1.0-6.0) ^a	16.0 (9.0-16.0) ^{b,B}
8. GE + CHX	10	1.5 (1.0-6.0) ^a	9.0 (2.0-13.0) ^{b,C}

* Após análise intragrupos, letras minúsculas diferentes na horizontal representam diferença estatisticamente significante dos scores de cada grupo entre os dois períodos de observação. Após análise intergrupos, letras maiúsculas diferentes na vertical representam diferença estatisticamente significante entre os scores de cada grupo após 14 dias de observação.

* DW= água destilada; CHX= clorexidina; Ca(OH)₂= hidróxido de cálcio; GSE= extrato de semente de uva; GE= extrato de gengibre.

6. DISCUSSÃO

A grande maioria das alterações patológicas que acometem a polpa e, conseqüentemente, os tecidos periapicais, apresenta natureza inflamatória e etiologia microbiana (Sundqvist, 1976). Neste cenário, os microorganismos desempenham um papel fundamental na indução e, principalmente, na perpetuação destas condições patológicas (Kakehashi *et al.*, 1965). A partir do momento em que está instalado um processo de infecção nestes tecidos, torna-se necessário um adequado processo de descontaminação através do uso de substâncias dotadas de potencial antimicrobiano que irão contribuir para a limpeza do sistema de canais radiculares. Além da utilização de instrumentos endodônticos, que irão contribuir para a modelagem do espaço principal do canal radicular. Após a realização da instrumentação dos canais radiculares e obtenção do processo de sanificação do sistema de canais radiculares por meio de substâncias químicas auxiliares, medicações intracanaís e recursos auxiliares de descontaminação, a obturação tridimensional do sistema de canais radiculares (Schilder, 1974) e o adequado selamento coronário (Gillen *et al.*, 2011) também são fundamentais para o sucesso do tratamento endodôntico. 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 (Sjögren *et al.*, 1990; Gutmann, 1992).

De acordo com estudos prévios, existem algumas áreas das paredes do canal radicular principal que não são tocadas pelos instrumentos endodônticos durante a realização do preparo químico-mecânico convencional (Peters, 2004; Vaudt *et al.*, 2009). Nesse sentido, diferentes substâncias químicas auxiliares têm sido utilizadas com o propósito de realizar 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 a substância química auxiliar mais utilizada na endodontia para esse propósito, devido, principalmente, à sua atividade antimicrobiana de amplo espectro (Siqueira *et al.*, 1998; Niazi *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2014) e à sua 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 nestas regiões (George *et al.*, 2005), trazendo a necessidade da utilização de protocolos auxiliares de descontaminação, realizados após o preparo químico-mecânico convencional, tais como o uso de medicações intracanal à base de substâncias dotadas de potencial antimicrobiano.

Este estudo, entre seus objetivos, propôs avaliar a ação antimicrobiana de medicações intracanal à base de produtos fitoterápicos associadas a um veículo biologicamente ativo no combate ao *E.faecalis*. Para este propósito, os canais radiculares de todos os dentes utilizados na presente dissertação foram ampliados da mesma forma, previamente aos protocolos de contaminação e descontaminação, de forma similar a estudos prévios (de Almeida *et al.*, 2014; Ghinzelli *et*

al., 2014; Cecchin *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2016). Esta manobra foi realizada no intuito de padronizar o diâmetro dos canais radiculares e criar após a inoculação com *E.faecalis* um ambiente adequado para o crescimento bacteriano. Além do fato que a realização do preparo após a contaminação possivelmente eliminaria o conteúdo microbiano, impossibilitando a avaliação da efetividade dos protocolos de medicação intracanal testados. Além disso, a forma final obtida a partir do processo de modelagem do canal radicular em toda sua extensão garantiu que o dispositivo utilizado para inserção das medicações pudesse ser inserido sem encontrar resistência e o mais próximo possível do ápice radicular. Proporcionando um adequado preenchimento de todo o espaço dos canais radiculares com as medicações testadas.

O modelo de crescimento bacteriano adotado na presente dissertação foi baseado em estudos prévios que focaram em estratégias antimicrobianas no combate ao *E.faecalis* (de Almeida *et al.*, 2014; Ghinzelli *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2016). Este microorganismo foi escolhido devido à sua capacidade de penetrar túbulos dentinários (Ran *et al.*, 2015) e colonizar o sistema de canais radiculares por meio da formação de biofilme (Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2013). No entanto, não há consenso na literatura quanto ao período de tempo necessário para que haja a formação adequada de um biofilme bacteriano que permita testar a efetividade de protocolos de descontaminação, variando as estimativas de 24 horas (Chávez de Paz *et al.*, 2010) a 50 dias de cultura microbiana (Gründling *et al.*, 2011) para, depois desse período, os protocolos de descontaminação terem sido testados. De acordo com estudo prévio, 14 dias é um período de tempo suficiente no intuito de prover a formação de um biofilme de *E.faecalis* no substrato dentinário

(Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2013). Por essa razão, um período de cultura de 14 dias foi adotado na presente dissertação, permitindo o crescimento bacteriano e assegurando que os protocolos de descontaminação pudessem ser testados de forma adequada.

Dentes humanos extraídos foram utilizados para realizar o modelo de contaminação com *E.faecalis* na presente dissertação, 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; Gründling *et al.*, 2011; de Almeida *et al.*, 2014). 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, dentre os quais se destaca o uso de medicação intracanal (Sjögren *et al.*, 1997). O hidróxido de cálcio é a medicação intracanal mais utilizada ao longo dos anos, devido ao fato de possuir uma série de propriedades biológicas e físico-químicas que trazem benefícios ao tratamento endodôntico (Leonardo *et al.*, 2006). No entanto, estudos prévios demonstraram que o *E.faecalis* pode permanecer viável no interior dos canais radiculares após períodos de exposição ao hidróxido de cálcio (Ørstavik & Haapasalo, 1990; Siqueira

& Uzeda, 1996; Evans *et al.*, 2002; Podbielski *et al.*, 2003), trazendo a necessidade de alternativas que possam atuar como medicação intracanal e auxiliar na completa neutralização de microorganismos do interior do canal radicular. Nesse sentido, a presente dissertação propôs a utilização de produtos fitoterápicos, associados ou não à clorexidina, como alternativas ao uso do hidróxido de cálcio, sendo que o extrato de semente de uva tem demonstrado propriedades antimicrobianas (Cecchin *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2016), assim como o extrato de gengibre (Maekawa *et al.*, 2013). Além de não haver relatos na literatura sobre o uso dessas substâncias como medicação intracanal em canais radiculares infectados com *E.faecalis*.

O mecanismo de ação das medicações a base de hidróxido de cálcio é conhecido por ser dependente da dissociação de íons cálcio e hidroxila, seguida pela difusão desses íons através dos túbulos dentinários, ramificações do sistema de canais radiculares e cimento apical (Leonardo *et al.*, 2006), necessitando tempo hábil para elevação do pH e, conseqüentemente, para a inibição da atividade enzimática que é essencial pra sobrevivência bacteriana (Estrela & Pesce, 1996). Portanto, o tempo é, certamente, um fator relevante para alcançar resultados satisfatórios quando esse material é utilizado (Leonardo *et al.*, 2002). Estudos prévios reportaram que após o preenchimento do canal radicular com pasta de hidróxido de cálcio, 2 a 3 semanas são necessárias para obtenção de um pH elevado e que traga efeitos antimicrobianos desejados para essa medicação. (Nerwich *et al.*, 2002; Leonardo *et al.*, 2006; Agrafioti *et al.*, 2013). Da mesma forma, Leonardo *et al.*, 2002, reportaram que períodos iguais ou superiores a 2 semanas são necessários para que haja atividade antimicrobiana

satisfatória a partir do uso de medicações à base de hidróxido de cálcio. Por essas razões, foi adotado o período de 14 dias de permanência das medicações testadas no interior dos canais radiculares na presente dissertação, possibilitando um comparativo adequado entre as medicações à base de hidróxido de cálcio com as medicações à base de fitoterápicos, associados ou não à clorexidina.

Atualmente, diferentes testes microbiológicos são utilizados no intuito de avaliar o grau de neutralização bacteriana proporcionado por um determinado protocolo de descontaminação. A contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi utilizada para avaliar os efeitos dos tratamentos propostos na presente dissertação. 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 *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 20016) uma vez que permite, de 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, conforme descrito em estudo prévio de Souza *et al.*, 2016. 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.

De acordo com os resultados do presente estudo, nenhum dos protocolos de medicação intracanal testados apresentou a capacidade de promover a completa eliminação de *E.faecalis* do interior dos canais radiculares. Estes achados estão em acordância com estudos prévios, que também demonstraram significativa dificuldade na completa eliminação de *E.faecalis* do espaço do canal radicular a partir da utilização de diferentes protocolos de descontaminação (Ørstavik & Haapasalo, 1990; Siqueira & Uzeda, 1996; Evans *et al.*, 2002; Podbielski *et al.*, 2003; de Almeida *et al.*, 2014; Ghinzelli *et al.*, 2014; Cecchin *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2016). *E.faecalis* é um microorganismo anaeróbico facultativo que é altamente resistente às estratégias antimicrobianas e é, frequentemente, encontrado nos casos de insucesso do tratamento endodôntico (Pinheiro *et al.*, 2003). Este microorganismo apresenta diversos fatores de virulência, possui capacidade de persistir por longos períodos de tempo em ambiente com severa limitação de nutrientes (Figdor *et al.*, 2003) e coloniza o sistema de canais radiculares por meio da formação de um biofilme estruturado de difícil remoção (Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2013). Estas características podem ajudar a explicar a permanência do *E.faecalis* no interior dos canais radiculares na presente dissertação, não havendo, após a realização dos protocolos de medicação intracanal testados, a capacidade de eliminação completa deste microorganismo.

A medicação intracanal mais usualmente utilizada na endodontia é a pasta de hidróxido de cálcio, sendo aceita em razão de apresentar ação antimicrobiana, neutralizar toxinas bacterianas, ser

biocompatível com os tecidos periapicais e estimular o processo de mineralização (Leonardo *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2002; Leonardo *et al.*, 2006). A ação antimicrobiana ocorre a partir da liberação de íons hidroxila que se difundem no interior dos túbulos dentinários, atingindo níveis de pH alcalino suficientes para destruição das bactérias. Além disso, funciona como barreira física inibindo o fluxo de nutrientes e a recolonização bacteriana (Siqueira-Júnior *et al.*, 1999). No entanto, os resultados da presente dissertação demonstraram que o grupo 3 (Ca(OH)₂+DW) apresentou-se como o protocolo de medicação intracanal menos efetivo no combate ao *E.faecalis* após 14 dias no interior dos canais radiculares, sendo superior, apenas, ao grupo 1 (DW), onde nenhuma substância com potencial antimicrobiano foi utilizada. Estes resultados estão em acórdância com estudos prévios, onde a utilização da pasta de hidróxido de cálcio composta por hidróxido de cálcio pó e água destilada não demonstrou significativa efetividade na eliminação de *E.faecalis* (Ørstavik & Haapasalo, 1990; Siqueira & Uzeda, 1996; Evans *et al.*, 2002; Podbielski *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2003). Para apresentar uma ação antimicrobiana efetiva, os íons liberados pelas medicações à base de hidróxido de cálcio precisam se difundir e atingir concentrações suficientes para exercer essa função, bem como transpor barreiras físicas e biológicas como, por exemplo, o efeito tampão promovido pela dentina, tecidos remanescentes e fluidos (Haapasalo *et al.*, 2000; Portenier *et al.*, 2001). Dessa forma, o processo de neutralização de microorganismos do hidróxido de cálcio quando associado a um veículo sem propriedades antimicrobianas pode ser retardado, ajudando a explicar a baixa efetividade na redução de *E.faecalis* do interior dos canais radiculares na presente dissertação.

A clorexidina é considerada uma base forte da família das bisbiguanidas que possui propriedades catiônicas, demonstrando uma efetiva ação antimicrobiana contra patógenos endodônticos (Ferraz *et al.*, 2001). De acordo com os resultados deste estudo, a adição de clorexidina aos protocolos de medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio e extrato de gengibre, resultou em maior atividade antimicrobiana quando comparado aos mesmos protocolos sem a adição desta substância, confirmando a primeira hipótese da presente dissertação. Estes resultados estão em acordância com estudos prévios, onde a adição de clorexidina às substâncias e materiais testados resultou no aumento da ação antimicrobiana dos mesmos, resultando em maior neutralização de patógenos endodônticos (Gomes *et al.*, 2003; Bailón-Sánchez *et al.*, 2014; Niazi *et al.*, 2015). O mecanismo de ação antimicrobiana pode ser explicado pela interação entre as moléculas de clorexidina que são carregadas positivamente e a parede celular bacteriana que é carregada negativamente. A partir dessa interação, ocorre um aumento da permeabilidade da parede celular bacteriana que permite a rápida penetração de moléculas de clorexidina. Dessa forma, ocorre uma alteração no equilíbrio osmótico, resultando na precipitação do conteúdo citoplasmático e morte celular bacteriana (Ferraz *et al.*, 2001). Portanto, as propriedades antimicrobianas presentes nas medicações à base de hidróxido de cálcio e extrato de gengibre, aliadas ao elevado potencial antimicrobiano da clorexidina, pode ser a explicação para uma maior eliminação de *E.faecalis* destes protocolos, chegando muito próximo de uma sanificação completa dos canais radiculares.

Além de uma efetiva ação antimicrobiana contra patógenos endodônticos, entre os quais se incluem o *E.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.*, 2016, a clorexidina, gel e líquida, permaneceu retida na dentina radicular por até 120 dias. Ao mesmo tempo, Böttcher *et al.*, 2015, demonstraram uma redução significativa do percentual de células bacterianas viáveis de *E.faecalis* após 7 dias da utilização de clorexidina líquida 2% na dentina radicular humana. Dessa forma, o tempo de atuação prolongado a partir da substantividade da clorexidina, também pode ser a explicação para os maiores valores de eliminação de *E.faecalis* do interior dos canais radiculares quando as medicações à base de hidróxido de cálcio e extrato de gengibre foram associadas à clorexidina na presente dissertação.

Além de apresentar um elevado potencial antimicrobiano e substantividade, propriedades estas que são fundamentais para o processo de descontaminação do sistema de canais radiculares, a clorexidina apresenta ausência de citotoxicidade, não trazendo alterações inflamatórias quando extravasada para os tecidos periapicais (Ribeiro *et al.*, 2005), e não interfere na estabilidade de união entre o material restaurador e a dentina (Carrilho *et al.*, 2007), uma vez que a clorexidina inibe a ação de metaloproteinases (Breschi *et al.* 2010) e cisteínas catépsinas (Scaffa *et al.*, 2012). Estes grupos de proteínas estão diretamente envolvidos no processo de deterioração de colágeno,

interferindo de forma negativa ou prejudicial na adesão à estrutura dentinária. Portanto, a presente dissertação sugere a adição de clorexidina aos protocolos de medicação intracanal testados, não somente por aumentar a capacidade de eliminação de *E.faecalis* do interior dos canais radiculares dos mesmos, mas, também, por trazer benefícios aos procedimentos restauradores adesivos que, posteriormente, serão fundamentais para alcançar o sucesso do tratamento endodôntico realizado (Gillen *et al.*, 2011).

Os resultados da presente dissertação demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 4 (GSE+DW) e 7 (GSE+CHX) na redução de *E.faecalis* do interior dos canais radiculares, revelando que, mesmo sem a adição de um veículo com propriedades antimicrobianas, o extrato de semente de uva apresentou elevada capacidade de redução antimicrobiana quando utilizado como medicação intracanal no período de 14 dias. O extrato de semente de uva 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 pode ajudar a explicar sua efetiva capacidade de neutralização do *E.faecalis* na presente dissertação. Além disso, devido à presença de proantocianidinas na sua composição, o extrato de semente de uva interfere positivamente nas propriedades mecânicas da dentina (Cecchin *et al.*, 2015), reduz a absorção de água e estabiliza a degradação do colágeno na estrutura dentinária (Aguiar *et al.*, 2014;

Vidal *et al.*, 2014). Estas propriedades irão contribuir para a manutenção da qualidade do substrato dentinário para posterior obturação endodôntica e restauração coronária utilizando materiais resinosos, o que também traz benefícios para o sucesso do tratamento endodôntico, além da efetiva contribuição em promover a descontaminação dos canais radiculares.

Atualmente, existe um número crescente de estudos em diferentes especialidades médicas utilizando substâncias naturais e produtos fitoterápicos, tais como chás ou extratos obtidos de várias plantas. Entre os produtos fitoterápicos que são utilizados na odontologia está o extrato de gengibre, devido a sua ação cicatrizante, anti-inflamatória e antimicrobiana (Park *et al.*, 2008). De acordo com os resultados do presente estudo, o grupo 5 (GE+DW) apresentou uma capacidade de eliminação de *E.faecalis* superior ao grupo 3 (Ca(OH)₂+DW) após 14 dias de permanência no interior dos canais radiculares, sendo que esta pasta de hidróxido de cálcio é a medicação intracanal mais utilizada na terapia endodôntica ao longo dos tempos. Além disso, quando o extrato de gengibre foi associado à clorexidina gel (grupo 8), resultou na maior média de eliminação de *E.faecalis* (99.27%), destacando o seu elevado potencial de descontaminação. Estes resultados estão em acordância com estudo prévio, onde o extrato de gengibre, utilizado como medicação intracanal, apresentou efetiva redução de *E.faecalis* após 14 dias de utilização no interior dos canais radiculares (Maekawa *et al.*, 2013). No entanto, o real mecanismo de ação do extrato de gengibre não é ainda bem elucidado na literatura. Sabe-se que o *gingerol* é a principal substância ativa e é o responsável pelas propriedades benéficas deste produto (Park *et al.*, 2008), dentre as

quais se destacam a atividade antibacteriana contra patógenos endodônticos (Ruff *et al.*, 2006; Maekawa *et al.*, 2013), bem como a inibição da produção de prostaglandinas E2 e da interleucina-1 α , influenciando a resposta imunológica específica mediata, podendo ser utilizado em doenças autoimunes e inflamações crônicas (Lantz *et al.*, 2007).

A preservação da estética dentária também é um fator a ser considerado durante e após a realização do tratamento endodôntico, sendo um fator de grande importância para os pacientes, principalmente no que diz respeito à coloração das estruturas dentárias (Qualtrough & Burke, 1994). Essa coloração é influenciada por uma combinação da cor intrínseca à nível dentinário e da cor extrínseca à nível de esmalte (Joiner, 2004), sendo que a presença de agentes catiônicos, como, por exemplo, a clorexidina, ou substâncias com potencial de pigmentação, podem promover a alteração de cor da estrutura dentinária (Watts & Addy, 2001), havendo um comprometimento estético do dente submetido ao tratamento endodôntico. Além disso, a alteração de cor da estrutura dentinária pode representar a presença de uma *smear layer* química, o que promove a obliteração dos túbulos dentinários, reduz a permeabilidade dentinária (Akisue *et al.*, 2010) e reduz a resistência de união do material obturador à dentina radicular (Shahravan *et al.*, 2007). Nesse sentido, é importante que as substâncias e medicações utilizadas no processo de descontaminação do sistema de canais radiculares não promovam alteração de cor das estruturas dentárias, não somente devolvendo a função do elemento dentário, mas, também, mantendo a estética original do mesmo.

Para o teste de alteração de cor, coroas de dentes bovinos foram utilizados. Os dentes bovinos 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. Por fim, os dentes bovinos podem ser facilmente obtidos, o que justifica a utilização deste modelo na presente dissertação além do fato que a coroa de dentes humanos é muito pequena, o que poderia dificultar a confecção das amostras padronizadas para o experimento de alteração de cor (Orstavik & Haapasalo, 1990).

Diferentes métodos tem sido utilizados para avaliar a alteração de cor das estruturas dentárias a partir da utilização de variados produtos nas mesmas, variando entre a avaliação visual a partir do uso de escalas (Souza *et al.*, 2011) ou a utilização de recursos digitais (Meireles *et al.*, 2010). Na presente dissertação, o espectrofotômetro digital EasyShade foi utilizado para fazer as respectivas mensurações na estrutura dentinária, antes e após os protocolos de medicação intracanal utilizados, adotando-se a escala do guia do aparelho que varia do escore 1 (mais claro) ao escore 16 (mais escuro), em método proposto por Meireles *et al.*, 2010. De acordo com os resultados da presente dissertação, os grupos onde foram utilizados o extrato de semente de uva e o extrato de gengibre apresentaram alteração de cor da estrutura dentinária após 14 dias de contato, sendo que essa alteração de cor foi mais significativa nos grupos onde as amostras foram imersas nas medicações à base de extrato de semente de uva, contrariando a segunda hipótese da presente

dissertação. Isso pode ser explicado pela coloração escurecida desta medicação, devido à presença de taninos em sua composição (Thimote *et al.*, 2007), e pela consistência pastosa, o que facilita sua aderência à estrutura dentinária. Além disso, após os 14 dias de imersão nos protocolos de medicação intracanal testados, foi realizada somente lavagem com água destilada das amostras imersas. No caso de ter sido realizada imersão ou irrigação com agentes quelantes com capacidade de remoção de *smear layer*, os resultados poderiam ter sido diferentes e a alteração de cor poderia não ter sido tão significativa como mostraram os resultados da presente dissertação.

Além do comprometimento estético, a alteração de cor da estrutura dentinária promovida pelas medicações à base de extrato de semente de uva e extrato de gengibre pode trazer implicações à nível da estrutura dentinária, promovendo a formação de uma *smear layer* química e a, conseqüente, obliteração dos túbulos dentinários. A partir disso, pode haver redução da permeabilidade dentinária (Akisue *et al.*, 2010) e da resistência de união do material obturador à dentina radicular (Shahravan *et al.*, 2007), dificultando a realização de uma obturação adequada e comprometendo o sucesso do tratamento endodôntico. Diante do exposto, torna-se necessária a utilização de substâncias químicas auxiliares com capacidade reconhecida de remoção destes componentes da estrutura dentinária, entre as quais se destaca o EDTA 17% (Perez-Heredia *et al.*, 2008). No entanto, um período prolongado de uso deste produto pode resultar na erosão da dentina peritubular e intertubular, tornando o elemento dentário mais propenso à fratura radicular (Çalt & Serper, 2002; Niu *et al.*, 2002).

A clorexidina, como já exposto anteriormente, apresenta elevado espectro antimicrobiano (Ferraz *et al.*, 2001) e substantividade (Böttcher *et al.*, 2015), enquanto que o agente surfactante diminui a tensão superficial e aumenta a molhabilidade do produto (Giardino *et al.*, 2006), potencializando a penetração nos túbulos dentinários. Além disso, a ativação ultrassônica em associação com irrigantes finais também tem sido sugerida como alternativa para aumentar a eficiência da remoção de *smear layer* destes produtos (Blank-Gonçalves *et al.*, 2011; Arslan *et al.*, 2016). A ação do dispositivo ultrassônico induz turbulência hidrodinâmica na solução inserida no canal radicular, produzindo cavitação e bolhas que irão colidir contra as paredes dentinárias. Estes elementos aumentam a temperatura e a pressão hidrostática, produzindo ondas que irão remover os componentes aderidos à parede dentinária (Ribeiro *et al.*, 2012). Estudos adicionais são necessários para avaliar se, a partir da utilização destes protocolos de remoção de *smear layer*, a alteração de cor promovida pelas medicações à base de extrato de semente de uva e extrato de gengibre, associadas ou não à clorexidina, seria tão significativa quanto à demonstrada na presente dissertação.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados da presente dissertação, é possível concluir que:

- a adição de clorexidina gel 2% aumentou a ação antimicrobiana das medicações intracanalais à base de produtos fitoterápicos.

- o uso das medicações intracanalais à base de produtos fitoterápicos induziu alteração de cor significativa na estrutura dentinária.

Abstract: Antimicrobial activity of intracanal dressings composed by natural products associated to chlorhexidine and its influence on colour change of dentinal structure

8. REFERÊNCIAS

AGRAFIOTI, A.; TZIMPOULAS, N.E.; KONTAKIOTIS, E.G. Influence of dentin from the root canal walls and the pulp chamber floor on the pH of intracanal medicaments. *J Endod*, v. 39, n. 5, p. 701-703, 2013.

AGUIAR, T.R.; VIDAL, C.M.; PHANSALKAR, R.S.; TODOROVA, I.; NAPOLITANO, J.G.; MCALPINE, J.B. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. *J Dent Res*, v. 93, n. 4, p. 417-422, 2014.

AKISUE, E.; TOMITA, V.S.; GAVINI, G.; FIGUEIREDO, J.A.P. 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. 847-850, 2010.

AL-HABIB, A.; AL-SALEH, E.; SAFER, A.M.; AFZAL, M. Bactericidal effect of grape seed extract on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Toxicol Sci*, v. 35, n. 3, p. 357-364, 2010.

ANDREASEN, J.O.; FARIK, B.; MUNKSGAARD, E.C. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol*, v. 18, n. 3, p. 134-137, 2002.

ANTUNES, H.S.; RÔÇAS, I.N.; ALVES, F.R.; SIQUEIRA, J.F. JR. Total and Specific Bacterial Levels in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-treatment Apical Periodontitis. *J Endod*, v. 40, n. 11, p. 1778-1783, 2015.

ARIAS-MOLIZ, M.T.; ORDINOLA-ZAPATA, R.; BACA, P.; RUIZ-LINARES, M.; GARCÍA GARCÍA, E.; HUNGARO DUARTE, M.A.; MONTEIRO BRAMANTE, C.; FERRER-LUQUE, C.M. Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J*, v. 48, n. 12, p. 1188-1193, 2014.

ARSLAN, D.; GUNESER, M.B.; DINCER, A.N.; KUSTARCI, A.; ER, K.; SISO, S.H. Comparison of smear layer removal ability of QMix with different activation techniques. *J Endod*, v. 42, n. 8, p. 1279-85, 2016.

ATILA-PEKTAŞ, B.; YURDAKUL, P.; GÜLMEZ, D.; GÖRDUYSUS, O. Antimicrobial effects of root canal medicaments against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*. *Int Endod J*, v. 46, n. 5, p. 413-418, 2013.

BACA,P.; MENDOZA-LLAMAS,M.L.; ARIAS-MOLIZ, M.T.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M.P.; FERRER-LUQUE, C.M. Residual effectiveness of final irrigation regimens on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *J Endod*, v. 37, n. 8, p. 1121-1123, 2011.

BAGO, I.; PLECKO, V.; GABRIC PAUDURIC, D.; SCHAUPERL, Z.; ANIC, I. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. *Int Endod J*, v. 46, n. 4, p. 339-347, 2012.

BAILÓN-SÁNCHEZ, M.E.; BACA, P.; RUIZ-LINARES, M.; FERRER-LUQUE, M. Antibacterial and anti-biofilm activity of AH plus with chlorhexidine and cetrimide. *J Endod*, v. 40, n. 7, p. 977-981, 2014.

BEUS, C.; SAFAVI, K.; STRATTON, J.; KAUFMAN, B. 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. 1479-1483, 2012.

BLANK-GONÇALVES, L.M.; NABESHIMA, C.K.; MARTINS, G.H.; MACHADO, M.E. Qualitative analysis of the removal of the smear layer in the apical third of curved roots: conventional irrigation versus activation systems. *J Endod*, v. 37, n. 9, p. 1268-1271, 2011.

BÖTTCHER, D.E.; SEHNEM, N.T.; MONTAGNER, F.; FATTURI PAROLO, C.C.; GRECCA F.S. Evaluation of the Effect of Enterococcus faecalis Biofilm on the 2% Chlorhexidine Substantivity: An In Vitro Study. *J Endod*, v. 41, n. 8, p. 1364-1370, 2015.

BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; NATO, F.; CARRILHO, M.; VISINTINI, E.; TJÄDERHANE, L.; RUGGERI, A. J.R.; TAY, F.R.; DORIGO EDE, S.; PASHLEY, D.H. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater*, v. 26, n. 4, p. 320-325, 2010.

BROWN, C.J.; HUANG, G.; HALEY-ZITLIN, V.; JIANG, X. Antibacterial effects of grape extracts on *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol*, v. 75, n. 3, p. 848-852, 2009.

BUENING, M.K.; CHANG, R.L.; HUANG, M.T.; FORTNER, J.G.; WOOD, A.W.; CONNEY, A.H. Activation and inhibition of benzo(a)pyrene and aflatoxin B1 metabolism in human liver microsomes by naturally occurring flavonoids. *Cancer Res*, v.41, n. 1, p. 67-72, 1981.

ÇALT, S.; SERPER, A. Time-Dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod*, v. 28, n. 1, p. 17-19, 2002.

CARRILHO, M.R.; CARVALHO, R.M.; DE GOES, M.F.; DI HIPÓLITO, V.; GERALDELI, S.; PASHLEY, D.H.; TJÄDERHANE, L. Chlorhexidine preserves dentine bond in vitro. *J Dent Res*. V. 86, n. 1, p. 529-533, 2007.

CARRILHO, M.R.; CARVALHO, R.M.; SOUSA, E.N.; NICOLAU, J.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; TJÄDERHANE, L.; TAY, F.R.; AGEE, K.; PASHLEY, D.H. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater*, v. 26, n. 8, p. 779-785, 2010.

CECCHIN, D.; FARINA, A.P.; SOUZA, M.A.; ALBARELLO, L.L.; SCHNEIDER, A.P.; VIDAL, C.M.; BEDRAN-RUSSO, A.K. Evaluation of antimicrobial effectiveness and dentine mechanical properties after use of chemical and natural auxiliary irrigants. *J Dent*, v. 43, n. 6, p. 695-702, 2015.

CHÁVEZ DE PAZ, L.E. Development of a multispecies biofilm community by four root canal bacteria. *J Endod*, v. 38, n. 3, p 318-323, 2012.

CHÁVEZ DE PAZ, LE; BERGENHOLTZ, G; SVENSATER, G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod*, v. 36, n. 1, p. 70-77, 2010.

CHIVATXARANUKUL, P.; DASHPER, S.G.; MESSER, H.H. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*, v. 41, n. 10, p. 873-882, 2008.

COGULU, D.; UZEL, A.; ONCAG, O.; ERONAT, C. 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. 443-449, 2008.

D'AMATO-PALUMBO, S.; KAPLAN, A.A.; FEINN, R.S.; LALLA, R.V. 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, 2013.

DAMETTO, F.R.; FERRAZ, C.C.; GOMES, B.P.F.A.; ZAIA, A.A.; TEIXEIRA, F.B.; SOUZA-FILHO, F.J. 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. 768-772, 2005.

DE ALMEIDA, A.P.; SOUZA, M.A.; MIYAGAKI, D.C.; DAL BELLO, Y.; CECCHIN, D.; FARINA, A.P. 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. 1953-1957, 2014.

DE LUCENA, J.M.; DECKER, E.M.; WALTER, C.; BOEIRA, L.S.; PERDEU, C.; WEIGER, R. Antimicrobial effectiveness of intracanal medicaments on *Enterococcus faecalis* chlorhexidine versus octenidine. *Int Endod*, v. 46, n. 1, p 53-61, 2013.

DELGADO, R.J.; GASPAROTO, T.H.; SIPERT, C.R.; PINHEIRO, C.R.; MORAES, I.G.; GARCIA, R.B.; BRAMANTE, C.M.; CAMPANELLI, A.P.; BERNARDINELLI, N. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*, v. 36, n. 8, p. 1389-1393, 2010.

DU, T.; SHI, Q.; SHEN, Y.; CAO, Y.; MA, J.; LU, X.; XIONG, Z.; HAAPASALO, M. Effect of modified nonequilibrium plasma with chlorhexidine digluconate against endodontic biofilms in vitro. *J Endod*, v. 39, n. 11, p. 1438-1443, 2013.

DU, T.; WANG, Z.; SHEN, Y.; MA, J.; CAO, Y.; HAAPASALO, M. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod*, v. 40, n. 4, p. 509-514, 2014.

ESTRELA, C.; PESCE, H.F. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions from calcium hydroxide pastes in connective tissue in the dog--Part I. *Braz Dent J*, v. 7, n. 1, p. 41-46, 1996.

EVANS, M.; DAVIES, J.K.; SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J*, v. 35, p. 221-228, 2002.

FERRAZ, C.C.; GOMES, B.P.; ZAIA, A.A.; TEIXEIRA, F.B.; SOUZA-FILHO, F.J. 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. 452-455, 2001.

FERREIRA, N.S.; MARTINHO, F.C.; CARDOSO, F.G.; NASCIMENTO, G.G.; CARVALHO, C.A.; VALERA, M.C. Microbiological profile resistant to diferente intracanal medications in primary endodontic infections. *J Endod*, v. 41, n. 6, p. 824-830, 2015.

FIGDOR, D.; DAVIES, J.K.; SUNDQVIST, G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Molec Oral Microb*, v. 18, n. 4, p. 234-239, 2003.

FOUAD, A.F.; ZERELLA, J.; BARRY, J.; SPÅNGBERG, L.S. 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. 112-118, 2005.

FURIGA, A.; LONVAUD, 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, 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. 761-771, 2014.

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. 867-872, 2005.

GHINZELLI, G.C.; SOUZA, M.A.; CECCHIN, D.; FARINA, A.P.; DE FIGUEIREDO, J.A. Influence of ultrasonic activation on photodynamic therapy over root canal system infected with Enterococcus faecalis--an in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, v. 11, n. 4, p. 472-478, 2014.

GHONMODE, W.N.; BALSARAF, O.D.; TAMBE, V.H.; SAUJANYA, K.P.; PATIL, A.K.; KAKDE, D.D. 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. 61-66, 2013.

GILLEN, B.M.; LOONEY, S.W.; GU, L.S.; LOUSHINE, B.A.; WELLER, R.N.; LOUSHINE, R.J.; PASHLEY, D.H.; TAY, F.R. Impact of the quality of coronal restoration versus the quality of root canal fillings on success of root canal treatment: a systematic review and meta-analysis. *J Endod*, v. 27, n. 7, p. 895-902, 2011.

GOLDBERG, F.; ARTAZA, L.P.; DE, S. Influence of calcium hydroxide dressing on the obturation of simulated lateral canals. *J Endod*, v. 28, n. 2, p. 99-101, 2002.

GOMES, B.P.; PINHEIRO, E.T.; SOUSA, E.L.; JACINTO, R.C.; ZAIA, A.A.; FERRAZ, C.C.; DE SOUZA-FILHO, F.J. 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. 247-253, 2006a.

GOMES, B.P.; VIANNA, M.E.; SENA, N.T.; ZAIA, A.A.; FERRAZ, C.C.; DE SOUZA FILHO, F.J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 102, n. 4, p. 544-550, 2006b.

GOMES, B.P.; FERRAZ, C.C.; VIANNA, M.E.; BERBER, V.B.; TEIXEIRA, F.B.; SOUZA-FILHO, F.J. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of Enterococcus faecalis. *Int Endod J*, v. 34, n. 6, p. 424-428, 2001.

GOMES, B.P.; SOUZA, S.F.; FERRAZ, C.C.; TEIXEIRA, F.B.; ZAIA, A.A.; VALDRIGHI, L.; SOUZA-FILHO, F.J. 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. 267-275, 2003.

GRÜNDLING, GL; ZECHIN, JG; JARDIM, WM; DE OLIVEIRA, SD; DE FIGUEIREDO, JA. Effect of ultrasonics on Enterococcus faecalis biofilm in a bovine tooth model. *Journal of Endodontics*, v. 37, n.8, p.1128-1133, 2011.

GUERREIRO-TANOMARU, J.M.; DE FARIA-JÚNIOR, N.B.; DUARTE, M.A.; ORDINOLA-ZAPATA, R.; GRAEFF, M.S.; TANOMARU-FILHO, M. Comparative analysis of Enterococcus faecalis biofilm formation on different substrates. *J Endod*, v. 39, n. 3, p. 346-350, 2013.

GUTMANN, J.L. Clinical, radiographic, and histologic perspectives on success and failure in endodontics. *Dent Clin North Am*, v. 36, n. 2, p. 379-392, 1992.

HAAPASALO, H.K.; SIRÉN, E.K.; WALTIMO, T.M.; ØRSTAVIK D, HAAPASALO MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J*, v. 33, n. 2, p. 126-131, 2000.

HOUDE, V.; GRENIÉ, D.; CHANDAD, F. Protective effects of grape seed proanthocyanidins against oxidative stress induced by lipopolysaccharides of periodontopathogens. *J Periodontol*, v. 77, n. 8, p. 1371-1379, 2006.

JAIN, I.; JAIN, P.; BISHT, D.; SHARMA, A.; SRIVASTAVA, B.; GUPTA, N. Comparative Evaluation of Antibacterial Efficacy of Six Indian Plant Extracts against Streptococcus Mutans. *J Clin Diagn Res*, v. 9, n. 2, p. 50-53, 2015a.

JAIN, I.; JAIN, P.; BISHT, D.; SHARMA, A.; SRIVASTAVA, B.; GUPTA, N. Use of traditional Indian plants in the inhibition of caries-causing bacteria--Streptococcus mutans. *Braz Dent J*, v. 26, n. 2, p. 110-115, 2015b.

JOINER, A. Tooth colour: a review of the literature. *J Dent*, v.32, n. 1, p. 3-12, 2004.

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, n. 3, p. 340-349, 1965.

KANDASWAMY, D.; VENKATESHBABU, N.; GOGULNATH, D.; KINDO, A.J. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *Int Endod J*, v. 43, n. 5, p. 419-423, 2010.

KAO, T.T.; TU, H.C.; CHANG, W.N.; CHEN, B.H.; SHI, Y.Y.; CHANG, T.C.; FU, T.F. 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, p. 17-27, 2010.

KONTAKIOTIS, E.G.; TSATSOULIS, I.N.; PAPANAKOU, S.I.; TZANETAKIS, G.N. Effect of 2% chlorhexidine gel mixed with calcium hydroxide as an intracanal medication on sealing of permanent root canal filling: a 6-month follow-up. *J Endod*, v. 34, n. 7, p. 866-870, 2008.

LANTZ, R.C.; CHEN, G.J.; SARIHAN, M.; SÓLYOM, A.M.; JOLAD, S.D.; TIMMERMAN, B.N. The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production. *Phytomedicine*, v. 14, n. 3, p. 123-128, 2007.

LEONARDO, M.R.; SILVEIRA, F.F.; SILVA, L.A.B.; TANOMARU FILHO, M.; UTRILLA, L.S. Calcium hydroxide root canal dressing. Histopathologic evaluation of periapical repair at different time periods. *Braz Dent J*, v. 13, n. 1, p. 17-22, 2002.

LEONARDO, M.R.; ALMEIDA, W.A.; ITO, I.Y.; SILVA, L.A.B. Radiographic and microbiologic evaluation of posttreatment apical and periapical repair of root canals of dogs teeth with experimentally induced chronic lesion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 78, n. 2, p. 232-238, 1994.

LEONARDO, M.R.; HERNANDEZ, M.E.; SILVA, L.A.; TANOMARU-FILHO, M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 102, n. 5, p. 680-685, 2006.

LIAPATAS, S.; NAKOU, M.; RONTOGIANNI, D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J*, v. 36, n. 7, p. 464-471, 2003.

LIMA, R.K.; GUERREIRO-TANOMARU, J.M.; FARIA-JÚNIOR, N.B.; TANOMARU-FILHO, M. Effectiveness of calcium hydroxide based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*, v. 45, n. 4, p. 311-316, 2012.

MAEKAWA, L.E.; VALERA, M.C.; OLIVEIRA, L.D.; CARVALHO, C.A.; CAMARGO, C.H.; JORGE, A.O. Effect of *Zingiber officinale* and propolis on microorganisms and endotoxins in root canals. *J Appl Oral Sci*, v. 21, n. 1, p. 25-31, 2013.

MAGESHWARAN,T.; EBENEZAR, .R.; MADHANAMADHUBALA, M.; KAVITHA, S.; MAHALAXMI, S. Counteraction of reactive oxygen species and determination of antibacterial efficacy of proanthocyanidin and lycopene when mixed with calcium hydroxide and chlorhexidine mixture: An in vitro comparative study. *J Conserv Dent*, v. 15, n. 4, p. 337-341, 2012.

MARTÓN, I.J.; KISS, C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, v. 15, n. 3, p. 139-150, 2000.

MENEZES, M.M.; VALERA, M.C.; JORGE, A.O.C.; KOGA-ITO, C.Y.; CAMARGO, C.H.R.; MANCINI, M.N.G. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J*, v. 37, n. 5, p. 311-319, 2004.

MURAD, C.F.; SASSONE, L.M.; FAVERI, M.; HIRATA, R. JR.; FIGUEIREDO, L.; FERES, M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Endod*, v. 40, n. 7, p. 899-906, 2014.

NASSAN, M.A.; MOHAMED, E.H. Immunopathological and antimicrobial effect of black pepper, ginger and thyme extracts on experimental model of acute hematogenous pyelonephritis in albino rats. *Int J Immunopathol Pharmacol*, v. 27, n. 4, p. 531-541, 2014.

NERWICH, A.; FIGDOR, D.; ENDO, D.; MESSER, H.H. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod*, v. 19, n. 6, p. 302-306, 2002.

NIAZI, S.A.; CLARK, D.; DO, T.; GILBERT, S.C.; FOSCHI, F.; MANNOCCI, F.; BEIGHTON, D. The effectiveness of enzymic irrigation in removing a nutrient-stressed endodontic multispecies biofilm. *Int Endod J*, v. 47, n.8, p. 756-768, 2014a.

NIAZI, S.A.; AL-ALI, W.M.; PATEL, S.; FOSCHI, F.; MANNOCCI, F. Synergistic effect of 2% chlorhexidine combined with proteolytic enzymes on biofilm disruption and killing. *Int Endod J*, v. 48, n. 12, p. 1157-1167, 2014b.

NIU, W.; YOSHIOKA, T.; KOBAYASHI, C.; SUDA, H. A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. *Int Endod J*, v. 35, n. 11, p. 934-939, 2002.

OKINO, L.A.; SIQUEIRA, E.L.; SANTOS, M.; BOMBANA, A.C.; FIGUEIREDO, J.A. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J*, v. 37, n. 1, p. 38-41, 2004.

OLIVEIRA, L.D.; CARVALHO, C.A.; CARVALHO, A.S.; ALVES JDE, S.; VALERA M.C.; JORGE, A.O. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. *J Endod*, v. 38, n. 8, p. 1053-1057, 2012.

ORSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol*, v. 6, n. 4, p. 142-149, 1990.

PAN, J.; SUN, K.; LIANG, Y.; SUN, P.; YANG, X.; WANG, J.; ZHANG, J.; ZHU, W.; FANG, J.; BECKER, K.H. Cold plasma therapy of a tooth root canal infected with enterococcus faecalis biofilms in vitro. *J Endod*, v. 39, n. 1, p. 105-110, 2013.

PARK M, BAE J, LEE DS. Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria. *Phytother Res*, v. 22, n. 11p. 1446-1449, 2008.

PAVASKAR, R.; DE ATAIDE IDE, N.; CHALAKKAL, P.; PINTO, M.J.; FERNANDES, K.S.; KENY, R.V.; KAMATH, A. An in vitro study comparing the intracanal effectiveness of calcium hydroxide- and linezolid-based medicaments against Enterococcus faecalis. *J Endod*, v. 38, n. 1, p. 95-100, 2012.

PEREZ-HEREDIA, M.; FERRER-LUQUE, C.M.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M.P.; MARTIN-PEINADO, F.J.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, S. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. *Int Endod J*, v. 41, n. 5, p. 418-423, 2008.

PETERS, O.A. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. *J Endod*, v. 30, n. 6, p. 559-567, 2004.

PINHEIRO, E.T.; GOMES, B.P.F.A.; FERRAZ, C.C.R.; SOUSA, E.L.R.; TEIXEIRA, F.B.; SOUZA-FILHO, F.J. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2003.

PODBIELSKI, A.; SPAHR, A.; HALLER, B. Additive antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on common endodontic bacterial pathogens. *J Endod*, v. 29, n. 5, p. 340-345, 2003.

PORTENIER, I.; HAAPASALO, H.; RYE, A.; WALTINO, T.; ORSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J*, v. 34, n. 3, p. 184-188, 2001.

PRABHAKAR, J.; SENTHILKUMAR, M.; PRIVA, M.S.; MAHALAKSHMI, K.; SEHGAL, P.K.; SUKUMARAN, V.G.; Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: an in vitro study. *J Endod*, v.36, n.1, p.83-86, 2010.

QUALTROUGH AJE, BURKE FJT. A look at dental esthetics. *Quintessence Int*, v. 25, n. 1, p. 7-14, 1994.

RAN, S.; WANG, J.; JIANG, W.; ZHU, C.; LIANG, J. Assessment of dentinal tubule invasion capacity of *Enterococcus faecalis* under stress conditions ex vivo. *Int Endod J*, v. 48, n. 4, p. 362-372, 2015.

RASIMICK, B.J.; WAN, J.; MUSIKANT, B.L.; DEUTSCH, A.S. Stability of doxycycline and chlorhexidine absorbed in root canal dentin. *J Endod*, v. 36, n. 3, p. 489-492, 2010.

REVATI, S.; BIPIN, C.; CHITRA, P.B.; MINAKSHI, B. In vitro antibacterial activity of seven Indian spices against high level gentamicin resistant strains of enterococci. *Arch Med Sci*, v. 12, n. 4, p. 863-868, 2015.

RIBEIRO, D.A.; SCOLASTICI, C.; DE ALMEIDA, P.L.A.; MARQUES, P.L.A.; MARQUES, M.E.A.; SAVADORI, M.F. Genotoxicity of antimicrobial compounds by single cell gel assay in Chinese hamster ovary cells. *Oral Sug Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod*, v. 99, n.5 p. 637-640, 2005.

RIBEIRO, E.M.; SILVA-SOUSA, Y.T.; SOUZA-GABRIEL, A.E.; SOUSA-NETO, M.D.; LORENCETTI, K.T.; SILVA, S.R. Debris and smear removal in flattened root canals after use of different irrigant agitation protocols. *Microsc Res Tech*, v. 75, n. 6, p. 781-790, 2012.

RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F. JR. In vivo antimicrobial effects of endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic techniques. *J Endod*, v. 37, n. 3, p. 304-310, 2011.

RUFF, M. L.; MCCLANABAN, S. B.; BABEL, B. S. In vitro antifungal efficacy of four irrigants as a final rinse. *J Endod*, v. 32, n. 4, p. 331-333, 2006.

SASSONE, L.M.; FIDEL, R.; FAVERI, M.; FIDEL, S.; FIGUEIREDO, L.; FERES, M. Microbiological evaluation of primary endodontic infections in teeth with and without sinus tract. *Int Endod J*, v. 41, n. 6, p. 508-515, 2008.

SCAFFA, P.M.; VIDAL, C.M.; BARROS, N.; GESTEIRA, T.F.; CARMONA, A.K.; BRESCHI, L.; PASHLEY, D.H.; TJÄDERHANE, L, TERSARIOL, I,L, NASCIMENTO, F.D.; CARRILHO, M.R. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *J Dent Res*, v. 91, n. 4, p. 420-425, 2012.

SCHILDER, H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am*, v. 18, n. 2, p. 269-296, 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. 735-742, 2005.

SHAHRAVAN, A.; HAGHDOOST, A.A.; ADL, A.; RAHIMI, H.; SHADIFAR, F. Effect of smear layer on sealing ability of canal obturation: a systematic review and meta-analysis. *J Endod*, v. 33, n. 2, p. 96-105, 2007.

SILVA, A.P.; GONÇALVES, R.S.; BORGES, A.F.; BEDRAN-RUSSO, A.K.; SHINOHARA, M.S. Effectiveness of plant-derived proanthocyanidins on demineralization on enamel and dentin under artificial cariogenic challenge. *J Appl Oral Sci*, v. 23, n. 3, p. 302-309, 2015.

SILVA, L.A.B.; NELSON-FILHO, P.; LEONARDO, M.R.; ROSSI, M.A.; PANSANI, C.A. Effect of a calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vitro. *J Endod*, v. 28, p. 94-98, 2002.

SIQUEIRA, J.F., JR.; BATISTA, M.M.; FRAGA, R.C.; DE UZEDA, M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod*, v. 24, n. 6, p. 414-416, 1998.

SIQUEIRA, J.F.; UZEDA, M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod*, v. 22, n. 12, p. 674-676, 1996.

SIQUEIRA-JÚNIOR, J.F.; LOPES, H.P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*, v. 32, p. 361-369, 1999.

SJÖGREN, U.; FIGDOR, D.; PERSSON, S.; SUNDQVIST, G. Influence of the infection at the time of root filling on the outcome of the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*, v. 30, n. 5, p. 297-306, 1997.

SJÖGREN, U.; HÄGGLUND, B.; SUNDQVIST, G.; WING, K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod*, v. 16, n. 10, p. 498-504, 1990.

SOARES ADE, J.; LINS, F.F.; NAGATA, J.Y.; GOMES, B.P.; ZAIA, A.A.; FERRAZ, C.C.; DE ALMEIDA, J.F.; DE SOUZA-FILHO, F.J. Pulp revascularization after root canal decontamination with calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel. *J Endod*, v. 39, n. 3, p. 417-420, 2013.

SOUZA, M.A.; DALLA-LANA, D.; GABRIELLI, E.; BARBOSA-RIBEIRO, M.; MIYAGAKI, D.C.; CECCHIN, D. Effectiveness of final decontamination protocols against *Enterococcus faecalis* and its influence on bond strength of filling material to root canal dentin. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, v. 17, p. 92-97, 2016

SOUZA, M.A.; MONTAGNER, A.; LANA, D.L.; VIDAL, C.M.; FARINA, A.P.; CECCHIN, D. Comparative evaluation of the retaining of QMix and chlorhexidine formulations on human dentin: a chemical analysis. *Clin Oral Investig*, v. 21, n. 3, p. 873-878, 2016.

SOUZA, M.; CECCHIN, D.; FARINA, A.P.; LEITE, C.E.; CRUZ, F.F.; PEREIRA, C.D.A. C.; FERRAZ, C.C.; FIGUEIREDO, J.A. Evaluation of chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. *J Endod*, v. 38, n. 9, p. 1249-1252, 2012.

SUNDQVIST, G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. 1976. 93 f. Dissertations (Endodontic Microbiology) - University of Umea, 1976.

TANOMARU FILHO, M.; LEONARDO, M.R.; DA SILVA, L.A. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *J Endod*, v. 28, n. 4, p. 295-299, 2002.

TANOMARU, J.M.; LEONARDO, M.R.; TANOMARU FILHO, M.; BONETTI FILHO, I.; SILVA, L.A. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J*, v. 36, n. 11, p. 733-739, 2003.

TENNERT, C.; FUHRMANN, M.; WITTMER, A.; KARYGIANNI, L.; ALTENBURGER, M.J.; PELZ, K.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod*, v. 40, n. 5, p. 670-677, 2014.

THIMOTHE, J.; BONSI, I.A.; PADILLA-ZAKOUR, O.I.; KOOH, H. 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. 12, n. 25, p. 10200–10207, 2007.

VALERA, M.C.; MAEKAWA, L.E.; CHUNG, A.; CARDOSO, F.G.; OLIVEIRA, L.D.; CARVALAHO, C.A. The effect of sodium hypochlorite and ginger extract on microorganisms and endotoxins endodontic treatment of infected root canals. *Gen Dent*, v. 62, n. 3, p. 25-29, 2014.

VALERA, M.C.; MAEKAWA, L.E.; OLIVEIRA, L.D.; JORGE, A.O.; SHYGEI, É.; CARVALHO, C.A. In vitro antimicrobial activity of auxiliary chemical substances and natural extracts on *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Appl Oral Sci*, v. 21, n. 2, p. 118-123, 2013.

VAN DER WAAL, S.V.; CONNERT, T.; CRIELAARD, W.; DE SOET, J.J. In mixed biofilms *Enterococcus faecalis* benefits from a calcium hydroxide challenge and culturing. *Int Endod J*, v. 49, n. 9, p. 865-873 2015.

VAUDT, J.; BITTER, K.; NEUMANN, K.; KIELBASSA, A.M. 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, 2009.

VENGERFELDT, V.; ŠPILKA, K.; SAAG, M.; PREEM, J.K.; OOPKAUP, K.; TRUU, J.; MÄNDAR, R. Highly diverse microbiota in dental root canals in cases of apical periodontitis (data of illumina sequencing). *J Endod*, v. 40, n. 11, p. 1778-1783, 2014.

VIDAL, C.M.; AGUIAR, T.R.; PHANSALKAR, R.; MCALPINE, J.B.; NAPOLITANO, J.G.; CHEN, S.N.; ARAÚJO, L.S.; PAULI, G.F.; BEDRAN-RUSSO, A. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. *Acta Biomater*, v. 10, n. 7, p. 3288–3294, 2014.

WAGNER, C.; BARTH, V.C. JR.; DE OLIVEIRA, S.D.; CAMPOS, M.M. Effectiveness of the proton pump inhibitor omeprazole associated with calcium hydroxide as intracanal medication: an in vivo study. *J Endod*, v. 37, n. 9, p. 1253-1257, 2011.

WALTER, R.; MIGUEZ, P.A.; ARNOLD, R.R.; PEREIRA, P.N.; DUARTE, W.R.; YAMAUCHI, M. Effects of natural cross-linkers on the stability of dentin collagen and the inhibition of root caries in vitro. *Caries Res*, v. 42, n. 4, p. 263-268, 2008.

WATTS A, ADDY M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *Br Dent J*, v. 190, n. 6, p. 309–316, 2001.

WILSON, C.E.; CATHRO, P.C.; ROGERS, A.H.; BRIGGS, N.; ZILM, P.S. Clonal diversity in biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in response to environmental stress associated with endodontic irrigants and medicaments. *Int Endod J*, v. 48, n. 3, p. 210-219, 2015.

XIE, Q.; BEDRAN-RUSSO, A.K.; WU, C.D. In vitro remineralization effects of grape seed extract on artificial root caries. *J Dent*, v. 36, n. 11, p. 900-906, 2008.

ZHAO, W.; XIE, Q.; BEDRAN-RUSSO, A.K.; PAN, S.; LING, J.; WU, C.D. The preventive effect of grape seed extract on artificial enamel caries progression in a microbial biofilm-induced caries model. *J Dent*, v. 42, n. 8, p. 1010-1018, 2014.

ZHU, X.; WANG, Q.; ZHANG, C.; CHEUNG, G.S.; SHEN, Y. 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. 1950-1955, 2010.

**Antimicrobial activity of intracanal dressings composed
by natural products associated to chlorhexidine and its
influence on colour change of dentinal structure**

Matheus Albino Souza^{*}, Huriel Scartazzini Palhano^a,
Bárbara Facco Rauber^a, Lourenço Luís Albarello^a,
Guilherme Lima^a, Bianca Pazinato^a, Karolina Frick
Bischoff^a, Douglas Cecchin^a

^a School of Dentistry, University of Passo Fundo, Passo
Fundo, RS, Brazil.

Corresponding Author: Matheus Albino Souza, Post-
Graduate Program in Dentistry, University of Passo Fundo,
BR 285/São José, Building A7, Suite 2, Zip code: 99052-
900, Passo Fundo-RS-Brazil. Telephone: +55 54 3316-8402.
E-mail: matheus292@yahoo.com.br or
matheussouza@upf.br

ABSTRACT

Background: there are a growing number of studies using natural substances due its antimicrobial potential, such as grape seed extract (GSE) and ginger extract (GE). However, little information is available from previous studies regarding its antimicrobial activity against endodontic microbiota and influence on colour changes of dentinal structure.

Purpose: The aim of the present study was to evaluate the antimicrobial activity of intracanal dressings composed of natural products and chlorhexidine *in vitro* and their influence on colour changes of the dentinal structure.

Methods: the root canals of 80 human extracted teeth were inoculated with *Enterococcus faecalis* and divided into eight groups (n=10) according to the intracanal dressing protocol: G1 – distilled water (DW); G2 – 2% chlorhexidine gel (CHX); G3 – calcium hydroxide (Ca[OH]₂)+DW; G4 – grape seed extract (GSE)+DW; G5 – ginger extract (GE)+DW; G6 – Ca(OH)₂+CHX; G7 – GSE+CHX; and G8 – GE+CHX. The intracanal dressings remained in the root canals for 14 days. Microbiological tests (CFU-counting)

were performed to evaluate the effectiveness of the proposed treatments. Data were subjected to one-way ANOVA followed by the post-hoc Tukey test ($\alpha=0.05$). Eighty dentin blocks were made from the remaining crowns and submitted to the reading of dentinal coloration using a digital spectrophotometer after immersion in the previously described intracanal dressing protocols. Data were subjected to non-parametric Wilcoxon test, followed by Mann-Whitney-U test ($\alpha=0.05$).

Results: the highest ability to promote bacterial reduction was observed in groups 4 (GSE+DW), 6 (Ca(OH)_2 +CHX), 7 (GSE+CHX) and 8 (GE+CHX), with no statistically significant difference between them ($p<0.05$). Furthermore, samples of groups 4 (GSE+DW) and 7 (GSE+CHX) have shown the highest medians of colour change of the dentinal structure, statistically higher than all other groups ($p<0.05$).

Conclusions: the addition of 2% chlorhexidine gel improved the antimicrobial activity of GE-based intracanal dressing whereas its addition did not improve the antimicrobial activity of GSE-based intracanal dressing; moreover, these protocols induced significant colour changes in the dentinal structure.

Key-words: calcium hydroxide, colour change, chlorhexidine, *Enterococcus faecalis*, ginger extract, grape seed extract.

ABBREVIATIONS

- Ca(OH)_2 – calcium hydroxide
- CHX – chlorhexidine
- GSE – grape seed extract
- GE – ginger extract
- DW – distilled water
- *E.faecalis* – *Enterococcus faecalis*
- S1 – initial sample
- S2 – final sample
- CFUs – colony forming units

INTRODUCTION

The pathological changes affecting pulp and periapical tissues present microbial aetiology, exerting a significant role in the induction and progression of these conditions (Takehashi et al., 1966). Thus, one of the main goals of endodontic therapy is to perform adequate cleaning of the root canal system, with the use of chemical auxiliary substances being necessary to promote bacterial elimination. However, due to anatomical complexity of the root canal system, some bacteria cannot always be reached (George et al., 2005). Therefore, auxiliary decontamination protocols after conventional chemomechanical preparation, such as intracanal dressings, are necessary to reduce the bacterial load from root canals. Moreover, the maintenance of dental aesthetics during and after endodontic treatment is also a factor which must be taken into consideration, as it is a factor of great importance for patients, especially regarding the colouration of dental structures (Qualtrough and Burke, 1994).

Calcium hydroxide ($\text{Ca}[\text{OH}]_2$) is one of the most frequently used intracanal dressings in endodontics, due to its ability to neutralise endotoxins, and its biocompatibility and ability to induce mineralisation on periapical tissues

(Leonardo et al., 2006). Furthermore, Ca(OH)₂-based intracanal dressings act as physical barrier, inhibiting the flow of nutrients and bacterial recolonisation (Siqueira et al., 1999). However, microorganisms such as *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) have demonstrated some resistance to Ca(OH)₂ (Sathorn et al., 2007). Since reducing the bacterial content in an infected root canal is important for the success of endodontic therapy (Sjögren et al., 1997), it is important to identify new alternatives that contribute in a better way to the decontamination process of root canal system.

Currently, the addition of chemical substances with antimicrobial potential to intracanal dressings represents a strategy in order to improve the decontamination of root canals (Gomes et al., 2006). Among these substances is chlorhexidine (CHX), due its broad antimicrobial spectrum (Dametto et al., 2005) and substantivity (Böttcher et al., 2015). Furthermore, there are a growing number of studies using natural substances, since the literature has shown antimicrobial potential for these substances, such as grape seed extract (GSE) (Cecchin et al., 2015) and ginger extract (GE) (Maekawa et al., 2013). However, there are no studies in the literature relating the association of chlorhexidine to

natural products in order to promote the better elimination of bacteria from root canals and the consequences in the dentinal structure regarding to colour change.

The purpose of the present study was to evaluate, *in vitro*, the antimicrobial activity of intracanal dressings composed by natural products associated with chlorhexidine and its influence on colour changes in the dentinal structure. The tested hypotheses were that the addition of chlorhexidine to tested intracanal dressings composed of natural products will result in the better decontamination of root canals and that its use will not result in colour changes of the dentinal structure.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Ethics Commission of the School of Dentistry of the University of Passo Fundo (Passo Fundo, RS, Brazil), under protocol 735.208.

Evaluation of antimicrobial activity

Sample obtaining and preparation

Eighty single-rooted human extracted teeth were used in the present study. All teeth were obtained from the Biobank of the School of Dentistry of University of Passo Fundo (Passo Fundo, RS, Brazil). Dental crowns were sectioned with a rotating diamond saw, so that all roots retained a length of 15 mm.

The cervical third was prepared using the Largo drill #3 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland). The working length established was 1 mm shorter than the apex (14 mm). The roots were enlarged at a working length using ProTaper system (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland), following the sequence S1 to F3. Then, 2.5% NaOCl (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brazil) was used as an irrigant and was renewed with each change of instrument. After chemomechanical preparation, irrigation with 5 mL of DW (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brazil), was performed followed by irrigation with 3 mL of 17% EDTA (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brazil) for 1 minute. After that, the root canals were irrigated with 5 mL of DW once again and dried with absorbent paper points.

Culture and inoculum preparation

Each root was fixed with Putty-C Silicone for Impression (Silon2APS – Dentsply, Petrópolis, RJ, Brazil) in a plastic micro-tube (Axygen Inc., Union City, CA, USA), so that it remained upright with the cervical portion facing upwards. The roots were randomly divided into eight groups (n=10) and each group was placed in a polypropylene box (Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, United States). The roots were sterilised at 120°C in autoclave (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brazil) for 30 minutes.

The reference strain was *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (ATCC 19433). The bacteria were cultivated in brain-heart infusion (BHI) broth for 18 to 24 h at 37°C in a bacteriological incubator. A 100-µL aliquot of the culture of *E. faecalis* was inoculated into the root canal of each of the 50 previously sterilised roots. After this procedure, the remaining volume of the root canal was completely filled with sterile BHI. The culture of *E. faecalis* was maintained for 14 days in order to promote bacterial growth, replacing

the BHI every 48 h. All procedures were performed under aseptic conditions in a laminar flow hood.

Classification of treatment groups

After contamination, the 80 samples were irrigated with 5 mL of DW and randomly distributed into eight groups (n=10) according to the tested intracanal dressing protocol.

In groups 1 (DW) and 2 (CHX), the intracanal dressing was inserted with a 3 mL disposable syringe (Descarpack, São Paulo, SP, Brazil) and a 30 gauge needle (Navi-Tip - Ultradent, South Jordan, UT, Estados Unidos), until the root canal was completely filled.

In groups 3 (Ca[OH]₂+DW), 4 (GSE+DW) and 5 (GE+DW), the intracanal dressing was obtained from mixing 1g of the tested substance and 1 ml of DW. After that, the root canals of each group were completely filled with the respective intracanal dressing with a Lentulo drill (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland) placed 3 mm short to working length.

In groups 6 (Ca[OH]₂+CHX), 7 (GSE+CHX) and 8 (GE+CHX), the intracanal dressed was obtained from

mixing 1g of tested substance and 1 ml of 2% CHX. After that, the root canals of each group were completely filled with the respective intracanal dressing in the same way as that described in groups 3, 4 and 5.

Following this, sealing of the root canal was performed with provisional restorative material (Cavitec – Caittheç Industrial, Rio do Sul, SC, Brazil) and the intracanal dressings remained in the root canals for 14 days, under storage in a bacteriological oven at a temperature of 37°C and under humidity.

Microbiological analysis

The microbiological analysis was performed in two stages. The sample collected immediately after contamination with *E. faecalis* and before intracanal dressing protocols was called the initial sample (S1). After 14 days of storage, the sealing was removed and irrigation with 5ml of DW was performed in order to remove the intracanal dressing of each group. Then, the final sample (S2) was collected.

The root canal of each sample was filled with sterile saline solution in both stages. Then, a sterile K-file #30 (Dentsply-Maillefer) was inserted into the root canal, promoting agitation of the solution and contact with the root canal walls for 30 seconds. A sterile absorbent paper point with the same calibre was inserted into the filled root canal and agitated in a circumferential way with intentional contact with the walls for 30 seconds. Then, the absorbent paper point was transferred to a tube containing 450µL of sterile saline solution at 0.85%. The material was homogenised and diluted to 1×10^{-3} . Aliquots of 100µL of solution and each of the dilutions were cultivated on the surface of blood agar in duplicate; these samples were incubated for 18-24 h at 37°C. After the incubation period, the number of colony-forming units (CFUs) was counted on the plates.

The effectiveness of each intracanal dressing protocol was analysed by calculating the percentage reduction of *E. faecalis* from the initial (S1) and final (S2) counting of colony forming units (CFUs), establishing a percentage reduction value for each sample in the different groups.

Evaluation of colour change

Sample obtaining and preparation

The remaining eighty dental crowns which were separated from the roots used in the previous antimicrobial test were used in this part of study. The buccal portions of the crowns were used to make one sample by cutting using cooled water in a metallographic sectioning machine (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA), producing blocks measuring approximately 5 mm long, 5 mm wide and 2 mm thick, containing enamel on the front and dentine on the back, respectively. Following this, the buccal portion was ground with metallographic abrasive paper until the dentin was exposed. The blocks were immersed in DW under ultrasonic agitation for 5 min to remove possible residues. Absorbent paper was used to dry the samples.

Classification of treatment groups

The eighty dentin blocks were randomly distributed in eight groups (n=10), according to the intracanal dressing protocol. The immersion of dentin blocks was performed in plastic tubes containing 2 ml of the same intracanal dressing protocols were used in the antimicrobial test, so that the dentin blocks remained completely covered. After immersion, the plastic tubes were stored in a bacteriological oven for a period of 14 days at 37°C of temperature and humidity. After this period, the dentin blocks were removed from the plastic tubes, washed with 5 mL of DW and dried with absorbent paper.

Reading of dentinal colouration

The reading of dentinal coloration was performed in two stages, before and after 14 days of the immersion of dentin blocks in the respective intracanal dressing protocols. Each sample was evaluated by digital spectrophotometer (Vita Easyshade Compact – Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Germany), so that the active tip of the device was positioned over the centre of the dentin block and, from the reading of device, a score of 1 (lighter) to 16 (darker) was assigned for

each sample, according to the guide of the device. The reading was performed in two stages in order to establish a comparison and to analyse whether the tested intracanal dressings would promote colour changes in the dentin structure.

Statistical analysis

Normal distribution of bacterial reduction and colour change data was confirmed by the Kolmogorov-Smirnov test. For the microbiological test, the statistical analysis was performed by calculating the percentage reduction of *E. faecalis* from initial and final counting of CFUs in the different groups of intracanal dressings, using the following formula: $\% = 100 - [(Final\ value / Initial\ value) \times 100]$. After calculation of percentage reduction in each sample, the one-way ANOVA test was applied followed by Tukey's post hoc procedure, in order to establish the mean of percentage reduction of *E. faecalis* in each group, at a significance level of 5%. For the colour change test, the statistical analysis was performed using the non-parametric Wilcoxon test, followed by the Mann-Whitney-U test, in order to establish the

median scores for colour changes in the dentin blocs, at a significance level of 5%. Data were analysed using SPSS version 17.0 (SPSS, Chicago, IL, United States).

RESULTS

The mean and standard deviation of *E. faecalis* percentage reduction are presented in Table 1. The highest percentage reduction of *E. faecalis* was observed in groups 4 (GSE+DW), 6 (Ca(OH)₂+CHX), 7 (GSE+CHX) and 8 (GE+CHX), with no statistically significant difference between them ($p < 0.05$). Moreover, group 5 (GE+DW) showed a higher percentage reduction of *E. faecalis* than groups 1 (DW) and 3 (Ca[OH]₂+DW), but its decontamination potential was lower than group 2 (CHX) ($p < 0.05$).

The median and minimum-maximum score values of colour change in the dentin of each group are presented in Table 2. Intragroup analysis revealed colour changes in groups 4 (GSE+DW), 5 (GE+DW), 7 (GSE+CHX) and 8 (GE+CHX), so that the median after 14 days of treatment was higher than the median of the same groups before the

respective treatments ($p < 0.05$). Intergroup analysis revealed that groups 4 (GSE+DW) and 7 (GSE+CHX) showed the highest median colour change in the dentin structure, being statistically different to all other groups ($p < 0.05$).

DISCUSSION

The bacterial growth model of the present study was based on previous studies that focused on antimicrobial strategies against *E. faecalis* (Cecchin et al., 2015; Souza et al., 2017). This microorganism was chosen because of its ability to penetrate dentinal tubules (Ran et al., 2015) and colonise the root canal system by biofilm (Tanomaru et al., 2013). According to (Tanomaru et al., 2013), 14 days is a sufficient period for the formation of a biofilm of *E. faecalis* on dentin. For this reason, a 14-day culture period was adopted in the present study. Moreover, counting of colony forming units (CFUs) was used in order to calculate the percentage reduction of *E. faecalis*, which was also based on previous studies (Cecchin et al., 2015; Souza et al., 2017), and because it allows bacterial quantification from the root canals in an acceptable way (Peters et al., 1995). However,

the microbiological samples were only collected from the main canal. Therefore, it was not possible to assess the presence of *E. faecalis* in the depth of dentinal tubules and the viability of this microorganism.

The mechanism of antimicrobial activity of Ca(OH)_2 is known to be dependent on the dissociation and diffusion of hydroxyl ions, causing the elevation of pH and the inhibition of enzymatic activity as a consequence, which is essential for bacterial survival (Leonardo et al., 2006; Leonardo et al., 2002). Previous studies reported that 14 to 21 days are necessary to obtain an elevated pH and effective antimicrobial activity of Ca(OH)_2 (Leonardo et al., 2006; Agrafioti et al., 2013). For this reason, 14 days of maintenance of the tested protocols in the root canals was adopted in the present study, allowing an adequate comparison between calcium hydroxide-based and natural-based intracanal dressings, associated or not with 2% CHX.

According to the results of the present study, neither of the intracanal dressing protocols were able to promote the complete elimination of *E. faecalis* from root canals. These findings are in accordance with previous studies where *E. faecalis* was not completely eliminated from the root canals

using different decontamination strategies (Gomes et al., 2006; Dametto et al., 2005; Cecchin et al., 2015; Albino Souza et al., 2017). *E. faecalis* is a facultative anaerobic microorganism that is highly resistant to antimicrobial strategies and is usually found in cases of failure of endodontic therapy (Pinheiro et al., 2003). It has shown several virulence factors, and an ability to persist for long periods of time in environments with nutrients limitation and survival starvation (Figdor et al., 2003). Moreover, this microorganism colonises the root canals by structured biofilm formation, causing difficulties with its removal (Guerreiro-Tanomaru et al., 2013). These characteristics can help to explain the *E. faecalis* survival in the root canals in the present study.

The biological and physicochemical properties of Ca(OH)_2 enabled this substance to be used as an intracanal dressing in endodontics (Leonardo et al., 2006). However, previous studies have shown that *E. faecalis* can remain viable within the root canals after periods of exposure to Ca(OH)_2 (Evans et al., 2001; Gomes et al., 2003). These findings are in accordance with the results of the present study, where the group 3(Ca[OH]_2 +DW) was less effective

against *E. faecalis* after 14 days within root canals. The ions released by Ca(OH)₂-based intracanal dressings need to diffuse and reach sufficient concentrations to present effective antimicrobial action. Moreover, physical and biological barriers such as the buffer effect promoted by dentin, remaining tissues and fluids can decrease the antimicrobial activity of Ca(OH)₂ (Portenier et al., 2001). Therefore, the neutralisation of microorganisms by Ca(OH)₂ when associated with a vehicle with no antimicrobial properties can be decreased. For these reasons, the present study proposed the use of natural products with antimicrobial properties associated or not to 2% CHX in order to increase the antimicrobial activity against *E. faecalis*.

The results of the present study demonstrated that groups where 2% CHX was used as vehicle showed higher means of percentage reduction of *E. faecalis* when compared to groups where an inert substance was used as a vehicle, so that groups 6 (Ca[OH]₂+CHX) and 8 (GE+CHX) were statistically better than groups 3 (Ca[OH]₂+DW) and 4 (GE+DW). These findings confirm the first hypothesis of the present study to some extent and are in accordance with

previous studies where the addition of 2% CHX to intracanal dressings resulted in a better potential of decontamination of root canals (Gomes et al., 2006; Gomes et al., 2003). Its mechanism of antimicrobial activity can be explained by an interaction between positive chlorhexidine molecules and the bacterial cellular wall which is negatively charged. Then, CHX induces changes in cellular osmotic equilibrium, resulting in the precipitation of cytoplasmic content and the death of bacterial cells (Dametto et al., 2005). Furthermore, CHX has demonstrated substantivity, ensuring a prolonged antimicrobial activity in this environment (Böttcher et al., 2015). Therefore, the antimicrobial properties present in tested intracanal dressings associated with an elevated decontamination potential and substantivity of CHX may be an explanation for the greater elimination of *E. faecalis* from these groups.

The GSE presents in its composition proanthocyanidins and phenolic components. These components have antimicrobial properties against gram positive and gram negative bacteria, acting in structural components of the bacterial cell wall (Furiga et al., 2014). It can help to explain the results of the present study, where no statistically

significant difference was observed between groups 4 (GSE+DW) and 7 (GSE+CHX), revealing that GSE showed an elevated percentage reduction of *E. faecalis* when used as an intracanal dressing for 14 days, even with no addition of 2% CHX. Moreover, due to the presence of proanthocyanidins in its composition, GSE interferes positively with the mechanical properties of dentin (Cecchin et al., 2015), decreases water absorption and stabilises the collagen degradation of the dentinal structure (Aguiar et al., 2014). These properties contribute to the maintenance of dentinal substrates to the posterior filling of root canals and coronal restoration using resin materials. Therefore, it prevents microbial leakage and provide satisfactory bond strength, creating a favourable environment for tissue regeneration in the periapical region (Sjögren et al., 1997).

Among the natural products that are used in dentistry is GE, due its healing, anti-inflammatory and antimicrobial activity (Park et al., 2008). According to the results of the present study, group 5 (GE+DW) showed a better ability to reduce *E. faecalis* after 14 days of maintenance in the root canals when compared to group 3 (Ca[OH]₂+DW); this calcium hydroxide paste is the most commonly used

intracanal dressing in endodontics. Furthermore, the association of GE and CHX (group 8) resulted in the highest mean percentage reduction of *E. faecalis* (99.27%). These findings are in accordance with a previous study, where the use of GE as an intracanal dressing for 14 days resulted in the effective reduction of *E. faecalis* from root canals (Maekawa et al., 2013). However, the real mechanism of antimicrobial activity of GE is not yet well elucidated. It is known that *gingerol* is the main active substance of GE and is responsible for the beneficial properties of this product (Park et al., 2008), such as antibacterial activity against endodontic pathogens (Maekawa et al., 2013; Ruff et al., 2006), as well as the inhibition of E2 prostaglandins and 1 α interleukins, influencing the specific mediated immune response and being used in autoimmune diseases and chronic inflammation (Lantz et al., 2007).

Several methods are advocated to evaluate the colour change of dental structures, varying between visual (Souza et al., 2013) and digital resources (Meireles et., 2010). The digital spectrophotometry was used in the present study due to the fact that it is a more precise method in the measurement of dentin coloration (Meireles et., 2010).

According to the results of the present study, the groups where GSE and GE were used showed colour changes in the dentin after 14 days of contact, so that the colour change was more significant in the groups where samples were immersed in GSE-based intracanal dressings, being in disagreement with the second hypothesis of the present study. It can be explained by the darkened coloration of this substance due to the presence of tannins in its composition (Thimothe et al., 2007), and because of the pasty consistency, which facilitates its adherence to the dentin structure. Moreover, after 14 days of immersion in the tested intracanal dressing protocols, the final washing of samples was only performed with DW. If an immersion or irrigation with chelating agents with the ability to promote smear layer removal had been performed, the results could be different and the colour change might not have been as significant as those shown by the results of the present study.

Besides the aesthetic damage, the dentine colour change promoted by GSE and GE-based intracanal dressings may have implications in the dentin structure, promoting the formation of a chemical smear layer and obliteration of the dentinal tubules. Then, a reduction of dentinal permeability

(Perez-Heredia et al., 2008) and bond strength of filling material to the root dentin (Stojicic et al., 2012) may occur, making it difficult to perform an adequate filling and compromising the success of endodontic treatment. Therefore, the use of auxiliary chemical substances with a recognised ability for smear layer removal is required, such as 17% EDTA (Perez-Heredia et al., 2008) and QMix (Stojicic et al., 2012). The advantage of QMix is that it contains CHX and surfactant agents in its composition. The first has antimicrobial activity (Cecchin et al., 2015) and the second decreases the superficial tension (Stojicic et al., 2012), increasing the wettability of this substance and providing a greater ability for smear layer removal. Further studies using smear layer removal protocols are needed to evaluate whether the colour change promoted by GSE and GE-based intracanal dressings would be present in the same way as demonstrated in the present study.

CONCLUSION

Despite the limitations of the present study, it was possible to conclude that the addition of 2% CHX improved the antimicrobial activity of GE-based intracanal dressing whereas its addition did not improve the antimicrobial activity of GSE-based intracanal dressings; moreover, these protocols induced significant colour changes in the dentinal structure.

ACKNOWLEDGMENTS

** We have no financial affiliation (e.g., employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing arrangements or honoraria) or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past three years. Any other potential conflict of interest is disclosed.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

** We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

REFERENCES

Agrafioti, A., Tzimpoulas, N.E., Kontakiotis, E.G., 2013. Influence of dentin from the root canal walls and the pulp chamber floor on the pH of intracanal medicaments. *J. Endod.* 39, 701–703.

Aguiar, T.R., Vidal, C.M., Phansalkar, R.S., Todorova, I., Napolitano, J.G., McAlpine, J.B., Chen, S.N., Pauli, G.F., Bedran-Russo, A.K., 2014. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. *J. Dental. Res.* 93, 417–422.

Akisue, E., Tomita, V.S., Gavini, G., Figueiredo, J.A.P., 2010. Effect of the combination of sodium hypochlorite and chlorhexidine on dentinal permeability and scanning electron microscopy precipitate observation. *J. Endod.* 36, 847–850.

Böttcher, D.E., Sehnem, N.T., Montagner, F., Fatturi Parolo, C.C., Grecca, F.S., 2015. Evaluation of the effect of *Enterococcus faecalis* biofilm on the 2% chlorhexidine substantivity: An *in vitro* study. *J. Endod.* 41, 1364–70.

Cecchin, D., Farina, A.P., Souza, M.A., Albarello, L.L., Schneider, A.P., Vidal, C.M., Bedran-Russo, A.K., 2015. Evaluation of antimicrobial effectiveness and dentine mechanical properties after use of chemical and natural auxiliary irrigants. *J. Dent.* 43, 695–702.

Dametto, F.R., Ferraz, C.C., Gomes, B.P., Zaia, A.A., Teixeira, F.B., Souza-Filho, F.J., 2005. *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. 99, 768–772.

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

Figdor, D., Davies, J.K., Sundqvist, G., 2003. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. Molec. Oral. Microb. 18, 234–239.

Furiga, A., Roques, C., Badet, C., 2014. 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. 116, 761–771.

George, S., Kishen, A., Song, K.P., 2005. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. J. Endod. 31, 867–872.

Gomes, B.P., Souza, S.F., Ferraz, C.C., Teixeira, F.B., Zaia, A.A., Valdrighi, L., Souza-Filho, F.J., 2003. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. Int. Endod. J. 36, 267–275.

Gomes, B.P., Vianna, M.E., Sena, N.T., Zaia, A.A., Ferraz, C.C., Souza-Filho, F.J., 2006. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide

combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.* 102, 544–550.

Takehashi, S., Stanley, H.R., Fitzgerald, R.J., 1965. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol.* 20, 340–349.

Lantz, R.C., Chen, G.J., Sarihan, M., Sólyom, A.M., Jolad, S.D., Timmerman, B.N., 2007. The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production. *Phytomedicine.* 14, 123–128.

Leonardo, M.R., Hernandez, M.E., Silva, L.A., Tanomaru-Filho, M., 2006. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.* 102, 680–685.

Leonardo, M.R., Silveira, F.F., Silva, L.A.B., Tanomaru-Filho, M., Utrilla, L.S., 2002. Calcium hydroxide root canal dressing. Histopathological evaluation of periapical repair at different time periods. *Braz. Dent. J.* 13, 17–22.

Maekawa, L.E., Valera, M.C., Oliveira, L.D., Carvalho, C.A., Camargo, C.H., Jorge, A.O., 2013. Effect of *Zingiber officinale* and propolis on microorganisms and endotoxins in root canals. *J. Appl. Oral. Sci.* 21, 25–31.
Meireles, S.S., Santos, I.S., Bona, A.D., Demarco, F.F., 2010. A double-blind randomized clinical trial of two

carbamide peroxide tooth bleaching agents: 2-year follow-up. *J. Dent.* 38, 956–963.

Park, M., Bae, J., Lee, D.S., 2008. Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]-gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria. *Phytother. Res.* 22, 1446–1449.

Perez-Heredia, M., Ferrer-Luque, C.M., Gonzalez-Rodriguez, M.P., Martin-Peinado, F.J., González-López, S., 2008. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. *Int. Endod. J.* 41, 418–23.

Peters, L.B., Wesselink, P.R., Moorer, W.R., 1995. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. *Int. Endod. J.* 28, 95–99.

Pinheiro, E.T., Gomes, B.P.F.A., Ferraz, C.C.R., Sousa, E.L.R., Teixeira, F.B., Souza-Filho, F.J., 2003. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int. Endod. J.* 36, 1–11.

Portenier, I., Haapasalo, H., Rye, A., Waltino, T., Orstavik, D., Haapasalo, M., 2001. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int. Endod. J.* 34, 184–188.

Qualtrough, A.J.E., Burke, F.J.T., 1994. A look at dental aesthetics. *Quintessence Int.* 25, 7–14.

Ran, S., Wang, J., Jiang, W., Zhu, C., Liang, J., 2015. Assessment of dentinal tubule invasion capacity of

Enterococcus faecalis under stress conditions *ex vivo*.
Int. Endod. J. 48, 362–372.

Ruff, M. L., McClanaban, S. B., Babel, B. S., 2006. *In vitro* antifungal efficacy of four irrigants as a final rinse. J. Endod. 34, 331–333.

Sathorn, C., Parashos, P., Messer, H., 2007. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. Int. Endod. J. 40, 2–10.

Shahravan, A., Haghdoost, A.A., Adl, A., Rahimi, H., Shadifar, F., 2007. Effect of smear layer on sealing ability of canal obturation: a systematic review and meta-analysis. J. Endod. 33, 96–105.

Siqueira, J.F, Jr., Rôças, I.N., Lopes, H.P., de Uzeda, M., 1999. Coronal leakage of two root canal sealers containing calcium hydroxide after exposure to human saliva. J. Endod. 25, 14–16.

Sjögren, U., Figdor, D., Persson, S., Sundqvist, G., 1997. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. Int. Endod. J. 30, 297–306.

Souza, M., Cecchin, D., Barbizam, J.V., Almeida, J.F., Zaia, A.A., Gomes, B.P., Ferraz, C.C., 2013. Evaluation of the colour change in enamel and dentine promoted by

the interaction between 2% chlorhexidine and auxiliary chemical solutions. *Aust. Endod. J.* 39, 107–111.

Souza, M.A., Dalla Lana, D.L., Gabrielli, E.S., Ribeiro, M.B., Miyagaki, D.C., Cecchin, D., 2017. Effectiveness of final decontamination protocols against *Enterococcus faecalis* and its influence on bond strength of filling material to root canal dentin. *Photodiagnosis. Photodyn. Ther.* 17, 92-97.

Stojicic, S., Shen, Y., Qian, W., Johnson, B., 2012. Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int. Endod. J.* 45, 363–371.

Tanomaru, J.M., de Faria-Júnior, N.B., Duarte, M.A., Ordinola-Zapata, R., Graeff, M.S., Tanomaru-Filho, M., 2013. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *J. Endod.* 39, 346–350.

Thimothe, J., Bonsi, I.A., Padilla-Zakour, O.I., Kooh, H., 2007. Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis* interspecific hybrids) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *J. Agricult. Food. Chem.* 12, 10200–10207.

TABLE LEGENDS

Table 1: Mean (standard deviation) of percentage of *Enterococcus faecalis* reduction (%).

Table 2: Median (minimum-maximum) of score values of color change in the dentin structure for all evaluation periods and treatment groups.

Title: Antimicrobial activity of intracanal dressings composed by natural products associated to chlorhexidine and its influence on colour change of dentinal structure

Article Type: Original Article

Section/Category: Mechanisms of action of herbal medicines and their active constituents

Keywords: calcium hydroxide, colour change, chlorhexidine, *Enterococcus faecalis*, ginger extract, grape seed extract

Corresponding Author: Dr. Matheus Souza, PhD
Corresponding Author's Institution: School of Dentistry of University of Passo Fundo

First Author: Matheus Souza, PhD
Order of Authors: Matheus Souza, PhD; Huriel S Palhano; Bárbara F Rauber; Lourenço L Albarello; Guilherme Lima; Bianca Pazinato; Karolina F Bischoff; Douglas Cecchin

Abstract: Background: there are a growing number of studies using natural substances due its antimicrobial potential, such as grape seed extract (GSE) and ginger extract (GE). However, little information is available from previous studies regarding its antimicrobial activity against endodontic microbiota and influence on colour changes of dentinal structure. Purpose: The aim of the present study was to evaluate the antimicrobial activity of intracanal dressings composed of natural products and chlorhexidine in vitro and their influence on colour changes of the dentinal structure. Methods: the root canals of 80 human extracted teeth were inoculated with *Enterococcus faecalis* and divided into eight groups (n=10) according to the intracanal dressing protocol: G1 - distilled water (DW); G2 - 2% chlorhexidine gel (CHX); G3 - calcium hydroxide (Ca[OH]₂)+DW; G4 - grape seed extract (GSE)+DW; G5 - ginger extract (GE)+DW; G6 - Ca(OH)₂+CHX; G7 - GSE+CHX; and G8 -

GE+CHX. The intracanal dressings remained in the root canals for 14 days. Microbiological tests (CFU-counting) were performed to evaluate the effectiveness of the proposed treatments. Data were subjected to one-way ANOVA followed by the post-hoc Tukey test ($\alpha=0.05$). Eighty dentin blocks were made from the remaining crowns and submitted to the reading of dentinal coloration using a digital spectrophotometer after immersion in the previously described intracanal dressing protocols. Data were subjected to non-parametric Wilcoxon test, followed by Mann-Whitney-U test ($\alpha=0.05$). Results: the highest ability to promote bacterial reduction was observed in groups 4 (GSE+DW), 6 (Ca(OH)₂+CHX), 7 (GSE+CHX) and 8 (GE+CHX), with no statistically significant difference between them ($p<0.05$). Furthermore, samples of groups 4 (GSE+DW) and 7 (GSE+CHX) have shown the highest medians of colour change of the dentinal structure, statistically higher than all other groups ($p<0.05$). Conclusions: the addition of 2% chlorhexidine gel improved the antimicrobial activity of GE-based intracanal dressing whereas its addition did not improve the antimicrobial activity of GSE-based intracanal dressing; moreover, these protocols induced significant colour changes in the dentinal structure.