

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Daniel de Lima Dalla Lana

**MEDICAÇÕES INTRACANAL CONTRA O BIOFILME DE
ENTEROCOCCUS FAECALIS E SUA INFLUÊNCIA NA
RESISTÊNCIA DE UNIÃO DO MATERIAL OBTURADOR
E MICRODUREZA DA DENTINA**

Passo Fundo

2019

Daniel de Lima Dalla Lana

**MEDICAÇÕES INTRACANAL CONTRA O BIOFILME DE
ENTEROCOCCUS FAECALIS E SUA INFLUÊNCIA NA
RESISTÊNCIA DE UNIÃO DO MATERIAL OBTURADOR
E MICRODUREZA DA DENTINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UPF, para obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Odontológica, sob orientação do prof. Dr. Matheus Albino Souza e co-orientação do prof. Dr. Douglas Cecchin .

Passo Fundo

2019

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado.

“ Medicação intracal contra o biofilme de enterococcus faecalis e sua influência na resistência de união do material obturador e microdureza da dentina”

Elaborada por

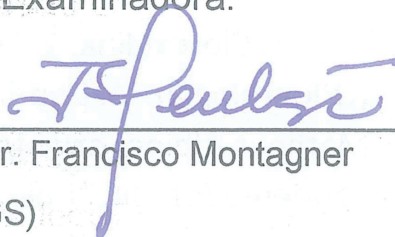
Daniel de Lima Dalla Lana

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Odontologia
– Área de Concentração em Clínica Odontológica

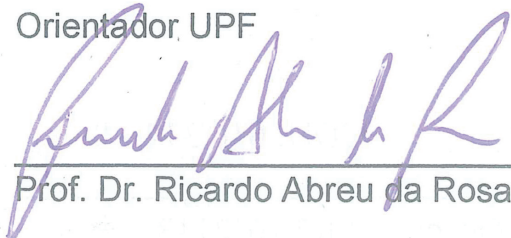
Aprovado em 18/03/2019, pela Comissão Examinadora:



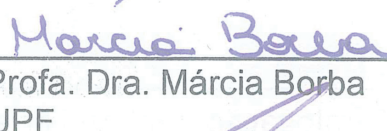
Prof. Dr. Matheus Albino Souza
Orientador UPF



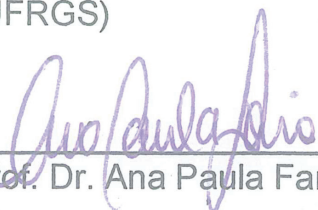
Prof. Dr. Francisco Montagner
(UFRGS)



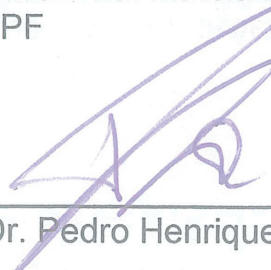
Prof. Dr. Ricardo Abreu da Rosa
(UFRGS)



Profa. Dra. Márcia Borba
UPF



Prof. Dr. Ana Paula Farina
UPF



Prof. Dr. Pedro Henrique Corazza
Coordenador do PPGOdonto

D144m Dalla Lana, Daniel de Lima

Medicações intracanal contra o biofilme de *Enterococcus faecalis* e sua influência na resistência de união do material obturador e microdureza da dentina / Daniel de Lima Dalla Lana. – 2019.

172 f. : il. color. ; 25 cm.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Albino Souza.

Coorientador: Prof. Dr. Douglas Cecchin.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade de Passo Fundo, 2019.

1. Clorexidina. 2. Enterococcus. 3. Obturações (Odontologia). 4. Dentina. 5. Descontaminação. I. Souza, Matheus Albino, orientador. II. Cecchin, Douglas, coorientador. III. Título.

CDU: 616.314-18

AGRADECIMENTOS

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

A Universidade de Passo Fundo que forneceu a bolsa necessária para realização do Curso de Doutorado.

Aos Professores Dr. Matheus Albino Souza e Dra. Márcia Borba pelas orientações durante o desenvolvimento da pesquisa, e aos demais Professores do Programa de Pós-graduação pela experiência compartilhada, ensinamentos, dicas e principalmente amizade cultivada ao longo destes três anos.

Aos Professores Dr. Francisco Montagner e Dr. Ricardo Abreu da Rosa pela disponibilidade para participação na Banca de defesa de tese.

À minha noiva Tábata por todo seu carinho, companheirismo e ajuda durante esta etapa de nossas vidas.

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

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

A acadêmica Amália Pletsch e o colega Huriel Palhano pela parceria para realização da etapa prática microbiológica desta pesquisa.

A Funcionária Eli do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo por toda sua cooperação no desenvolvimento dos trabalhos microbiológicos desta Tese.

Aos Funcionários Cassiane e Ígor do Laboratório de Metalografia da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade de Passo Fundo, pela ajuda nos testes de microdureza e medida microscópica do perímetro dos canais.

A todos os Funcionários da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo por contribuírem para o funcionamento do Curso.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
<i>Enterococcus faecalis</i>	21
Clorexidina.....	28
Extrato de Semente e Uva	39
Hidróxido de Cálcio	44
Microdureza Dentinária	53
Resistência de União	57
3 PROPOSIÇÃO	63
4 MATERIAIS E MÉTODOS	65
5 RESULTADOS	87
6 DISCUSSÃO.....	93

7 CONCLUSÕES	118
REFERÊNCIAS	119
APÊNDICES	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média \pm desvio padrão do percentual de redução de <i>Enterococcus faecalis</i> após exposição aos grupos de tratamento.....	87
Tabela 2: Valores de mediana e intervalo interquartil (IQ) da resistência de união do material obturador a dentina radicular nos dois intervalos de tempo.....	88
Tabela 3: Padrões de falha do material obturador nas amostras sem período de armazenamento.....	90
Tabela 4: Padrões de falha do material obturador nas amostras com 12 meses de armazenamento.....	91
Tabela 5: Média \pm desvio padrão da microdureza dentinária (MPa) após exposição aos grupos de tratamento.....	91

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Raíz fixada com silicona pesada no interior de um eppendorf e caixa de polipropileno com amostras posicionadas.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 2: Enterococcus faecalis, coloração de Gram.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 3: Esquema de coleta microbiana.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 4: Disco de dentina sendo submetido ao teste de pushout.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 5: Medida do perímetro dos canais radiculares. Laboratório de Metalografia, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade de Passo Fundo.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 6: Padrões de falha do material obturador.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 7: Indentações.....</i>	<i>85</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise da Variância

BHI – Brain Heart Infusion

CFU – Colony Forming Unit

CHX – Clorexidina

CLSM – Confocal Laser Scanning Microscope

DNA – Desoxyribonucleic Acid

DW – Distilled Water

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

FISH – Fluorescence In Situ Hybridization

GSE – Grape Seed Extract

HOMD – Human Oral Microbiome Database

MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura

MIC – Mínima Concentração Inibitória

MPa – Mega Pascal

NaOCl – Hipoclorito de Sódio

NUI – Non Ultrasonic Irrigation

PAs – Proantocianidinas

PCA – Plate Count Agar

PCR – Polymerase Chain Reaction

PUI – Passive Ultrasonic Irrigation

RNA – Ribonucleic Acid

SALINE – Solução fisiológica (soro)

SEM – Scanning Electron Microscope

TSB – Tryptic Soy Broth

UFC – Unidade Formadora de Colônia

VAI – Vascular Access Infection

RESUMO¹

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação antimicrobiana de diferentes medicações intracanal contra o biofilme de *Enterococcus faecalis*, e sua influência na resistência de união do material obturador e microdureza dentinária. Foram utilizadas 126 raízes humanas extraídas, instrumentadas e esterilizadas. As amostras foram divididas aleatoriamente em 6 grupos: solução fisiológica esterilizada, clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio, extrato de semente de uva, hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2% e extrato de semente de uva + clorexidina gel 2%. Para a etapa microbiológica foram utilizadas (n=10) raízes contaminadas durante 15 dias com *Enterococcus faecalis*. Um percentual de redução microbiana foi calculado com base nas contagens de unidades formadoras de colônias pré e pós tratamentos. Os testes de resistência de união foram realizados em dois momentos, 21 dias e 12 meses após a obturação, por meio do *push out* (n=15). O teste de microdureza utilizou média de 3 indentações como valor de referência para as comparações (n=10). Quinze dias de contato foi o período de tratamento padronizado para as medicações. Os

¹ Me. Daniel de Lima Dalla Lana

dados obtidos foram tabulados e analisados estatisticamente com nível de significância de 5%. As medicações contendo hidróxido de cálcio e o extrato de semente de uva, ambas com veículo clorexidina demonstraram os maiores valores de redução bacteriana ($p < 0,05$). As medicações a base de extrato de semente de uva resultaram nos maiores valores de resistência de união do material obturador a dentina radicular nos dois intervalos de tempo testados ($p < 0,05$). Medicações à base de hidróxido de cálcio ou extrato de semente de uva, não modificaram a microdureza do tecido dentinário ($p > 0,05$).

Palavras chave: clorexidina, *Enterococcus faecalis*, extrato de semente de uva, hidróxido de cálcio, descontaminação.

ABSTRACT²

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial action of different intracanal medications against *Enterococcus faecalis* biofilm and its effect on the bond strength of the obturator material and dentin microhardness. A hundred and twenty six human extracted roots were prepared and and sterilized. Samples were randomly divided into 6 groups: saline, chlorhexidine gel 2%, calcium hydroxide, grape seed extract, calcium hydroxide + chlorhexidine gel 2% and grape seed extract + chlorhexidine gel 2%. For the microbiological stage, the roots inoculated for 15 days with *Enterococcus faecalis* were used (n=10). A percentage of microbial reduction was calculated based on counts of colony forming units before and after treatments. Bond strength tests were performed at two times, 21 days and 12 months after obturation, by push out test (n=15). Microhardness test used the average of 3 indentations for the comparisons (n=10). Fifteen days of contact was the standardized treatment period for the medications. Data were tabulated and statistically analyzed at a significance level of

² Intracanal medications against *Enterococcus faecalis* biofilm and its effect on the bond strength of the obturator material and dentin microhardness

5%. Medications containing calcium hydroxide and grape seed extract, both with chlorhexidine vehicle, demonstrated the highest values of bacterial reduction ($p < 0.05$). Grape seed extract medications resulted in the highest bond strength values of obturator material to the root canal dentin at the two time intervals tested ($p < 0.05$). Medications based on calcium hydroxide or grape seed extract did not modify the microhardness of the dentin tissue ($p > 0.05$).

Key words: chlorhexidine, *Enterococcus faecalis*, grape seed extract, calcium hydroxide, decontamination.

1 INTRODUÇÃO

Os dois maiores desafios da terapia endodôntica são representados pelo processo de desinfecção do canal radicular, bem como a prevenção da recontaminação por meio de um adequado selamento do sistema de canais (Ricucci *et al.*, 2013).

O protocolo de preparo dos canais, em conjunto com as substâncias químicas auxiliares, embora considerado satisfatório não garante a inativação completa da contaminação (Ordinola-Zapata *et al.*, 2013), e a infecção residual é uma das causas dos insucessos da terapia endodôntica (Paiva *et al.*, 2012).

Dentre os microrganismos contaminantes dos canais, destaca-se o *Enterococcus faecalis*, que possui a capacidade de se adaptar as mudanças severas no meio, invadir túbulos dentinários (Chivatxaranukul *et al.*, 2008; Ran *et al.*, 2015) e principalmente desenvolver biofilme (Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2013). Tais características dificultam a sua eliminação do sistema de canais radiculares e podem levar às infecções persistentes (Elakanti *et al.*, 2015).

Protocolos atuais preconizam o tratamento endodôntico em sessão única, demonstrando um percentual de redução bacteriana maior de 99,75% com apenas uma intervenção no sistema de canais radiculares (Xavier *et al.*, 2013). No entanto, um requisito básico é conseguir um canal “seco”, evitando a recontaminação promovida pela infiltração do material obturador pelo excesso de umidade ou secreções, oriundos dos tecidos periapicais, o que levaria ao insucesso da terapia endodôntica.

O uso das medicações intracanaís se faz necessário nos casos cuja condição pós instrumentação, não é a ideal para obturação, devido a presença de umidade no interior dos canais e impossibilidade de secagem (Leonardo, 2012). Estas substâncias irão garantir o estado de desinfecção entre as sessões do tratamento, e devem apresentar propriedades bactericidas não interferindo, tanto nas propriedades mecânicas do tecido dentinário como na resistência de união do material obturador á dentina radicular (Albino Souza *et al.*, 2017).

O hidróxido de cálcio é a medicação mais comumente utilizada durante o tratamento endodôntico em múltiplas sessões, uma vez que, sua eficácia no combate às bactérias e endotoxinas tenha sido comprovada por inúmeros estudos (Nerwich *et al.*, 1993; Leonardo *et al.*, 2006; Lana *et al.*, 2009; Leonardo, 2012). O uso do hidróxido de cálcio associado a clorexidina gel 2% no presente estudo, é uma das medicações propostas como alternativa

nos casos de endodontia em múltiplas sessões (Maekawa *et al.*, 2011). A clorexidina na concentração de 2% é um eficaz agente antimicrobiano, apresentando também a capacidade de substantividade (Ercan *et al.*, 2004).

Com o constante aumento da resistência bacteriana e a presença de efeitos adversos das substâncias sintéticas, produtos derivados de plantas fitoterápicas surgem como uma nova alternativa, é o caso do extrato da semente de uva, o qual possui atividade antibacteriana (Jayaprakasha *et al.*, 2003; Cecchin, Farina, *et al.*, 2015), sendo eficaz no combate ao biofilme de *Enterococcus faecalis* (Albino Souza *et al.*, 2017). Seu uso associado à clorexidina gel na concentração de 2% também é objeto de estudo no presente trabalho.

Mesmo que a desinfecção seja uma das etapas mais importantes do tratamento endodôntico, a obturação e selamento dos canais radiculares é um passo crucial em direção ao sucesso da endodontia, pois irá prevenir as recontaminações e possíveis recidivas da infecção. Portanto, uma atenção especial deve ser dada a possibilidade de interação entre as medicações intracanal e materiais obturadores, uma vez que a resistência de união dos cimentos pode estar suscetível a ação de resíduos de outras substâncias (Ok *et al.*, 2013).

Na realidade clínica da endodontia, inúmeros são os casos de tratamentos em elementos dentários com perdas consideráveis

de estrutura, e a redução na microdureza dentinária é um fator que pode predispor tais elementos às fraturas, aonde pequenas cargas oclusais poderão ser suficientes para que ocorra a falha do tecido dentinário (Machnick *et al.*, 2003). Dessa forma, a não interação com as propriedades mecânicas da dentina, é uma característica desejável em uma medicação intracanal.

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação antimicrobiana de diferentes medicações intracanal no combate ao biofilme de *Enterococcus faecalis*, e sua influência na resistência de união do material obturador e microdureza dentinária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Enterococcus faecalis

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

Cogulu *et al.* (2008) avaliaram a presença de patógenos em amostras de canais radiculares, de dentes decíduos e permanentes, utilizando o método de PCR e determinaram a associação desses microrganismos com os sintomas clínicos de infecções endodônticas. Cento e quarenta e cinco 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 *Enterococcus faecalis* foram altamente associados com radiolucidez periapical e dor anterior, enquanto em dentes decíduos e permanentes sensíveis a percussão, foi associada a presença de *P. gingivalis*.

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

gracilis e *Neisseria mucosa*. As contagens bacterianas totais foram semelhantes entre os dentes com e sem uma fístula. *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus anginosus*, *Capnocytophaga sputigena* e *Capnocytophaga gingivalis* tinham contagens significativamente mais elevadas na ausência de fístula. Níveis mais elevados de *P. gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum sp. nucleatum* foram observadas em casos com fístula. *Buccalis Leptotrichia* e *Porphyromonas endodontalis* foram associadas a indivíduos com maior chance de fístula.

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

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

Chavez De Paz (2012) testou a capacidade de quatro bactérias do canal radicular em estabelecer uma comunidade multiespécies, determinando as características estruturais, fisiológicas e a composição desta comunidade. Foram isoladas as seguintes estirpes: *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus gordonii*, e *Enterococcus faecalis*, cultivadas juntas em um sistema de célula miniflow, além de avaliar a viabilidade celular e os parâmetros de biovolume, utilizando um corante Redox de fluorescência para determinar a atividade metabólica do biofilme bacteriano. As quatro espécies testadas foram capazes de formar comunidades estáveis e

reprodutíveis, mostrando um crescimento contínuo ao longo do tempo. No entanto, na ausência de glicose mostrou biovolumes significativamente menores. Uma elevada proporção de células viáveis (>90%) foi observada, e o crescimento do biofilme estava correlacionado com a atividade metabólica celular. A estrutura em meio rico não mudou consideravelmente nas primeiras 120 horas, período no qual o *Enterococcus faecalis*, *L. salivarius*, e *S. gordonii* foram mais abundantes.

D'amato-Palumbo *et al.* (2013) avaliaram os microrganismos de possível origem oral associados às infecções de acesso vascular (VAI), durante o período de 10 anos em pacientes sob hemodiálise, através do Human Oral Microbiome Database (HOMD). Dos 218 registros identificados, 65 pacientes apresentaram coletivamente 115 episódios VAI. Os microrganismos mais envolvidos foram: *Staphylococcus aureus* (49,6% de infecções), *Staphylococcus epidermidis* (10,4%), *Serratia marcescens* (10,4%), *Pseudomonas aeruginosa* (9,6%), e *Enterococcus faecalis* / *fecum* (8,7%). Segundo o HOMD o risco de ocorrer uma VAI sendo causada por microrganismos provenientes da cavidade oral é muito pequena.

Guerreiro-Tanomaru *et al.* (2013) analisaram a contribuição do *Enterococcus faecalis* na formação de biofilme em diferentes substratos. Placas infectadas com *Enterococcus faecalis* foram utilizadas para o crescimento de biofilme em dentina e osso bovino, guta-percha e hidroxiapatita. Os substratos foram incubados a 37°C

durante 14 ou 21 dias, com renovação do meio a cada 48 horas. Após os períodos de indução, as amostras (n = 5 por grupo e por período de indução) foram coradas usando o Live / Dead, e as imagens foram analisadas ao microscópio confocal. Neste caso a formação do biofilme foi observada em todos os grupos, a gutta-percha teve o menor volume total em 14 dias e a hidroxiapatita mais elevada aos 21 dias, no entanto ao final dos 21 dias o volume de todas as amostras eram semelhantes.

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

Murad *et al.* (2014) investigaram a microbiota de canais radiculares após insucessos no tratamento endodôntico, afim de,

identificar e quantificar os microrganismos existentes. Amostras microbiológicas foram retiradas de 36 canais radiculares com infecção endodôntica persistente e as espécies bacterianas foram determinadas pelo quadriculado hibridização DNA-DNA. Os mais altos níveis encontrados foram das seguintes espécies: *Enterococcus faecium*, *Dialister pneumosintes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Helicobacter pylori* com diferença estatística significativa entre bactérias gram-negativas e gram-positivas. Também pode-se observar nesse estudo uma correlação entre a área da lesão periapical e os níveis de espécies gram-negativas.

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

(19%). Já o *Enterococcus faecalis* foi encontrado em apenas 3 casos.

Ran *et al.* (2015) analisaram a capacidade de invasão de túbulos dentinários por *Enterococcus faecalis*. Foram infectados 40 dentes humanos unirradiculares em pH alcalino e condições de estresse nutricional. Os canais foram padronizados e após 4 semanas de contaminação as raízes foram divididas verticalmente em duas metades: uma metade foi processada para análise de formação de biofilme usando um microscópio eletrônico de varredura, a outra metade foi corada com reagentes fluorescentes e a profundidade de invasão tubular dos microrganismos foi examinada MEV confocal. A estirpe de *Enterococcus faecalis* resultou na formação de biofilme e invasão dos túbulos dentinários sob todas as condições de estresse, com exceção de pH 11 e 12, no entanto, a distância de penetração túbulo foi drasticamente reduzida nestas condições de estresse em comparação com caldo tríptico de soja (TSB) ou pH 7. A profundidade de invasão na dentina na porção medial da raiz foi significativamente maior do que nas secções apicais em TSB e meio de privação de energia.

Clorexidina

Weber *et al.* (2003) realizaram um estudo com a finalidade de avaliar o efeito da ativação ultrassônica passiva da clorexidina

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

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

Estudos demonstram que as principais causas para o insucesso da terapia endodôntica são: microrganismos persistentes no interior do canal radicular e a recolonização do canal obturado, geralmente associados ao *Enterococcus faecalis* organizado na forma de biofilme. Apenas a ação mecânica dos instrumentos endodônticos não é capaz de sanificar o canal, sendo imprescindível o uso de soluções irrigantes com atividade antimicrobiana de amplo espectro, efetivas contra microrganismos facultativos ou anaeróbios organizados em biofilme, capacidade de dissolução de tecido pulpar remanescente, poder de inativação de endotoxinas e prevenção da formação de lama dentinária ou dissolução da mesma. A clorexidina, desenvolvida em 1940, é um potente antisséptico utilizado na odontologia para controle de placa

bem como solução irrigadora para endodontia, porém não deve ser indicada como irrigante padrão pelo fato de não apresentar capacidade de dissolução dos remanescentes pulpares. No entanto é a solução mais indicada para o protocolo final de irrigação, uma vez que possui afinidade pelos tecidos duros do elemento dental, prolongando seu efeito antimicrobiano num fenômeno chamado substantividade. Algum cuidado deve ser tomado a cerca de sua interação com o hipoclorito de sódio, o que pode causar o escurecimento dental. Afim de se evitar tal acontecimento, deve-se antes do uso da clorexidina, remover o hipoclorito do interior dos canais por meio de secagem ou lavagem com solução salina (Zehnder, 2006).

Arias-Moliz *et al.* (2009) testaram a concentração mínima de soluções irrigantes para a erradicação do biofilme de *Enterococcus faecalis*. Verificaram que o NaOCl foi bastante efetivo na erradicação do biofilme nas concentrações de 0,00625%, 0,0015625% e 0,00078125 durante 1, 5 e 10 minutos de exposição respectivamente. A clorexidina demonstrou ser menos efetiva, necessitando ao menos 5 minutos de contato na concentração de 2% e 1% em 10 minutos. A solução de EDTA 17% não demonstrou atividade antimicrobiana em nenhum intervalo de tempo testado.

A clorexidina tem sido amplamente utilizada como irrigante ou medicação intracanal, em alguns estudos demonstrou ser mais eficiente do que o hipoclorito de sódio 5,25% contra

Enterococcus faecalis, e em combinação com peróxido de hidrogênio 3% tem sua atividade antibacteriana amplificada. Além disso, apresenta substantividade, ou seja, a capacidade de ligar-se aos tecidos circundantes e ser liberada lentamente por um maior período de tempo, 72h a 4 semanas. Estudos demonstram que o crescimento bacteriano organizado em biofilme é muito difícil de ser eliminado e que a clorexidina 2% não foi capaz de rompê-lo. Sendo assim, o hipoclorito de sódio é a única solução irrigante capaz de causar seu rompimento, o que também se aplica à capacidade de dissolução de tecido orgânico, a qual tem sido a principal desvantagem da clorexidina. Alguns autores sugerem o uso de hipoclorito de sódio a fim de se eliminar o tecido orgânico, em seguida o uso de EDTA 17% para remoção da lama dentinária e na sequência o uso de clorexidina no intuito de ampliar o poder de desinfecção devido sua substantividade, porém a interação química entre o hipoclorito de sódio e a clorexidina pode levar à alteração de cor do elemento dentário e o precipitado formado por esta interação interfere no selamento do material obturador. Quando utilizada como medicação intracanal, os autores demonstram que a clorexidina é mais efetiva do que o hidróxido de cálcio em eliminar *Enterococcus faecalis* e que se misturados, sua efetividade antimicrobiana pode ser aumentada. A respeito da adesão dentinária, a clorexidina apresenta ação inibidora de metaloproteinases, que causariam degradação do colágeno

desprotegido da camada híbrida levando às falhas na adesão de restaurações. Utilizada clinicamente nas concentrações indicadas a biocompatibilidade da clorexidina é aceitável, e em raros casos pode causar reações alérgicas (Mohammadi e Abbott, 2009).

Mehrvarzfar *et al.* (2011) testaram a hipótese de que a combinação da terapia envolvendo laser e soluções irrigantes seria capaz de eliminar completamente o *Enterococcus faecalis* do interior dos túbulos dentinários do canal radicular. Foram utilizados 106 dentes humanos unirradulares, as amostras tiveram os canais ampliados, foram esterilizadas e contaminadas com *Enterococcus faecalis*. As unidades experimentais foram divididas em 2 grupos (n=48), os quais foram subdivididos em 4 grupos (n=12): 1A- Solução salina (5ml) durante 5 minutos; 1B- NaOCl 2,5% (5ml) durante 5 minutos; 1C- Clorexidina 2% (1,2ml) durante 1 minuto; 1D- MTAD (5ml) durante 5 minutos. Para os grupos 2A, 2B, 2C e 2D os mesmos protocolos foram utilizados e após secagem dos canais foi realizada irradiação com laser durante 5 segundos, repetidas por 5 vezes, com intervalo de 15 segundos a cada ciclo de irradiação. Foi utilizado o diodo de GaAlAs, levado ao canal com ponta de fibra óptica. Após contagem de CFU foi observada a ausência de crescimento bacteriano para a associação de MTAD e laser, sem diferenças estatísticas para as associações do laser com de NaOCl 2,5% e clorexidina 2%. Por outro lado, o emprego das soluções sem irradiação a laser, revelou a superioridade das

soluções de NaOCl 2,5% e clorexidina 2% na desinfecção, em relação à solução de MTAD. O emprego do diodo de laser, sem associação com irrigantes, foi capaz de reduzir em 80% a contaminação bacteriana.

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

Beus *et al.* (2012) compararam o efeito de dois protocolos de irrigação endodôntica para eliminação de bactérias do sistema

de canais radiculares. O objetivo foi: 1- comparar o efeito antimicrobiano da irrigação ultrassônica passiva com a irrigação não ultrassônica. 2- verificar o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio como medicação intracanal pós instrumentação. 3- observar o efeito antimicrobiano de uma segunda exposição à instrumentação e irrigação. 4- comparar a capacidade antimicrobiana de tratamentos em sessão única e duas sessões. Foram selecionados 50 pacientes apresentando indicação endodôntica primária, necrose pulpar e lesão periapical. Os dentes foram preparados utilizando instrumentos rotatórios ProTaper e NaOCl 1% e em seguida os pacientes foram divididos em dois grupos (n=25) PUI (irrigação ultrassônica passiva) e NUI (irrigação não ultrassônica). Amostras foram coletadas após acesso endodôntico; instrumentação/irrigação; início da segunda sessão, após uso do hidróxido de cálcio por 7 dias; e antes da obturação, após segunda instrumentação/irrigação. Não foram observadas diferenças significativas para redução bacteriana em relação a PUI (84%) e NUI (80%). Após a medicação intracanal 87% das amostras atingiram cultura bacteriana negativa, enquanto que após a segunda intervenção as amostras atingiram 91% de culturas negativas, também sem diferença significativa. Portanto, embora o uso de hidróxido de cálcio como medicação intracanal durante 7 dias tenha diminuído a infecção bacteriana, uma exposição a segunda intervenção de instrumentação e irrigação também é um

fator importante na redução da contaminação; e a alta taxa de culturas negativas alcançada em uma sessão para ambos os grupos, é provavelmente o resultado do grande volume de solução irrigante assim como a maior profundidade de inserção da cânula irrigadora no interior dos canais radiculares.

Vaziri *et al.* (2012) testaram a eficácia bactericida da terapia fotodinâmica, hipoclorito de sódio a 2,5%, clorexidina a 2% e PDT/NaOCl 2,5% em canais infectados com *Enterococcus faecalis*. Ao realizar contagem de CFU verificaram redução significativa para todos os grupos testados. A PDT e a clorexidina 2% apresentaram efeitos antibacterianos moderados enquanto que NaOCl 2,5% foi significativamente mais elevado, porém a associação de PDT/NaOCl 2,5% obteve os melhores resultados, atingindo 100% de eliminação de *Enterococcus faecalis*, utilizando o seguinte protocolo: NaOCl 2,5% durante 5 minutos, aplicação do fotosensibilizador (azul de toluidina a 15 µg/ml) e exposição a energia luminosa (potência de 200 mw/cm² e comprimento de onda de 625 nm), não sendo utilizada ponteira de fibra óptica.

Ordinola-Zapata *et al.* (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio, clorexidina 2% e pasta triantibiótica em um modelo de biofilme em dentina infectada de maneira intra-oral. Foram utilizadas 40 secções de dentina bovina esterilizadas, as quais foram fixadas em um dispositivo ortodôntico utilizado por um voluntário durante 72 horas. As amostras ficaram

imersas nos agentes antimicrobianos durante 7 dias. A pasta triantibiótica tinha na composição Metronidazol (flagyl 250mg), minociclina (100mg) e ciprofloxacino (250mg) (500 mg de cada antibiótico foi homogeneizada de forma a obter um pó, o qual foi misturada ao propilenoglicol na proporção de 7 partes de pó para 4 de propilenoglicol). Como grupo controle foi utilizada solução salina. Após 7 dias, as amostras foram lavadas em solução salina, e cinco exemplares de cada grupo foram avaliados imediatamente após lavagem, outros 5 exemplares de cada grupo foram reincubados durante 24h (n=10). Os resultados demonstraram que a pasta de hidróxido de cálcio apresentou a atividade antimicrobiana mais fraca, e que a mistura triantibiótica obteve a maior atividade antimicrobiana com ou sem 24 horas de reincubação. A clorexidina e o hidróxido de cálcio não demonstraram diferença significativa imediatamente após a lavagem das amostras, porém após o período de reincubação, a clorexidina 2% apresentou estatisticamente menor número de células viáveis, enquanto que o hidróxido de cálcio apresentou um aumento de células viáveis, demonstrando que o efeito alcalino pode ser neutralizado, e que o biofilme pode aumentar a proporção de células viáveis quando novos nutrientes estão disponíveis. Quando comparadas a clorexidina 2% e a pasta triantibiótica após período de reincubação não foram observadas diferenças significativas, possivelmente pelo fato da clorexidina e da

monociclina apresentarem substantividade. No entanto, os medicamentos utilizados nesse estudo, não foram capazes de eliminar 100% das bactérias, sugerindo que uma prévia desorganização do biofilme por meio do tratamento com hipoclorito de sódio pode ser uma condição necessária para aprimorar o efeito das medicações intra-canais.

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

microrganismos no tecido dentinário humano não afetaram a presença da clorexidina 2%.

Extrato de Semente e Uva

O estudo de Jayaprakasha *et al.* (2003) teve como objetivo avaliar o potencial antibacteriano e antioxidante do extrato de semente de uva (*Vitis vinífera*). Foram identificados nove compostos responsáveis pela formação de 95% do extrato, dentre eles destacam-se as procianidinas monoméricas, presentes na quantidade de 40 a 48%. As concentrações do extrato em 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 ppm foram testadas afim de determinar a MIC (Mínima Concentração Inibitória), através da contagem de CFU. As espécies bacterianas utilizadas foram *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados demonstraram que bactérias Gram-positivas foram completamente inibidas nas concentrações de 850-1000 ppm, enquanto as Gram-negativas foram inibidas em concentrações de 1250-1500 ppm.

Autores como Brown *et al.* (2009) avaliaram os efeitos antimicrobianos dos extratos de uva (casca, semente e ambos) contra *Helicobacter pylori* por meio da análise em microscopia eletrônica de varredura confocal. As amostras foram tratadas com diferentes tempos de exposição aos agentes antimicrobianos, 1, 2,

4, 6, 12 e 24 horas. Os resultados demonstraram que os extratos de uva têm um significativo efeito inibitório no crescimento bacteriano, atingindo 60% de redução no período mais prolongado de exposição, sem diferença estatística entre os extratos. Tais resultados sustentam a necessidade de mais pesquisas com o objetivo de avaliar, *in vivo*, o potencial dos extratos de uva e seus compostos constituintes para através da dieta promover o controle da infecção por *Helicobacter pylori*.

Cueva *et al.* (2012) avaliaram o efeito de sete compostos fenólicos do vinho no crescimento de bactérias patogênicas associadas a doenças respiratórias. Dentre as substâncias testadas o extrato de semente de uva demonstrou o efeito antimicrobiano mais efetivo contra os patógenos avaliados, sendo as bactérias gram-negativas mais susceptíveis do que as gram-positivas. Tais resultados justificam a necessidade de mais estudos com o objetivo de testar substâncias derivadas da uva e do vinho na higiene oral.

Kalra *et al.* (2013) testaram o efeito das proantocianidinas (PAs) do extrato da semente de uva 6,5% na resistência de união do cimento resinoso RealSeal SE a dentina radicular. Foram utilizados 28 pré-molares unirradiculares divididos em dois grupos: PAs-tratados (extrato de uva 6,5% durante 10 minutos) e não-tratados. Após a obturação as raízes foram seccionadas em fatias de 1mm de espessura no terço coronário e terço médio, as quais foram utilizadas para o teste de pushout após uma semana e após 3 meses

de armazenamento. O terço apical das raízes foi utilizado para avaliação da interface cimento-dentina em MEV e para o teste da biodegradação, que se deu através da exposição destas amostras à colagenase bacteriana tipo I durante 24h e posterior mensuração da hidroxiprolina, liberada após o período de ação enzimática. Os resultados não demonstraram diferenças na resistência de união entre os grupos para o terço coronário no período de uma semana de armazenamento. Já para o terço médio o grupo tratado com o extrato demonstrou maiores valores de resistência de união para este período. Após três meses de armazenamento ambos os grupos apresentaram diminuição nos valores de resistência de união, porém o grupo tratado revelou melhores resultados. As imagens em MEV do grupo tratado demonstraram uma interface cimento/dentina intacta quando comparadas ao grupo não tratado, o qual demonstrou espaços na interface. A análise da hidroxiprolina revelou uma menor liberação por parte do grupo tratado com extrato de uva 6,5%. Os autores concluíram que o tratamento da dentina radicular com extrato de semente de uva 6,5% melhora a resistência da matriz dentinária radicular desmineralizada à biodegradação, e aprimora a resistência de união do cimento resinoso à dentina radicular após um curto período de armazenamento em água destilada.

Em um estudo realizado por Munoz-Gonzalez *et al.* (2014), foi utilizado o vinho tinto e seus componentes derivados com o

objetivo de verificar as propriedades antimicrobianas destas substâncias contra bactérias orais em um modelo de biofilme com 14 dias de desenvolvimento. A análise microbiológica foi realizada através da contagem de CFU e teste confocal em MEV dos biofilmes após a exposição dos mesmos aos seguintes agentes: vinho tinto, vinho tinto sem álcool, vinho tinto fortificado com extrato de semente de uva (2,5%) e extrato de levedura seca inativa. Os resultados demonstraram que o vinho tinto foi capaz de inibir o crescimento bacteriano de espécies patogênicas organizadas em biofilme. A solução fortificada por extrato de semente de uva obteve a maior atividade antimicrobiana, abrindo caminhos promissores em direção a um ingrediente natural para as formulações de produtos de cuidado oral, especialmente indicados a prevenção da cárie uma vez que tenha demonstrado efetividade contra o *Streptococcus mutans*.

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

inibição do crescimento microbiano observada neste estudo com estes dois extratos medicinais abre novas perspectivas para o seu uso como medicação intracanal.

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

Cecchin, Pin, *et al.* (2015) realizaram um estudo com o objetivo de investigar os efeitos de um extrato rico em proantocianidinas (extrato de semente de uva) na resistência de união e estabilidade de adesão de pinos de fibra à dentina, utilizando dois sistemas adesivos. Os resultados demonstraram que o extrato de semente de uva não afetou a resistência de união de imediato, porém contribuiu para preservar a resistência de união

após um período de doze meses, para ambos os sistemas adesivos. Os autores concluíram que o pretratamento com extrato de semente de uva pode ser utilizado como uma alternativa natural a fim de melhorar a estabilidade da resistência de união da interface dentina-adesivo em canais radiculares.

Hidróxido de Cálcio

Atualmente podemos distinguir dois tipos de endodontia: “*endodontia essencialmente técnica*” e “*endodontia com bases biológicas*”. A primeira se alicerça em materiais e técnicas avançadas de tratamento, com uso de instrumentos idealizados com base na engenharia, particularmente na metalurgia. Por outro lado, a endodontia biológica se alicerça em disciplinas básicas como histologia, patologia, imunologia, microbiologia e biologia molecular, para embasar condutas clínicas. Portanto, ao término do tratamento, o cirurgião dentista deve estar consciente que somente a ausência da dor pós-operatória não é determinante do sucesso dessa terapia. Na literatura disponível observam-se divergências com relação ao número de sessões necessárias para o tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar e lesão periapical crônica, ou seja, se o uso de um curativo de demora entre as sessões é necessário. Deve-se ressaltar que, em inúmeros estudos nos quais não se observaram diferenças entre tratamentos em uma ou duas

sessões, o curativo permaneceu por um período de apenas sete dias, o qual é considerado um tempo insuficiente para que o hidróxido de cálcio se difunda por toda a estrutura do sistema de canais radiculares, sendo assim, o curativo deve ser mantido por, no mínimo, 14 dias, afim de que desenvolva adequadamente suas funções. Para que ocorra o reparo em dentes com lesão periapical, é importante a eliminação dos microrganismos presentes no sistema de canais radiculares previamente a obturação. Esse objetivo não é alcançado quando se efetua o tratamento em uma única sessão, uma vez que não é possível controlar a infecção localizada nas áreas de complexidades anatômicas, bem como na superfície externa radicular (biofilme apical) e áreas inacessíveis ao preparo biomecânico sem o uso de um curativo de demora antimicrobiano entre as sessões. A permanência dos microrganismos Gram negativos nos sítios de lesão traz à tona um outro agravante, o LPS (lipopolissacarídeo), presente na parede celular bacteriana e liberado durante sua morte ou reprodução. Esta endotoxina quando presente é responsável por uma série de eventos biológicos que conduzem uma reação inflamatória, com posterior reabsorção cementária e reabsorção óssea, contribuindo para persistência da lesão periapical crônica. O LPS, que atua principalmente sobre macrófagos, desencadeia a liberação de um grande número de mediadores químicos inflamatórios bioativos ou citocinas, como interleucinas e fator de necrose tumoral, os quais estão envolvidos

no desenvolvimento, manutenção e reparação de lesões periapicais. Ainda, em canais radiculares infectados, as endotoxinas podem contribuir para uma elevação na liberação de substâncias vasoativas e neurotransmissores na região das terminações nervosas dos tecidos periapicais, conduzindo a ocorrência da dor. Sendo assim, o objetivo do profissional durante a terapia endodôntica não deve ser apenas a morte bacteriana, mas também a inativação das endotoxinas, o que pode ser atingido por meio do emprego do hidróxido de cálcio como curativo de demora entre as sessões de tratamento, além de propriedades como ação antibacteriana e antiexsudativa, indução da formação de tecido mineralizado, compatibilidade tecidual e dissolução de tecidos necróticos, evitando problemas para a reparação tecidual (Leonardo, 2012).

Um período mínimo de tempo em contato com o canal radicular é necessário para que ocorra a difusão do hidróxido de cálcio e o mesmo exerça sua atividade bactericida. Este período necessário para q o HC eleve o pH na dentina radicular externa apical está em torno de 14 a 21 dias de medicação intracanal (Nerwich *et al.*, 1993).

Leonardo *et al.* (2000) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana de duas pastas a de hidróxido de cálcio, indicadas como medicação intra canal, no combate ao *Enterococcus faecalis*, por meio de medição dos halos de inibição. Concluíram que ambas

as pastas apresentaram satisfatórias atividades antimicrobianas contra esta cepa bacteriana.

Autores como Grigoratos *et al.* (2001) conduziram seus estudos para os aspectos mecânicos do tecido dentinário, a fim de verificar as consequências do uso de hidróxido de cálcio na resistência flexural e módulo de elasticidade da dentina radicular. A medicação foi testada sobre barras de dentina pelo período de uma semana, tendo a exposição prévia, ou não, às soluções de hipoclorito de sódio a 3 e 5%, durante duas horas. Os resultados revelaram que hipoclorito de sódio (3 e 5%) reduziu significativamente o módulo de elasticidade e resistência flexural das amostras. A exposição ao hidróxido de cálcio promoveu redução significativa da resistência flexural mas não do módulo de elasticidade, e o uso sequencial de NaOCl e Ca(OH)₂ não promoveu um efeito enfraquecedor adicional. Sendo assim, como a dentina é composta de 22% de compostos orgânicos, por peso, e desta porção a maior parte consiste em colágeno, é sensato observar que o efeito de dissolução do NaOCl afetará a dentina, e que a redução na resistência flexural promovida pelo hipoclorito e pelo hidróxido de cálcio pode aumentar consideravelmente as chances de início e propagação de trincas no tecido dentinário, tornando as raízes propensas à fratura.

Andreasen *et al.* (2002) avaliaram o efeito do hidróxido de cálcio utilizado como medicação intracanal à longo prazo, em

relação ao aumento do risco de fratura radicular. Verificaram que na literatura é proposto que dentes permanentes jovens são enfraquecidos pelo uso da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio. Utilizaram para seu estudo incisivos de ovelhas, pois são facilmente obtidos, apresentam anatomia similar a dos dentes incisivos humanos, e tais animais são abatidos quando apresentam uma idade na qual todos os dentes incisivos estão presentes, porém com formação radicular incompleta. Foi avaliado o uso da medicação pelos períodos de 0,5, 1, 2, 3, 6, 9 e 12 meses. Os resultados demonstraram uma diminuição na resistência a fratura com o aumento do tempo de armazenamento, tornando visível o efeito negativo desta medicação sobre as propriedades mecânicas do tecido dentinário, atingindo 50% de redução após 1 ano de exposição. Períodos de até 30 dias de medicação parecem ser seguros, uma vez que, após este tempo de exposição não foram observadas reduções significativas nos valores de resistência a fratura radicular. O mecanismo pelo qual a dentina é enfraquecida pode ser explicado pela mudança na sua matriz orgânica, uma vez que, a resistência flexural deste tecido está na inter-relação dos seus dois principais componentes: cristais de hidroxiapatita e rede de colágeno. Parte da matriz orgânica é composta por proteínas ácidas e proteoglicanos. Tais substâncias atuam como agentes de união entre a rede de colágeno e os cristais de hidroxiapatita. O hidróxido de cálcio, devido ao seu pH alcalino, neutraliza, dissolve ou

desnatura alguns dos componentes ácidos que atuam como agentes de união, desse modo, enfraquecendo a dentina.

Holland *et al.* (2003) verificaram o processo de reparo, utilizando exames histológicos, após tratamento endodôntico em sessão única ou em duas sessões, com uso de hidróxido de cálcio por 7 ou 14 dias entre as sessões. Os melhores resultados foram obtidos nos grupos com tratamento em duas sessões, intercaladas com o uso de pasta de hidróxido de cálcio e propilenoglicol, durante 14 dias.

Em um estudo *in vitro* com o objetivo de avaliar a liberação de íons cálcio e o pH de pastas à base de hidróxido de cálcio, De Andrade Ferreira *et al.* (2004) utilizaram pasta Calen com paramonoclorofenol canforado, pasta LC (Lopes e Costa – hidróxido de cálcio com óleo de oliva) e pasta de hidróxido de cálcio pró análise com solução salina esterilizada. Os resultados demonstraram que a pasta calen e a pasta com solução salina promoveram os maiores valores de liberação de cálcio e os mais elevados níveis de pH.

Leonardo *et al.* (2006) compararam o reparo apical histológico de dentes de cães com lesão periapical. Os tratamentos endodônticos foram realizados em uma ou duas sessões. Quando em duas sessões, a medicação de escolha entre as intervenções foi a pasta Calen pelo período de 15 dias. Os resultados demonstraram um reparo significativamente melhor quando os dentes foram

tratados em duas sessões, utilizando a medicação intracanal entre elas. Nos casos realizados em sessão única os resultados não foram satisfatórios.

Para avaliar a resposta histológica dos tecidos periapicais Silveira *et al.* (2007) utilizaram dentes de cães com necrose pulpar e lesão periapical induzida por *Enterococcus faecalis*, realizando tratamentos endodônticos em sessão única ou duas sessões, aplicando como medicação intracanal o hidróxido de cálcio (HC+glicerina+PMCC – proporção de glicerina e PMCC de 1:1 em volume) durante 7 dias nos casos de tratamentos em duas sessões. A avaliação de 6 meses após tratamento demonstrou uma taxa de sucesso de 46% nos casos de dentes tratados em sessão única e de 74% nos casos de dentes tratados em duas sessões utilizando entre elas o hidróxido de cálcio como medicação intracanal. Tais resultados indicam que o uso da medicação intracanal eleva significativamente os índices de sucesso histológico.

Lana *et al.* (2009) avaliaram a efetividade do preparo biomecânico, curativo de demora com pasta calen e pasta calen com paramonoclorofenol canforado (PMCC) por 7 dias ou 14 dias na eliminação do *Enterococcus faecalis* em canais de dentes humanos extraídos. Concluíram que o uso de alguma das medicações foi mais eficaz do que apenas o preparo biomecânico. Quando associada a pasta calen por 7 ou 14 dias, foi atingido 70% de eliminação bacteriana do interior dos canais, e quando utilizada a

pasta calen + PMCC obtiveram uma redução de 100% da contaminação após 14 dias de medicação intracanal.

Maekawa *et al.* (2011) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a eficácia do hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina gel 2% como substâncias químicas auxiliares no combate a *Escherichia coli*, bem como a neutralização de suas endotoxinas por meio do uso de medicações intracanal. Os resultados demonstraram que ambas as substâncias químicas auxiliares foram efetivas no combate ao microrganismo e que a inativação das endotoxinas só foi alcançada com a utilização de medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio. Neste estudo foram utilizadas a pasta calen e a pasta de hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2% (proporção 1:1 em peso e volume) pelo período de 14 dias como medicação intracanal.

O objetivo do estudo de Arslan *et al.* (2014) foi avaliar o efeito de diferentes soluções irrigantes na remoção do hidróxido de cálcio, manipulado com clorexidina gel 2%, de canais radiculares, bem como, verificar a formação do precipitado castanho-alaranjado após o uso destas soluções. As soluções utilizadas para remoção da medicação foram o hipoclorito de sódio 1%, EDTA 17%, ácido maleico 7% e ácido cítrico 10%. Os resultados demonstraram que existe dificuldade para remoção completa da medicação do interior dos canais, sendo as soluções de ácido maleico e ácido cítrico significativamente mais efetivas na remoção do hidróxido de cálcio

+ clorexidina gel 2%, não apresentando diferenças entre si, e a formação do precipitado castanho-alaranjado foi verificada apenas nos grupos tratados com o hipoclorito de sódio 1%.

A cisteamina é um agente mucolítico utilizado para reduzir a viscosidade do muco por meio da ruptura das proteínas, que são também componentes importantes da matriz extracelular de biofilmes. O objetivo deste estudo foi determinar a eficácia da cisteamina isolada ou combinada ao hidróxido de cálcio no combate ao biofilme de *Enterococcus faecalis*, comparada a ação da clorexidina 2% + hidróxido de cálcio. O biofilme foi cultivado em discos de dentina por um período de 7 dias. Os resultados demonstraram que a cisteamina isolada erradicou por completo os biofilmes bacterianos na concentração de 200 mg/ml. A combinação do hidróxido de cálcio tanto com cisteamina a 10 mg/ml como com clorexidina 2% também foi satisfatória para a eliminação da contaminação, embora a CHX + HC tenha sido menos efetiva (Guo *et al.*, 2016).

Para autores como Kahler *et al.* (2017), o hidróxido de cálcio tem sido amplamente utilizado no tratamento endodôntico de dentes permanentes jovens, a fim de alcançar a cura periodontal e a formação de uma barreira apical. No entanto, tem sido observada uma maior incidência de fraturas radiculares cervicais em dentes tratados com hidróxido de cálcio à longo prazo, sendo a “fragilidade” radicular associada a alcalinidade desta medicação.

Porém, ao testar diferentes marcas comerciais de medicações à base de hidróxido de cálcio, e compará-las entre si e aos controles positivos e negativos, pelos períodos de 0, 3, 6 e 9 meses, os resultados demonstraram que tais medicações não são associadas à redução da resistência à fratura de dentes ovinos, sendo o estágio de desenvolvimento radicular mais relacionado à incidência de fraturas, do que o uso de medicação à base de hidróxido de cálcio.

Microdureza Dentinária

Reeh *et al.* (1989) pesquisaram a redução da rigidez dentária após procedimentos endodônticos e restauradores. Os resultados deste estudo demonstraram que procedimentos endodônticos são capazes de promover uma redução de apenas 5% na rigidez dentária, sendo assim não ocorre o enfraquecimento da estrutura dentária após o tratamento endodôntico.

Inúmeras pesquisas são conduzidas com o objetivo de verificar interações entre os irrigantes endodônticos e as propriedades mecânicas do tecido dentinário, como o módulo de elasticidade e resistência à flexão. Para Machnick *et al.* (2003), um irrigante ideal, além da capacidade antimicrobiana e biocompatibilidade, deve apresentar efeitos mínimos nas propriedades físicas do tecido dentinário, uma vez que alterações na microdureza dentinária podem predispor o elemento dentário à

fratura. O mesmo ocorre para a diminuição na resistência à flexão, aonde cargas menores já serão suficientes para conduzir à falha do tecido dentinário.

Oliveira *et al.* (2007) acreditam que a ação de irrigantes como hipoclorito de sódio e clorexidina na microdureza dentinária ainda não está bem estabelecida. Em seu estudo, utilizando raízes humanas extraídas, expostas durante 15 minutos as soluções de clorexidina 2% e NaOCl 1%, avaliaram os efeitos destas soluções na microdureza dentinária a 500 μm e 1000 μm da interface polpa/dentina. Os testes foram realizados com o dispositivo de microdurômetro, utilizando a escala Vickers. Ambas soluções diminuíram significativamente a microdureza dentinária quando comparadas ao grupo controle (solução salina), não apresentando diferenças estatísticas entre si. Valores menores de microdureza foram obtidos para distância de 500 μm comparadas a 1000 μm , porém sem diferenças significativas. Foi concluído que a clorexidina 2% e NaOCl 1% diminuem significativamente a microdureza dentinária a 500 e 1000 μm da interface polpa/dentina.

Para autores como Cruz-Filho *et al.* (2011) a redução da microdureza da superfície do canal é uma característica desejável. O uso de agentes quelantes durante o preparo biomecânico dos canais radiculares, promove a remoção da smear layer, aumenta a penetração das soluções irrigantes no interior dos túbulos dentinários melhorando a capacidade de desinfecção e, reduz a

microdureza dentinária facilitando a ação dos instrumentos endodônticos no interior dos canais. Neste estudo, com o objetivo de avaliar o efeito quelante de diferentes soluções na microdureza da superfície dentinária do canal radicular, utilizaram uma metodologia de corte longitudinal das raízes para o teste de microdureza. Foram utilizados 35 dentes humanos unirradiculares extraídos, divididos em 7 grupos, os quais tiveram o canal ampliado por meio de instrumentação mecanizada. Após a clivagem das raízes, a porção convexa de cada uma das metades foi planificada com pontas diamantadas em alta rotação, e a camada de dentina entre a luz do canal e a superfície externa de cimento foi desgastada em 45° com a finalidade de facilitar o polimento da superfície do canal, bem como sua visualização no dispositivo microdurômetro. As superfícies do canal foram polidas com discos de feltro e pasta de oxido de alumínio. Os canais foram expostos durante 5 minutos, de acordo com o grupo de tratamento, as seguintes soluções: EDTA 15%, ácido cítrico 10%, ácido málico 5%, ácido acético 5%, vinagre de maçã, citrato de sódio 10% e controle sem tratamento. A microdureza dentinária foi verificada através do indentador Knoop com 40x de magnificação sob uma carga de 10g durante 15 segundos. Foram realizadas 3 indentações ao longo eixo de cada metade radicular, sendo a primeira a 1µm da entrada do canal e as demais distantes 200µm entre si. O valor de microdureza representativo de cada amostra foi obtido por meio da média das 3

indentações. Os dados foram analisados por meio da análise da variância seguido pelo teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, ao nível de 5% de significância. Como conclusão, exceto para o citrato de sódio, todos os agentes quelantes diminuíram a microdureza da dentina da superfície do canal, sendo o EDTA e o ácido cítrico as soluções mais efetivas.

O estudo de Aslantas *et al.* (2014) avaliou o efeito de diferentes soluções irrigadoras na microdureza dentinária do canal radicular. Os autores utilizaram raízes distais de terceiros molares inferiores, divididas em duas metades, uma vestibular e uma lingual. As raízes foram incluídas em resina acrílica mantendo a porção dentinária do corte exposta. A microdureza dentinária foi aferida pré e pós tratamento, por meio do dispositivo microdurômetro utilizando a escala Vickers, com 250 vezes de magnificação a uma profundidade de 300 μm da interface polpa/dentina. Foram realizadas 3 indentações utilizando uma carga de 300g por um período de 20 segundos nos terços médios radiculares. Os tratamentos foram realizados durante 5 minutos com 5 ml das seguintes soluções: EDTA 17%, EDTA 17% contendo 0,84g de cetrimida, NaOCl 6%, NaOCl 6% + modificador de superfície, CHX 2%, CHX 2% + modificador de superfície. Os resultados demonstraram que a adição de modificadores de superfície falhou em alterar significativamente a microdureza dentinária quando comparada ao uso sozinho dos irrigantes. Além

disso, EDTA e NaOCl reduziram significativamente a microdureza dentinária do canal radicular. Ainda, o EDTA, na presença e ausência de surfactantes, promoveu uma significativa maior redução da microdureza dentinária quando comparado a CHX e NaOCl.

Resistência de União

Prado *et al.* (2013) realizaram um estudo para verificar o efeito de diferentes protocolos de irrigação na resistência de união de cimentos resinosos a dentina. Foram utilizados 180 pré-molares unirradiculares. As unidades experimentais foram divididas em 18 grupos de 10, e diferentes protocolos de irrigação foram utilizados. As raízes foram secas com cones de papel e os grupos 1 a 9 foram preenchidos com cones de guta-percha + AH plus enquanto os grupos 10 a 18 foram preenchidos com Resilon + Real Seal SE. O System B foi utilizado para corte e condensação da obturação e o Sistema Obtura utilizado para preenchimento do canal. Após o teste do push-out as amostras foram divididas em duas metades e avaliadas em microscópio eletrônico de varredura para determinação do padrão de falha do material obturador de acordo com a porcentagem de substrato livre de material obturador (falha adesiva = mais de 75% de substrato livre, falha coesiva = menos de 25% de substrato livre e falha mista = mais de 25 e menos de 75%

de substrato livre). Os resultados demonstraram que nos grupos gutta-percha/AH plus os maiores valores de adesão foram obtidos com a associação de hipoclorito e ácido fosfórico ou clorexidina e EDTA. Para os grupos Resilon/Real Seal SE maiores valores de adesão foram observados quando a clorexidina foi utilizada como irrigante durante o preparo principalmente quando associada ao ácido fosfórico. O uso de uma irrigação final com clorexidina em ambas técnicas de obturação não afetou a resistência de união. Em relação ao padrão de falha nos grupos gutta-percha/AH plus foi verificada principalmente falha coesiva enquanto que nos grupos Resilon/Real Seal SE ocorreu o padrão de falha adesiva. Como conclusão os protocolos de irrigação interferem na resistência de união dos cimentos resinosos a dentina.

Para Ok *et al.* (2013) uma solução irrigante ideal deveria eliminar os microrganismos do sistema de canais, dissolver tecido orgânico, não tendo efeitos negativos na resistência de união dos cimentos endodônticos às paredes dentinárias do canal. Portanto, o objetivo de seu estudo foi avaliar e comparar o efeito do hipoclorito de sódio 5,25%, solução de clorexidina 2% e desinfecção foto ativada com azul de toluidina 0,01% na resistência de união do cimento endodôntico AH plus às paredes do canal radicular, por meio do teste do *push out*. Foram utilizadas 15 raízes de pré-molares apresentando apenas um canal, seccionadas e padronizadas no comprimento de 15 mm. Os canais foram ampliados e as raízes

foram então divididas em 3 grupos (n=5): G1 – terapia fotodinâmica, G2 – clorexidina 2% e G3 – grupo controle (NaOCl + EDTA). Foram obtidos dois discos de dentina com 1mm de espessura dos terços cervical e médio de cada unidade experimental (20 fatias por grupo) e submetidos ao teste do *push out*. Os resultados não demonstraram diferenças estatísticas significativas em relação a resistência de união do cimento endodôntico às paredes do canal para os diferentes protocolos de descontaminação.

Para se avaliar o efeito de diferentes técnicas de ativação da irrigação final na resistência de união de um cimento endodôntico a base de resina epoxy, foram utilizados 80 pré-molares humanos extraídos. Os dentes foram preparados e divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=20) e irrigados com 5mL de NaOCl 3% e 5mL de EDTA 17% de acordo com os protocolos de ativação: Controle (sem ativação), MDA (ativação manual com cone de gutta F4), CB (ativação com CanalBrush) e UA (ativação ultrasônica), durante 1 minuto para cada irrigante. As amostras foram secas com cones de papel e obturadas pela técnica do cone único com cimento AH plus e cones de gutta-percha F4. Após o push-out os modos de falha também foram analisados (microscópio óptico, 30x) e classificados: falha adesiva (cimento-dentina), falha coesiva (dentro do cimento) e mista. Os resultados do push out revelaram que o terço coronário apresentou os maiores valores de resistência de união, principalmente para o grupo UA, enquanto

que no terço apical os maiores valores ocorreram no grupo MDA. A falha coesiva foi a mais frequente entre os grupos, exceto na região apical do grupo MDA, onde a falha foi predominantemente mista. Como conclusão verificou-se que a ativação ultrassônica na irrigação final melhora a resistência de união do cimento AH plus a nível de terço coronário e médio e o mesmo ocorre a nível de terço apical quando aplicada a ativação manual da irrigação final (Topcuoglu *et al.*, 2014).

Graziele Magro *et al.* (2014) avaliaram a interação entre hipoclorito de sódio e inúmeras formulações contendo clorexidina e seus efeitos na dentina radicular através de MEV e push-out. As amostras dentárias foram divididas aleatoriamente em 5 grupos: G1: controle (sem clorexidina), G2: solução de clorexidina 2%, G3: gel de clorexidina 2%, G4: Concepsis (formulação de clorexidina da Ultradent) e G5: clorexidina plus (formulação com surfactante p reduzir tensão superficial). As formulações de clorexidina foram mantidas no canal durante 3 minutos. Em seguida os dentes foram clivados para análise em MEV nos segmentos cérvico-mediano e mediano-apical e scores foram obtidos. Para análise de push-out os grupos foram divididos da mesma maneira citada anteriormente, e após os protocolos foram secados e obturados pela técnica do cone único com cone de gutta-percha F5 e cimento AH plus. Após o teste de push-out os padrões de falha foram analisados em microscópio ótico com 40x de magnificação e classificados em: falha adesiva

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

Ao realizar um estudo Dias *et al.* (2014) compararam a resistência de união de cimentos endodônticos resinosos a dentina, utilizando álcool isopropílico a 70% como irrigante final, com o objetivo de secagem do canal, comparado as pontas de papel absorvente. Foram utilizados para o estudo, 80 dentes divididos em dois grupos de 40 conforme o protocolo de secagem, em seguida subdivididos em grupos com n=10, conforme o material obturador utilizado: AHplus/gutta-percha; Hybrid Root Seal/gutta-percha; EpiphanySE/gutta-percha e EpiphanySE/resilon. Os resultados

demonstraram que nos grupos onde foi utilizado álcool isopropílico ocorreram os maiores valores de resistência de união. Dentre os grupos com diferentes cimentos utilizados, o AH plus demonstrou os maiores valores de resistência de união, com o padrão de falha coesiva como o mais frequente. Como conclusão, os autores acreditam que uma irrigação final com EDTA e álcool isopropílico a 70% melhora a resistência de união e a penetração dos cimentos endodônticos no interior dos túbulos dentinários do canal radicular.

(Albino Souza *et al.* (2017)) verificaram a eficácia de diferentes protocolos de descontaminação final, e sua influência na resistência de união do material obturador a dentina radicular de dentes humanos extraídos. Dentre os protocolos testados estavam a clorexidina 2% e o extrato de semente de uva na concentração de 6,5%. Os resultados demonstraram que as medicações não interferiram na resistência de união do material obturador.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo tem como objetivos:

- Verificar a efetividade da clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio, extrato de semente de uva, hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2% e extrato de semente de uva + clorexidina gel 2% no combate ao biofilme de *Enterococcus faecalis* após o período de 15 dias de contato, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias.

- Verificar a influência da clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio, extrato de semente de uva, hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2% e extrato de semente de uva + clorexidina gel 2% utilizados como medicação intracanal durante 15 dias, na microdureza do tecido dentinário após o período de medicação, e na resistência de união do material obturador a dentina radicular, nos períodos de 21 dias após a obturação e 12 meses após a obturação.

As hipóteses testadas foram:

- As medicações intracanal são efetivas no combate ao biofilme *Enterococcus faecalis* após o período de 15 dias de contato.

- As medicações intracanal não influenciam na microdureza do tecido dentinário e também não influenciam na resistência de união do material obturador a dentina radicular após os períodos de 21 dias e 12 meses após a obturação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo pela plataforma Brasil, e tem o parecer aprovado, número 2.033.198.

Obtenção das Amostras

Cento e vinte e seis dentes unirradiculares humanos extraídos foram obtidos do Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo (UPF). Os dentes foram congelados e armazenados até o início do experimento, no intuito de preservar as propriedades dos tecidos dentários. Dos 126 dentes, 60 foram destinados ao teste microbiológico e 36 para o teste de resistência de união (18 para análise após 21 dias da obturação e 18 para análise após 1 ano de armazenamento). As 30 raízes restantes do total de 126, foram utilizadas para o teste de microdureza. Sendo assim, não foram utilizadas amostras contaminadas com *Enterococcus faecalis* durante os ensaios mecânicos, excluindo a possibilidade de infecções cruzadas.

Preparo das Amostras para o Teste Microbiológico

As porções coronárias das 60 amostras foram seccionadas na junção amelocementária, de forma que o remanescente radicular apresentasse um comprimento padrão de 15mm. Foi utilizado para o corte, um disco de diamante dupla-face (modelo 1802.7015, KG Sorensen, Cotia-SP, Brasil), acoplado na peça reta de baixa rotação, utilizando água para refrigeração.

O comprimento de trabalho foi definido pela introdução de uma lima do tipo K #10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) até que a mesma fosse visualizada no forame apical, subtraiu-se 1 milímetro desta medida. As amostras foram instrumentadas por meio do sistema ProTaper Next (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) seguindo a sequência de limas X1, X2 e X3, complementado com o preparo das limas X4 e X5 do mesmo sistema. Todos os instrumentos foram utilizados no comprimento de trabalho com velocidade de 250 rpm e torque de 2 N, no motor X-Smart Plus (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). As soluções irrigantes utilizadas para o preparo foram o hipoclorito de sódio (NaOCl) na concentração de 2,5% (Natupharma, Passo Fundo-RS, Brasil) - 2 ml a cada troca de instrumento, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTAT) na concentração de 17% (Fórmula e Ação, São Paulo-SP, Brasil) - 5 ml durante 1 minuto e irrigação final com solução fisiológica esterilizada - 5 ml.

Após realizado o preparo dos canais radiculares, as raízes tiveram a superfície externa da extremidade apical hibridizada pela técnica adesiva utilizada para restaurações com resinas compostas com o adesivo Scotchbond Universal (3M ESPE, Neuss, Germany) (Franz *et al.*, 2018), e os forames apicais foram selados com resina composta fotopolimerizável para esmalte, cor A2, Z350 (3M/ESPE, St. Paul, MN, USA), formando um capuz com o material em torno do ápice da amostra. Também foi realizada a impermeabilização da superfície externa das raízes com duas camadas de adesivo cianocrilato, SuperBonder (Henkel, São Paulo, SP, Brasil), aplicadas com pincel, respeitando o período de 30 minutos entre as aplicações. Em seguida as amostras foram fixadas com massa de silicone para impressão, pasta densa (Speedex – Coltene, New York, EUA), em um micro tubo de plástico de 1,5 ml (eppendorf), de modo que a raiz permanecesse na posição vertical voltada para cima, com a massa de silicone envolvendo-a até seu terço médio (Figura 1).

As amostras foram divididas aleatoriamente em seis grupos (n=10), e armazenadas em uma caixa de polipropileno (Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, Estados Unidos) (Figura 1). Após, as unidades experimentais foram esterilizadas em autoclave a 120⁰ C durante 30 minutos.



Figura 1: Raíz fixada com sílica pesada no interior de um eppendorf e caixa de polipropileno com amostras posicionadas.

Controle de Esterilização

Dois dentes de cada grupo foram selecionados aleatoriamente e submetidos ao controle de esterilização. Cada amostra selecionada foi irrigada com solução fisiológica esterilizada, e um cone de papel esterilizado com calibre #30 (Tanari, Manaus, AM, Brasil) foi colocado e mantido durante 30 segundos no interior de cada canal e em seguida transportados individualmente para tubos eppendorf (Axygen Inc, Union City, CA, EUA) identificados, contendo 1 ml de água solução salina

esterilizada. O material foi homogeneizado e semeado em placas de petri com meio de cultura PCA (Plate Count Agar) pela técnica das cinco gotas gota (pinga-se 5 gotas de 15 μ L de cada amostra). As amostras foram incubadas a 37^o C durante 48 horas, a fim de verificar o crescimento bacteriano. As amostras selecionadas para controle bacteriano foram novamente distribuídas entre os grupos. O procedimento de controle de esterilização foi realizado sob condições estéreis no interior de uma câmara de fluxo laminar, prevenindo qualquer possibilidade de contaminação das amostras.

Preparo do Inóculo

A cepa bacteriana utilizada foi *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), obtida no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo (ICB). As bactérias foram ativadas e cultivadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) durante 24 horas a 37°C em estufa bacteriológica. Após o período de incubação, o grau de turbidez do inóculo foi ajustado de acordo com a escala 1,0 de MacFarland, que corresponde a 3,0 x 10⁸ UFC/ml, referente a uma densidade óptica de 0,25 a 550 nm.

Contaminação dos Canais Radiculares

Em cada uma das 60 amostras previamente esterilizadas, foi realizada a inoculação, com auxílio de seringas descartáveis esterilizadas de 1 mL, preenchendo completamente os canais radiculares com a suspensão de *Enterococcus faecalis*. Essa cultura de *Enterococcus faecalis* foi mantida nos canais durante 15 dias, com renovação do meio de cultura a cada 48 horas para garantir o crescimento e o desenvolvimento bacteriano.

A cada 48 horas, seis dentes (1 de cada grupo) aleatoriamente escolhidos foram submetidos ao controle microbiano para verificar somente o crescimento de *Enterococcus faecalis*, e ausência de contaminação por outras espécies. Nestas amostras escolhidas, um cone de papel esterilizado com calibre #30 (Tanari, Manaus, AM, Brasil) era introduzido no canal radicular e mantido durante 30 segundos, com movimentos circulares, tocando as paredes do canal. Após, o cone foi transferido para um microtubo de plástico esterilizado contendo 1 ml de solução fisiológica esterilizada, e a coleta foi homogeneizada em um agitador, a fim de então realizar a semeadura por meio da técnica das 5 gotas, em placas de Petri contendo PCA. As placas foram incubadas a 37°C durante 48h, e após este período foi verificada a morfologia das UFCs cultivadas, e também realizada a coloração de Gram, confirmando a contaminação por apenas *Enterococcus*

faecalis (Figura 2). Todos os procedimentos foram realizados sob condições de assepsia em uma capela de fluxo laminar.

Após o período de contaminação, na etapa de coleta, as amostras foram irrigadas com solução fisiológica esterilizada, a qual teve a função de fluido de transferência.

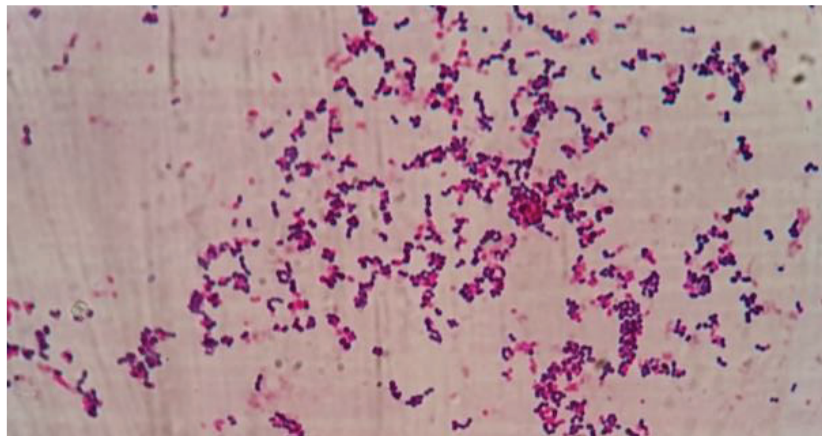


Figura 2: Enterococcus faecalis, coloração de Gram.

Coleta Inicial

Decorrido o período de contaminação (15 dias), foi introduzida uma ponta de papel absorvente esterilizada de calibre #30 no canal radicular de cada amostra, realizando movimentos circulares a fim de tocar intencionalmente em todas as paredes do canal, pelo período de 30 segundos. Depois disso, a ponta de papel absorvente foi transferida para um microtubo contendo 1 ml de

solução fisiológica esterilizada. O material foi homogeneizado e diluído na 10^{-3} . Alíquotas dos materiais foram semeadas em placas de Petri contendo PCA, por meio da técnica das cinco gotas, no local correspondente da diluição utilizada (Figura 3). As placas foram identificadas como coleta inicial e incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 37°C . Após o período de incubação, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias (coleta inicial). Todas as contagens foram realizadas na diluição 10^{-3} .

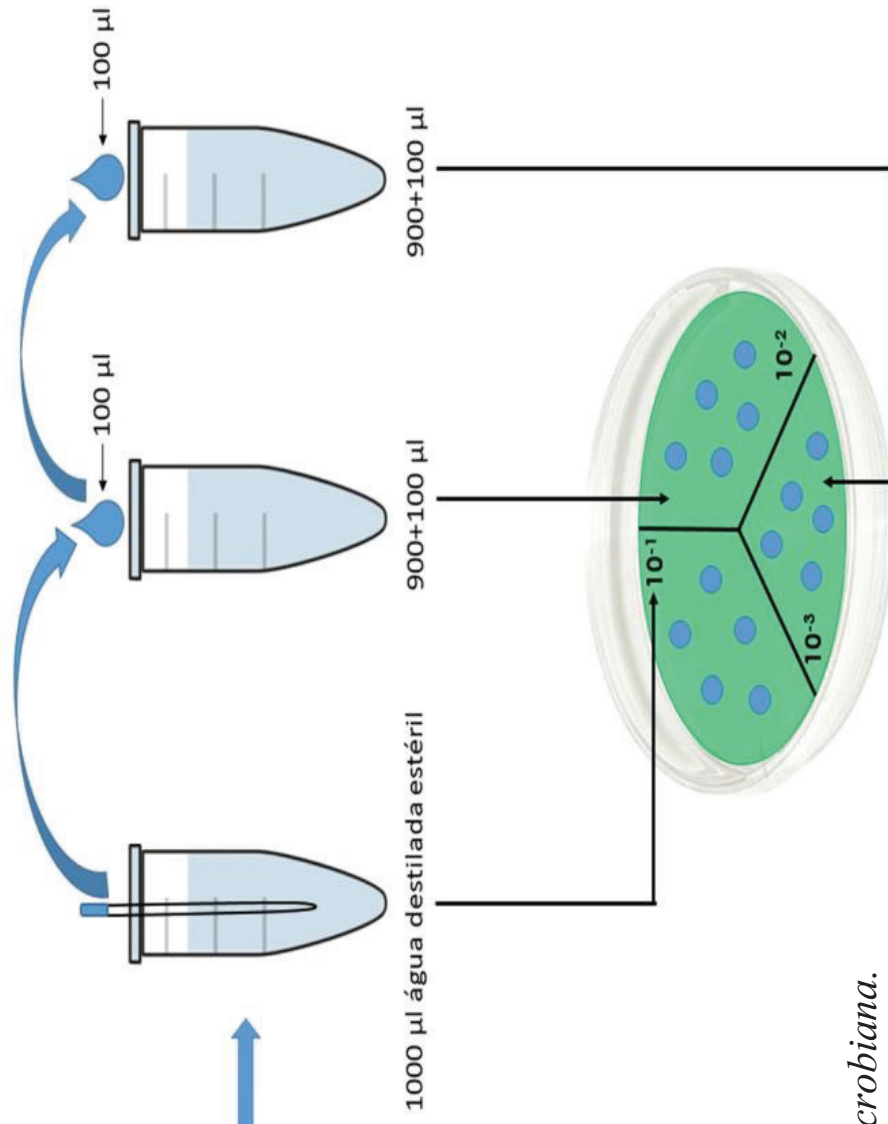


Figura 3: Esquema de coleta microbiana.

Classificação dos Grupos de Tratamento

Após a realização da contaminação com *Enterococcus faecalis* e coleta inicial, as amostras de cada grupo (n=10) foram expostas as medicações intracanal de acordo com a divisão dos grupos a seguir:

1. Soro – solução fisiológica esterilizada (controle): preenchimento dos canais com solução fisiológica esterilizada.
2. CHX – clorexidina gel 2%: preenchimento dos canais com clorexidina gel 2%.
3. Ca(OH)₂+Soro – hidróxido de cálcio PA: preenchimento dos canais com pasta de hidróxido de cálcio PA + veículo solução fisiológica esterilizada, proporção de 1g de pó para 1ml de veículo (Maekawa *et al.*, 2011), levado ao interior dos canais com auxílio de broca lentulo #30 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça).
4. GSE+Soro – extrato de semente de uva: preenchimento dos canais com pasta de extrato de semente de uva (cápsulas com 65mg de pó do extrato - Healthy Origins, Pittsburgh, PA, Estados Unidos) + veículo solução fisiológica esterilizada, proporção de 1g de pó para 1ml de

veículo, levado ao interior dos canais com auxílio de broca lentulo #30.

5. Ca(OH)₂+CHX - hidróxido de cálcio PA + clorexidina gel 2%: preenchimento dos canais com pasta composta por estes dois componentes, na proporção de 1g de pó para 1ml de gel, levado ao interior dos canais com auxílio de broca lentulo #30.
6. GSE+CHX – extrato de semente de uva + clorexidina gel 2%: preenchimento dos canais com pasta composta por estes dois componentes, na proporção de 1g de pó para 1ml de gel, levado ao interior dos canais com auxílio der broca lentulo #30.

Após a aplicação das medicações, as raízes tiveram a entrada dos canais fechadas com bolinhas de algodão esterilizadas, e foram armazenadas em estufa bacteriológica, com temperatura e umidade constantes (imersos em água, com renovação a cada semana). As medicações permaneceram em contato com os condutos pelo período de 15.

Coleta Final

Após o período de contato com as medicações, cada canal foi irrigado com 5ml de solução fisiológica esterilizada, a qual

também exerceu a função de fluido de transferência. Um cone de papel absorvente esterilizado calibre #30, foi introduzido no interior de cada canal e agitado de maneira circunferencial com toque intencional nas paredes, durante 30 segundos. Após, cada cone de papel foi transferido para um microtubo contendo 1ml de solução fisiológica esterilizada. O material foi homogeneizado e diluído na 10^{-3} . Alíquotas desta suspensão foram semeadas em placas de petri com meio de cultura PCA, pela técnica das cinco gotas. As gotas foram depositadas no local correspondente a diluição utilizada, conforme realizado na coleta inicial. Estas placas, identificadas como coleta final, foram incubadas durante 24 horas a 37°C . Após o período de incubação, foi realizada a contagem do número de UFCs.

Preparo das Amostras para as Análises de Resistência de União

Trinta e seis raízes foram utilizadas para esta etapa da pesquisa, sendo 18 destinadas aos grupos sem tempo de armazenamento, e 18 destinadas aos grupos de 12 meses de armazenamento. As 18 raízes utilizadas para cada período foram divididas aleatoriamente em 3 por grupo.

A ampliação dos canais foi realizada com instrumentos rotatórios, conforme descrito na etapa microbiológica desta tese, com o preparo adicional de brocas largo I, II e III, afim de se obter

um canal cilíndrico com diâmetro aproximado de 1,3mm. Nesta fase, as unidades experimentais não passaram pela etapa de contaminação, sendo diretamente expostas as medicações conforme descrito anteriormente na divisão dos grupos de tratamento.

Para a análise de resistência de união, após o período de 15 dias de contato com as medicações, os canais foram irrigados com solução fisiológica esterilizada, e os remanescentes das medicações foram removidos com auxílio de uma lima do tipo K-flex #30 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). No momento em que não foi mais visualizado nenhum remanescente de medicação durante a irrigação da raiz, a mesma foi mantida preenchida pelo irrigante, e uma ativação ultrassônica do irrigante foi realizada. Foram utilizados para o protocolo de irrigação passiva ultrassonificada o aparelho de ultrassom (Profi II Ceramic, Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP – Brasil) na potência de 50%, no qual foi acoplado o adaptador e ponta para ativação ultrassônica de irrigante dos canais (adaptador AU-03 e ponta TRA12, Trinks, São Paulo, SP – Brasil). O inserto ultrassônico foi posicionado 2 mm aquém do comprimento de trabalho e a ativação foi realizada em 3 ciclos de 20 segundos, com renovação da solução fisiológica a cada ciclo (Simezo *et al.*, 2017).

Após a remoção das medicações do interior dos canais, os condutos foram secados com cones de papel esterilizados F5

(Dentsply Industria e Comércio Ltda, Petrópolis-RJ, Brasil) do sistema ProTaper (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) e obturados pela técnica híbrida de Tagger (Cohen, 2011): aplicação de cimento obturador (AH plus, Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany) no cone principal de guta-percha (F5-Sistema ProTaper, Dentsply Industria e Comércio Ltda, Petrópolis-RJ, Brasil), calibrado no comprimento de trabalho, posicionamento do cone previamente calibrado no interior do canal radicular, nova aplicação de cimento no cone principal e reposicionamento do mesmo no interior do canal radicular. Em seguida, 2 a 3 cones acessórios XF (Dentsply Industria e Comércio Ltda, Petrópolis-RJ, Brasil) foram introduzidos com auxílio de um espaçador digital “B” (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). Após a colocação dos cones de guta-percha, um compactador termomecânico de diâmetro #45, de 21mm de comprimento (McSpadden, Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), calibrado 5mm aquém do comprimento de trabalho, foi posicionado no interior do canal e acionado com rotação no sentido horário até o momento em que a guta-percha ficasse em estado plástico. Após a plastificação da guta-percha, o condensador ainda em movimento, foi removido do canal, e a condensação vertical, com um calcador de Paiva número 2 (SS White Duflex, Juiz de Fora, MG – Brasil) foi realizada.

Após a obturação, foi realizado o corte do excesso de gutapercha com auxílio da broca Largo III em baixa rotação (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça).

Depois de obturadas, as amostras tiveram o primeiro milímetro de cada canal selado com cimento obturador provisório (Villevie, Joinville/Santa Catarina, Brasil) e em seguida foram armazenadas no interior de uma estufa com temperatura constante de 37⁰C, submersas em solução fisiológica esterilizada, a qual foi renovada uma vez a cada 7 dias.

Decorridos 21 dias de armazenamento, três raízes de cada grupo foram fixadas com cera pegajosa em uma placa de acrílico (60x20x3mm) para que pudessem ser posicionadas em uma cortadeira metalográfica. Foram realizadas secções horizontais nas raízes, obtendo-se um total de cinco fatias com aproximadamente 1mm de espessura de cada raiz, totalizando 15 discos de dentina e material obturador por grupo (n=15) após 21 dias de armazenamento. Estes discos de dentina foram submetidos ao teste de *pushout* por meio de uma máquina de ensaios universais (EMIC). O mesmo procedimento foi realizado para as 18 raízes restantes, três de cada grupo, após decorridos 12 meses da obturação.

Para o teste de pushout, os discos de dentina e material obturador de cada grupo foram posicionados com a parte cervical do corte voltada para baixo sobre a mesa (perfurada no centro) do

dispositivo. Uma força vertical de cima para baixo foi aplicada perpendicularmente ao material obturador por meio de um pistão metálico, o qual apresenta secção circular, cobrindo a maior área de material obturador possível sem tocar as paredes de dentina (1mm de diâmetro). O pistão metálico estava conectado a uma célula de carga de 200N, a qual estava conectada a máquina de ensaios universais (Emic). O teste foi realizado com uma velocidade de 1mm por minuto e a carga aplicada até que ocorresse a extrusão do fragmento de material obturador, obtendo-se no computador conectado à máquina a medida de força em newtons necessária para o seu deslocamento (Figura 4).



Figura 4: Disco de dentina sendo submetido ao teste de pushout.

Após os testes de *pushout* os discos de dentina foram levados para o Laboratório de Metalografia da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade de Passo Fundo, aonde

puderam ser observados no microscópio óptico Zeiss acoplado ao computador, de forma que em um aumento de 50x visualizado no monitor do dispositivo fosse possível medir o perímetro do canal na porção cervical e apical do disco de dentina (Figura 5).

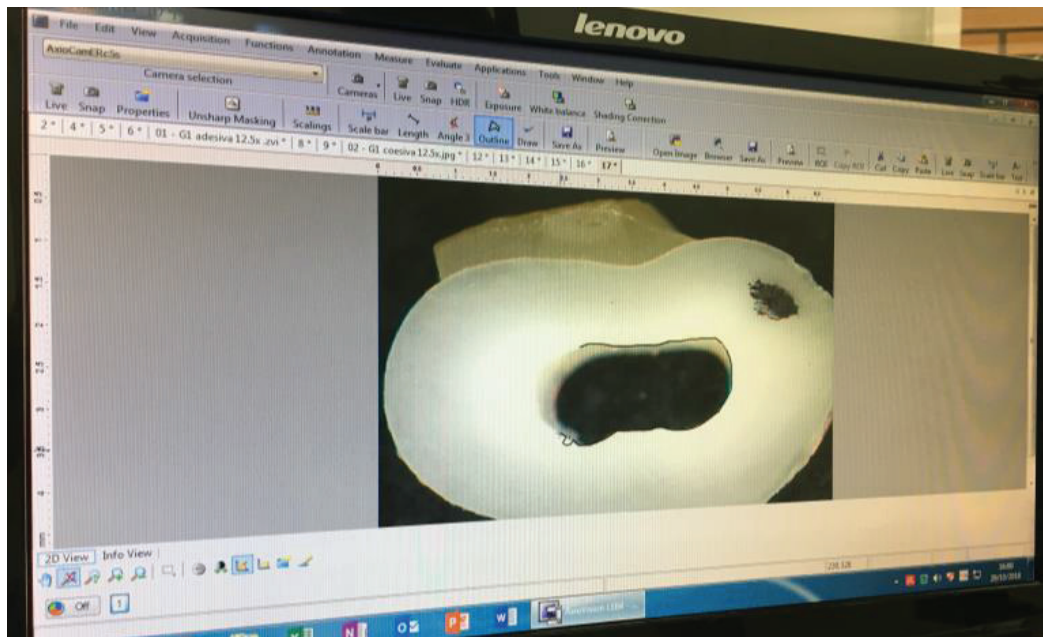


Figura 5: Medida do perímetro dos canais radiculares. Laboratório de Metalografia, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade de Passo Fundo.

A medida do perímetro foi inserida na fórmula $C=2\pi R$, obtendo-se desta maneira, uma medida média dos raios. Esta média dos raios foi utilizada para o cálculo da área lateral do tronco do cone, utilizando a fórmula, conforme descrito no trabalho de Dias *et al.* (2014):

$$A = \pi.(R+r).[h^2 + (R-r)^2]^{0,5}.$$

A resistência de união foi calculada em Mega Pascal (Mpa), por meio da divisão da força obtida no teste de pushout pela área de superfície do canal. No mesmo momento, no microscópio óptico, foram observados e classificados os padrões de falha (Figura 6) no material obturador em:

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

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

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

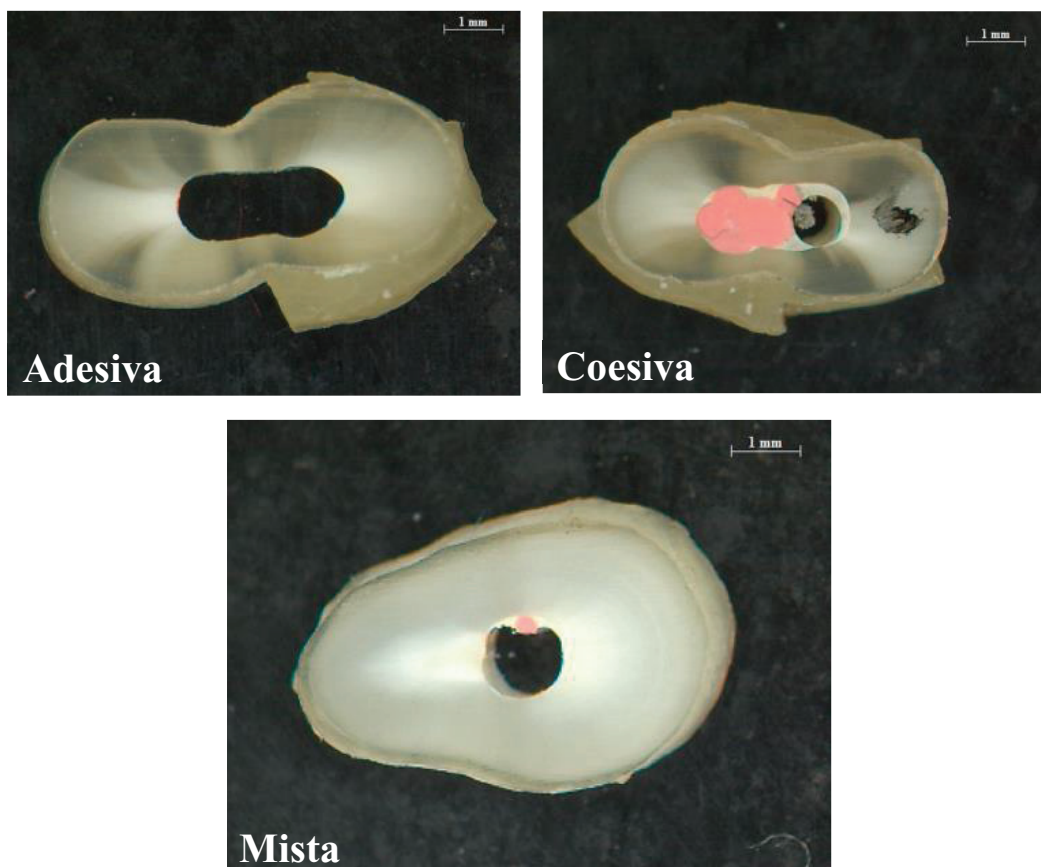


Figura 6: Padrões de falha do material obturador.

Preparo das Amostras para a Análise de Microdureza

Para os testes de microdureza foram utilizadas 30 raízes, divididas aleatoriamente entre os 6 grupos de tratamento. A ampliação dos canais foi realizada com instrumentos rotatórios, conforme descrito na etapa microbiológica desta tese. Nesta fase, as unidades experimentais também não passaram pela etapa de contaminação, sendo diretamente expostas as medicações conforme descrito na divisão dos grupos de tratamento.

Após 15 dias de contato com as medicações, estas foram removidas dos canais, da mesma maneira descrita para a realização do teste de resistência de união.

O preparo das amostras para o teste de microdureza seguiu o trabalho descrito por Cruz-Filho *et al.* (2011). Sulcos foram confeccionados nas superfícies externas vestibular e lingual/palatina com o uso de um disco de dupla face (mesmo utilizado para a secção das porções coronárias) acoplado a peça reta e micromotor. Com auxílio de um cinzel as raízes foram clivadas, obtendo-se desta maneira duas metades, e um n=10 para o teste de microdureza. As superfícies dentinárias expostas após a clivagem das raízes foram desgastadas com ponta diamantada em alta rotação em uma angulação de 45⁰, a fim de facilitar a visualização e polimento da luz do canal radicular. As metades radiculares foram colocadas sobre uma bancada com a luz do canal voltada

para baixo, após foram cobertas por resina acrílica autopolimerizável e prensadas com uma placa de vidro, obtendo assim uma base plana, mas mantendo a superfície da luz do canal exposta. Após montadas nas bases de resina acrílica, as amostras tiveram as superfícies dentinárias da luz do canal polidas com disco de feltro e pasta de óxido de alumínio.

A tentativa de indentação na luz do canal fracassou devido a irregularidade das paredes dos canais radiculares, aonde foram encontradas inúmeras regiões de “pico” e “vale”, o que impossibilitou a visualização do defeito causado pelo indentador, e conseqüentemente sua medida. Diante disso, para não ocorrer a perda das amostras preparadas, foi selecionada a superfície de dentina transversal ao longo eixo do elemento dentário, na altura do terço médio da raiz. Dessa forma, as unidades experimentais foram seccionadas transversalmente ao longo eixo da raiz, 5mm contados da embocadura do canal em direção apical, expondo a região transversal do terço médio radicular.

Inúmeros estudos na literatura descrevem a metodologia de realização das indentações na superfície transversal. Os testes seguiram a metodologia já descrita nestes estudos (Slutzky-Goldberg *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2007; Aslantas *et al.*, 2014), sendo realizadas 3 indentações com uma carga de 10g durante 15 segundos em cada amostra. A primeira indentação foi executada em uma profundidade de 500µm da superfície do canal radicular

em direção ao tecido cementário, e as demais distantes 200µm da primeira, uma em direção vestibular e outra em direção palatina/lingual.

Para realização do teste, as amostras foram fixadas verticalmente em uma mini morsa. O indentador de escolha foi o de Knoop, sendo realizadas 3 indentações (Figura 7), cuja média foi o valor de microdureza utilizado para a análise estatística, conforme descrito por Cruz-Filho *et al.* (2011).

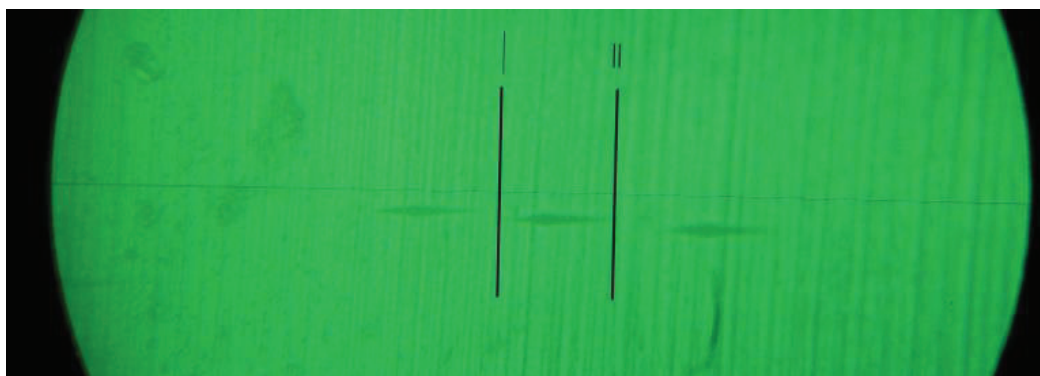


Figura 7: Indentações.

Análise Estatística

Para a etapa microbiológica do estudo, foram calculados os percentuais de redução de *Enterococcus faecalis* a partir da contagem inicial e final de unidades formadoras de colônias nos diferentes grupos de tratamento, utilizando a seguinte fórmula:

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

A capacidade de desinfecção das medicações intracanal foi verificada por meio da comparação das médias dos percentuais de redução bacteriana, utilizando o teste one-way ANOVA seguido pelo post-hoc de Tukey.

Os dados de resistência de união não passaram no teste de normalidade, então foi realizada análise estatística de Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos e teste de comparação de Student-Newman-Keuls.

Os padrões de falha do material obturador após o teste do *pushout* foram analisados pelo teste chi-quadrado.

Os valores de microdureza foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo post-hoc de Tukey.

Todas as análises utilizaram um nível de significância de 5%, e os dados foram analisados utilizando o programa SigmaPlot versão 11.0 (Systat Software, Inc, Chicago, IL, Estados Unidos).

5 RESULTADOS

A média e desvio padrão dos percentuais de redução de *Enterococcus faecalis* estão expressas na Tabela 1.

Tabela 1: Média \pm desvio padrão do percentual de redução de *Enterococcus faecalis* após exposição aos grupos de tratamento.

Grupo	N	Redução Bacteriana* (%)
1. Soro	10	29,32 \pm 1,76 ^C
2. CHX	10	89,78 \pm 1,99 ^B
3. Ca(OH)2 + Soro	10	91,29 \pm 1,43 ^B
4. GSE + Soro	10	92,96 \pm 2,07 ^B
5. Ca(OH)2 + CHX	10	98,25 \pm 1,28 ^A
6. GSE + CHX	10	99,15 \pm 1,14 ^A

*Valores seguidos de letras diferentes na coluna são estatisticamente diferentes.

Todas as medicações testadas foram efetivas no combate ao biofilme de *Enterococcus faecalis*, apresentando mais de 90% de redução bacteriana. As medicações à base de extrato de semente

de uva e hidróxido de cálcio, quando manipuladas com o veículo clorexidina gel 2%, apresentaram os maiores percentuais de redução microbiana ($p < 0,05$), atingindo valores superiores a 98%.

Foi encontrada diferença estatística nos valores de resistência de união entre os grupos experimentais ($p < 0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de mediana e intervalo interquartil (IQ) da resistência de união do material obturador a dentina radicular nos dois intervalos de tempo.

Grupo	Resistência de União* (MPa)	
	Tempo 0	Tempo 12 meses
1. Soro	0,74 / 0,34 ^B	0,21 / 0,14 ^C
2. CHX	0,51 / 1,02 ^B	2,94 / 2,05 ^A
3. Ca(OH)2 + Soro	1,19 / 1,41 ^B	2,60 / 2,17 ^A
4. GSE + Soro	2,59 / 2,59 ^A	3,00 / 1,05 ^A
5. Ca(OH)2 + CHX	0,69 / 0,61 ^B	0,62 / 0,72 ^B
6. GSE + CHX	2,98 / 2,9 ^A	2,80 / 1,85 ^A

*Valores seguidos de letras diferentes tanto na coluna como na linha são estatisticamente diferentes.

Nas amostras avaliadas sem período de armazenamento, o extrato de semente de uva foi a medicação intracanal que resultou nos maiores valores de resistência de união do material obturador

a dentina radicular, não apresentando diferenças significativas quanto ao veículo utilizado, clorexidina gel 2% ou solução fisiológica esterilizada. Após um período de 12 meses de armazenamento com temperatura e umidade constantes, as medicações intracanal: clorexidina gel 2% e extrato de semente de uva, independente do veículo utilizado, não apresentaram diferenças significativas, resultando nos maiores valores de resistência de união do material obturador a dentina radicular, juntamente com o hidróxido de cálcio + solução fisiológica. Quando manipulado com o veículo clorexidina gel 2%, o hidróxido de cálcio apresentou valores significativamente inferiores.

O tempo resultou em um aumento significativo dos valores de resistência de união do material obturador à dentina radicular nos grupos 2 e 3, aonde foram utilizadas as medicações clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio + solução fisiológica, respectivamente. Os grupos 4, 5 e 6 mantiveram os valores de resistência de união nos diferentes tempos. O grupo controle, tratado com solução fisiológica esterilizada apresentou uma redução significativa dos valores de resistência de união após os 12 meses de armazenamento.

Para os dados obtidos das amostras sem período de armazenamento, o teste Chi-quadrado não reportou diferença estatística significativa dos padrões de falha do material obturador após o teste pushout ($p > 0,05$), demonstrando que as medicações

não promoveram alterações no modo de falha. A falha adesiva foi o padrão mais freqüentemente encontrado (Tabela 3).

Tabela 3: Padrões de falha do material obturador nas amostras sem período de armazenamento.

Grupo	Padrão de falha (%)		
	Adesiva	Coesiva	Mista
<i>1. Soro</i>	<i>74</i>	<i>13</i>	<i>13</i>
<i>2. CHX</i>	<i>54</i>	<i>13</i>	<i>33</i>
<i>3. Ca(OH)2 + Soro</i>	<i>60</i>	<i>20</i>	<i>20</i>
<i>4. GSE + Soro</i>	<i>40</i>	<i>53</i>	<i>7</i>
<i>5. Ca(OH)2 + CHX</i>	<i>67</i>	<i>33</i>	<i>0</i>
<i>6. GSE + CHX</i>	<i>40</i>	<i>40</i>	<i>20</i>

Para os dados obtidos após o período de armazenamento, o teste chi-quadrado reportou diferença estatística significativa nos padrões de falha do material obturador, demonstrando que as medicações influenciaram o modo de falha após 12 meses de armazenamento das amostras ($p < 0,05$), resultando principalmente em um aumento no número de padrões de falha coesiva e diminuição das falhas adesivas, exceto para o grupo tratado com hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2% que apresentou um aumento no número de falhas mistas (Tabela 4).

Tabela 4: Padrões de falha do material obturador nas amostras com 12 meses de armazenamento.

Grupo	Padrão de falha (%)		
	Adesiva	Coesiva	Mista
1. <i>Soro</i>	53	0	47
2. <i>CHX</i>	20	47	33
3. <i>Ca(OH)2 + Soro</i>	47	33	20
4. <i>GSE + Soro</i>	27	60	13
5. <i>Ca(OH)2 + CHX</i>	53	7	40
6. <i>GSE + CHX</i>	27	53	20

A média e desvio padrão dos valores de microdureza dentinária estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5: Média \pm desvio padrão da microdureza dentinária (MPa) após exposição aos grupos de tratamento.

Grupo	N	Microdureza* (MPa)
1. <i>Soro</i>	10	25,83 \pm 4,84 ^{AB}
2. <i>CHX</i>	10	32,48 \pm 5,41 ^A
3. <i>Ca(OH)2 + Soro</i>	10	28,11 \pm 5,74 ^{AB}
4. <i>GSE + Soro</i>	10	22,85 \pm 4,82 ^B
5. <i>Ca(OH)2 + CHX</i>	10	27,77 \pm 7,02 ^{AB}
6. <i>GSE + CHX</i>	10	21,94 \pm 5,31 ^B

*Valores seguidos de letras diferentes na coluna são estatisticamente diferentes.

A clorexidina 2% resultou nos maiores valores de microdureza, apresentando diferenças significativas ($P = 0,001$) em relação aos grupos do extrato de semente de uva e extrato de semente de uva + clorexidina 2%, os quais foram semelhantes entre si, e semelhantes aos grupos da água destilada (controle), hidróxido de cálcio e hidróxido de cálcio + clorexidina. Dessa forma, a clorexidina gel 2% foi capaz de elevar os valores de microdureza da dentina, e as medicações a base de extrato de semente de uva ou hidróxido de cálcio, independente do veículo utilizado, não interferiram na microdureza do tecido dentinário.

6 DISCUSSÃO

O objetivo principal do tratamento endodôntico é realizar uma adequada limpeza e modelagem do sistema de canais radiculares. Isso se deve ao fato de que a grande maioria das alterações patológicas que acometem a polpa e, conseqüentemente, os tecidos periapicais, apresenta etiologia microbiana (Sundqvist, 1976). Neste cenário, os microrganismos desempenham um papel fundamental na indução e, principalmente, na perpetuação destas condições (Takehashi *et al.*, 1965), sendo necessário um adequado processo de descontaminação por meio do uso de substâncias químicas e recursos auxiliares, que irão contribuir para a limpeza de todo o sistema, e de instrumentos endodônticos, que irão contribuir para a modelagem do espaço principal do canal radicular.

O sucesso do tratamento endodôntico vai depender, além de uma adequada descontaminação e modelagem, da obturação tridimensional do sistema de canais radiculares (Schilder, 1974), usando materiais que apresentem propriedades biológicas e físico-químicas ideais para o preenchimento deste espaço. Estes materiais devem apresentar capacidade de controlar a infiltração marginal e

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

Por mais que protocolos atuais, atingindo mais de 99,75% de redução bacteriana, permitam a finalização dos tratamentos endodônticos em sessão única (Xavier *et al.*, 2013), a umidade ou secreções persistentes nos canais impedem a finalização do tratamento, sendo necessário lançar mão do uso das medicações intracanais com o objetivo de manter o estado de desinfecção entre as sessões de tratamento.

A presença de umidade ou secreções oriundas da região periapical pode levar a infiltração do material obturador, conseqüentemente, recontaminando o sistema de canais radiculares, levando ao insucesso da terapia endodôntica.

As medicações intracanal devem apresentar propriedades bactericidas não interferindo, tanto nas propriedades mecânicas do tecido dentinário como na resistência de união do material obturador à dentina radicular (Albino Souza *et al.*, 2017), podendo ser também, mais uma ferramenta no combate a infecção periapical nos casos cuja terapia endodôntica não alcança a situação de patência foraminal.

O *Enterococcus faecalis* é um microrganismo anaeróbio facultativo que é altamente resistente ao preparo químico-mecânico convencional e frequentemente é encontrado nos casos de insucesso do tratamento endodôntico (Pinheiro *et al.*, 2003).

Este microrganismo tem vários fatores de virulência e é capaz de resistir a longos períodos de limitação de nutrientes, persistindo como um patógeno no canal radicular (Figdor *et al.*, 2003; Tendolkar *et al.*, 2003). O modelo de crescimento bacteriano utilizado neste estudo já havia sido relatado em estudos anteriores que se concentravam em estratégias antimicrobianas contra *Enterococcus faecalis* (De Almeida *et al.*, 2014; Ghinzelli *et al.*, 2014; Albino Souza *et al.*, 2017). Este microrganismo foi escolhido devido a sua capacidade de penetrar túbulos dentinários e colonizar o sistema de canais radiculares (Sedgley *et al.*, 2005). No entanto, não há consenso na literatura sobre o tempo necessário para realizar esse crescimento bacteriano, com estimativas variando de 24 horas (Chavez De Paz *et al.*, 2010) a 50 dias (Grundling *et al.*, 2011). No presente estudo, foi adotado o período de 15 dias de contaminação, acreditando ser um tempo suficiente para propiciar o crescimento bacteriano e garantir que as medicações intracanal pudessem ser efetivamente testadas.

O modelo de contaminação com *Enterococcus faecalis* desta pesquisa foi realizado em dentes humanos extraídos. Os dentes humanos utilizados 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 utilizadas as medicações intracanal.

A ampliação dos canais radiculares foi realizada previamente à contaminação, de forma similar a estudos prévios (De Almeida *et al.*, 2014; Ghinzelli *et al.*, 2014; Cecchin, Farina, *et al.*, 2015). Isso assegura uma adequada padronização do diâmetro do canal radicular e criação de um espaço adequado para o crescimento bacteriano, além do fato que a realização do preparo após a contaminação, possivelmente eliminaria consideravelmente o número de microrganismos, impossibilitando a avaliação da desinfecção promovida pelas diferentes medicações testadas.

Atualmente, existem diferentes metodologias laboratoriais para que seja avaliado o grau de descontaminação proporcionado por um determinado protocolo. A presente pesquisa utilizou a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) para avaliar os efeitos dos tratamentos propostos. Este método foi escolhido com base em estudos anteriores (Evans *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2004; Grundling *et al.*, 2011; De Almeida *et al.*, 2014; Ghinzelli *et al.*, 2014; Cecchin, Farina, *et al.*, 2015) uma vez que permite, de uma forma aceitável, a quantificação de bactérias a partir do espaço do canal radicular (Peters *et al.*, 1995).

Dois momentos de coleta bacteriana foram estabelecidos: 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, por meio de um percentual de redução microbiana, após execução do tratamento. No entanto, as amostras microbiológicas só foram coletadas a partir do canal principal. Dessa forma, não foi possível avaliar a presença de bactérias na profundidade dos túbulos dentinários ou o número de células viáveis, como no caso de estudo prévio (Böttcher *et al.*, 2015), onde a viabilidade bacteriana foi quantificada através de médias, a partir da realização de microscopia laser confocal.

A clorexidina é considerada uma base forte da família das bisbiguanidas que apresenta propriedades catiônicas (Nerurkar *et al.*, 1995). Estudos anteriores demonstraram que na forma líquida na concentração de 2%, a clorexidina apresenta uma capacidade de neutralização completa de *Enterococcus faecalis* do interior do canal radicular (Albino Souza *et al.*, 2017). O mecanismo de ação antimicrobiana desta substância pode ser explicado através da interação com a parede celular bacteriana, promovendo um desequilíbrio osmótico, que permite a entrada do fármaco no interior da célula, conduzindo a morte da bactéria (Gomes *et al.*, 2003).

Além de uma efetiva ação antimicrobiana contra patógenos endodônticos (Ferraz *et al.*, 2001; Menezes *et al.*, 2004; Dametto *et al.*, 2005), a clorexidina também apresenta substantividade. Através de um processo de adsorção, liga-se a hidroxiapatita, e é liberada lentamente a medida em que sua concentração no meio

decrece (Carrilho *et al.*, 2010). De acordo com estudo prévio (Souza *et al.*, 2012), a clorexidina, gel e líquida, permaneceu retida na dentina radicular por até 90 dias. Ao mesmo tempo, Böttcher *et al.* (2015), demonstraram uma redução significativa do percentual de células bacterianas viáveis de *Enterococcus faecalis* após 30 dias da utilização de clorexidina 2% na dentina radicular humana. Além disso, em conjunto com a ação antimicrobiana e a substantividade, a clorexidina não interfere na estabilidade de união entre o material restaurador e a dentina (Carrilho, Carvalho, *et al.*, 2007; Carrilho, Geraldeli, *et al.*, 2007) e apresenta ausência de citotoxicidade (Ribeiro *et al.*, 2005). Por essas razões, a clorexidina gel na concentração de 2% foi a substância escolhida a ser testada como veículo das medicações intracanaís.

Uma das medicações utilizadas no presente estudo, foi o extrato de semente de uva, o qual 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), atuando no combate de patógenos endodônticos, tais como cepas de *Streptococcus ssp* (Thimothe *et al.*, 2007; Furiga *et al.*, 2009), o que ajuda a explicar sua efetiva capacidade de neutralização do *Enterococcus faecalis* na presente pesquisa.

Além da ação antimicrobiana, relatada em estudos prévios e confirmada no presente estudo, este extrato apresenta propriedades que podem agregar aspectos positivos dentro da terapia endodôntica. As proantocianidinas, que interferem positivamente nas propriedades mecânicas da dentina (Cecchin, Pin, *et al.*, 2015), além de reduzir a absorção de água e estabilizar a degradação do colágeno na estrutura dentinária (Aguilar *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.

Dessa forma, o extrato de semente de uva pode ser considerado uma alternativa eficaz como medicação intracanal, contribuindo tanto para o processo de descontaminação do sistema de canais radiculares, como para a manutenção das propriedades mecânicas da dentina. No entanto há uma importante observação, a qual não faz parte dos objetivos da presente pesquisa, mas é fundamental que seja salientada. Os grupos tratados com extrato de semente de uva apresentaram um alto grau de pigmentação das raízes. Dentre os veículos utilizados, a clorexidina produziu visivelmente maior pigmentação radicular, a qual certamente em elementos que possuam porção coronária, promoveria uma significativa alteração de cor, contraindicando o uso da medicação em situações clínicas.

O potencial antimicrobiano do extrato de semente de uva é bastante significativo, semelhante ao hidróxido de cálcio. Quando ambas medicações utilizaram o veículo clorexidina gel 2%, atingiram mais de 98% de redução microbiana, demonstrando a capacidade de ampliação do efeito antimicrobiano promovido pela clorexidina, o qual foi significativamente mais elevado quando comparado ao soro fisiológico. Tais características estimulam a busca pelo aprimoramento da medicação, no sentido de se evitarem as alterações cromáticas dos elementos dentários, as quais não foram observadas quando o extrato foi utilizado apenas como protocolo de descontaminação final, na concentração de 6,5% no estudo de Albino Souza *et al.* (2017).

Utilizado durante décadas como medicação intracanal na endodontia, o hidróxido de cálcio também fez parte dos grupos de tratamento do presente estudo.

Um período mínimo de tempo em contato com o canal radicular é necessário, para que ocorra a difusão do hidróxido de cálcio e o mesmo exerça sua atividade bactericida. A fim de que a alcalinidade da medicação atinja a superfície externa radicular, este período deve ser de 15 dias (Nerwich *et al.*, 1993; Holland *et al.*, 2003; Leonardo *et al.*, 2006; Leonardo, 2012), sendo assim, este foi o período de tempo de contato das medicações intracanal adotado na presente pesquisa.

Por mais eficaz que sejam os protocolos de preparo endodôntico atuais, os mesmos ainda não atingem inativação completa da contaminação (Ordinola-Zapata *et al.*, 2013), e a infecção residual ainda é uma causa comum dos insucessos da terapia endodôntica (Paiva *et al.*, 2012).

A permanência dos microrganismos Gram negativos no interior do sistema de canais e região periapical, traz à tona um agravante, o LPS (lipopolissacarídeo), presente na parede celular bacteriana. É uma endotoxina que contribui para persistência da lesão periapical crônica. Dessa forma, o emprego do hidróxido de cálcio como medicação intracanal entre as sessões de tratamento, se torna efetivo, pois possui a capacidade de neutralizar as endotoxinas, mantendo o estado de desinfecção (Maekawa *et al.*, 2011; Leonardo, 2012).

Inúmeros estudos confirmaram a efetividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio no combate ao *Enterococcus faecalis* (Leonardo *et al.*, 2000; Leonardo *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2007; Lana *et al.*, 2009; Leonardo, 2012; Guo *et al.*, 2016). Nos casos de lesões periapicais induzidas por esta bactéria, o tratamento durante 15 dias com o hidróxido de cálcio, elevou significativamente o índice de sucesso histológico, em comparação aos tratamentos de sessão única (Leonardo *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2007), além de apresentar propriedade antiexsudativa e indução da formação de tecido mineralizado (Leonardo, 2012). Estas

características, fazem do hidróxido de cálcio a medicação de escolha para os casos de impossibilidade de secagem dos canais.

No presente estudo, a pasta de hidróxido de cálcio foi utilizada com a variação de dois veículos. A solução fisiológica esterilizada foi escolhida como um deles, por apresentar maiores valores de liberação de cálcio e os mais elevados níveis de pH (De Andrade Ferreira *et al.*, 2004), sendo comparada com o gel de clorexidina 2%, um efetivo agente bactericida, utilizado com o objetivo de amplificar o potencial antimicrobiano da medicação.

Os resultados demonstraram diferenças significativas entre os dois veículos na redução bacteriana, sendo a clorexidina a mais efetiva, atingindo 98,25% de redução. A proporção de medicação e veículo utilizada foi de 1:1 em peso e volume, conforme preconizado por estudos prévios (Maekawa *et al.*, 2011).

Autores como Arslan *et al.* (2014) atentam para a formação do precipitado castanho-alaranjado, resultado da interação entre a clorexidina da medicação intracanal, e a solução irrigante hipoclorito de sódio utilizada para sua remoção. Além da dificuldade para eliminação completa da medicação do interior dos canais, independente do veículo utilizado.

Dessa forma, ambas medicações, extrato de semente de uva e hidróxido de cálcio, se mostraram efetivas no combate ao biofilme de *Enterococcus faecalis*, atingindo uma redução bacteriana significativamente maior quando utilizado o gel de

clorexidina 2% como veículo, pelo período de 15 dias, aceitando a hipótese inicial do estudo.

A resistência de união é um princípio físico que pode ser definido como a força de atração entre corpos de espécies químicas diferentes. Na odontologia, o teste de *pushout* tem sido utilizado como um dos principais recursos no intuito de quantificar a resistência de união entre diferentes materiais e estruturas dentárias, sendo inicialmente aplicado para mensurar a adesão de pinos no interior dos canais radiculares (Patierno *et al.*, 1996) e, mais recentemente, aplicado para avaliar a resistência de união de materiais obturadores à dentina radicular (Dias *et al.*, 2014; Grazielle Magro *et al.*, 2014; Albino Souza *et al.*, 2017). Neste teste, discos ou fatias radiculares, com uma espessura de 1 mm, são confeccionados perpendicularmente ao longo eixo do material de preenchimento (Goracci *et al.*, 2004) e a resistência de união é determinada por meio da mensuração da força compressiva necessária para deslocar o segmento do pino ou material obturador, utilizando um dispositivo de menor diâmetro em contato com este material. A partir disso, é feito um cálculo entre a carga necessária para o deslocamento do material e a área interfacial entre o material e a parede do canal, quantificando a resistência de união (Chandra e Ghonem, 2001).

De acordo com a literatura, o teste de *pushout* é compatível com a situação clínica (Sousa-Neto *et al.*, 2005; Huffman *et al.*,

2009); permite uma padronização acurada das amostras (Sousa-Neto *et al.*, 2005); produz forças mais efetivas de deslocamento do material (Drummond *et al.*, 1996); e produz menor estresse na interface de adesão durante a confecção dos discos ou fatias radiculares, quando comparado aos testes de tensão e cisalhamento convencionais (Ungor *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2008). Por essas razões, o teste de *pushout* foi utilizado no presente estudo para avaliar a influência das diferentes medicações sobre a resistência de união do material obturador à dentina radicular, além de analisar a incidência e o padrão de falha do material obturador após a realização deste teste.

Na presente pesquisa, os canais radiculares foram obturados com cones de guta-percha convencionais e o cimento endodôntico AH Plus, após o período de contato das medicações intracanal, estando em acordância com a metodologia proposta por estudos anteriores (Prado *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2014; Grazielle Magro *et al.*, 2014; Topcuoglu *et al.*, 2014). A utilização deste cimento endodôntico isoladamente não é indicada de acordo com as especificações do fabricante. Dessa forma, a associação do cimento endodôntico com cones de guta-percha contribui para um adequado selamento do sistema de canais radiculares, além de não apresentar citotoxicidade após seu período de presa (Zhou *et al.*, 2015). A escolha do cimento AH Plus foi baseada em suas características de ser um cimento resinoso de fácil manipulação,

apresentar ausência de estresse de polimerização, adequado escoamento e, principalmente, elevada resistência de união à estrutura dentinária (Souza *et al.*, 2009; Carneiro *et al.*, 2012).

De acordo com a literatura, a clorexidina não interfere negativamente na capacidade de adesão dos cimentos endodônticos à dentina (Mohammadi e Abbott, 2009; Albino Souza *et al.*, 2017), além de inibir a ação de metaloproteinases (Carrilho, Geraldeli, *et al.*, 2007; Breschi *et al.*, 2010) e cisteínas catepsinas (Scaffa *et al.*, 2012), proteínas diretamente envolvidas no processo de deterioração do colágeno e que prejudicam a adesão à estrutura dentinária. No entanto, no presente estudo, a clorexidina demonstrou valores baixos de resistência de união em um período próximo a sua aplicação. Por outro lado, após 12 meses de armazenamento elevou significativamente os valores de adesão, dessa forma, não contraindicando sua aplicação no interior dos canais radiculares.

O extrato de semente de uva possui proantocianidinas em sua composição, que também tem o efeito inibitório sobre o grupo de enzimas acima citado (Epasinghe *et al.*, 2013), apresentando capacidade de aumentar o número de ligações cruzadas do colágeno em tecidos como a dentina, o que melhora a adesão nestas superfícies (Bedran-Russo *et al.*, 2014). Tais resultados vão ao encontro dos resultados da presente pesquisa, aonde o tratamento com esta medicação resultou nos maiores valores de resistência de

união, os quais foram mantidos após o período de 12 meses de armazenamento das amostras. Novos estudos, com tempos de armazenamentos superiores ao aqui utilizado são incentivados, pois poderiam resultar em um aumento significativo nos valores de resistência de união do material obturador a dentina radicular, após o uso desta medicação.

Quando um correto protocolo de remoção de medicação do interior dos canais é aplicado, as medicações à base de hidróxido de cálcio não são capazes de interferir na resistência de união do cimento AH Plus a dentina radicular (Wanees Amin *et al.*, 2012; Akcay *et al.*, 2014). Porém, os resultados aqui obtidos, revelaram uma significativa redução nos valores de resistência de união, quando o hidróxido de cálcio é utilizado tendo como veículo a clorexidina gel 2%. Tais valores foram mantidos baixos mesmo após o período de armazenamento, o que leva a crer que o pó de hidróxido de cálcio impede a atuação benéfica da clorexidina sobre o tecido dentinário, a qual aumentaria os valores de resistência de união.

Desta forma, medicações a base de extrato de semente de uva interagem positivamente na adesão do material obturador a dentina radicular, elevando os valores de resistência de união, independentemente do veículo utilizado.

Quando a medicação de escolha for o hidróxido de cálcio, o veículo indicado é a solução fisiológica esterilizada, a qual

permite o aumento dos valores de resistência de união do material obturador a dentina radicular, após 12 meses de armazenamento.

Nesse sentido, novos estudos avaliando medicações a base de hidróxido de cálcio, com veículos aquosos, como o Ultracal, devem ser realizados. Com o objetivo de verificar a influência das misturas prontas pré injetáveis na adesão do material obturador. Uma vez que, estas formas farmacêuticas sejam de muita praticidade na sua aplicação clínica.

Devido a diminuição dos valores de resistência de união do material obturador a dentina radicular, a clorexidina gel 2% utilizada como veículo para a medicação a base de hidróxido de cálcio pode ser evitada, optando-se então pelo seu uso na forma líquida durante o protocolo irrigante de descontaminação final.

Ao observar e classificar os padrões de falha do material obturador, após a realização do teste de *pushout*, foi verificado que, sem período de armazenamento, as medicações não promoveram alterações significativas no modo de falha do material obturador.

No entanto, após os 12 meses de armazenamento, diferenças estatísticas significativas nos padrões de falha do material obturador foram observadas, sendo as falhas adesivas substituídas por falhas do tipo coesiva, estando tais resultados em acórdância com os resultados de Prado *et al.* (2013), e Dias *et al.* (2014), que verificaram a presença da falha coesiva como a mais frequente quando utilizado o cimento endodôntico AH plus e gutta-

percha como material obturador. Por outro lado, Grazielle Magro *et al.* (2014) relatam o padrão de falha misto como predominante quando utilizada a combinação de AH plus e gutta-percha para obturação do canal radicular.

No presente estudo, a predominância do padrão de falha coesiva após os 12 meses de armazenamento, provavelmente seja consequência do aumento nos valores de resistência de união, fazendo com que a falha ocorresse no interior da massa obturadora ao invés da interface obturação/dentina. Esse tipo de falha coesiva, pode ser benéfico para o tratamento endodôntico, pois remete a maior resistência de união do material obturador as paredes dentinárias do canal radicular, o que pode ser correlacionado a uma maior capacidade de selamento da obturação do sistema de canais radiculares.

As mudanças causadas nas propriedades físicas do tecido dentinário, devem, de fato, ser levadas em consideração, pois após a terapia endodôntica, o elemento dentário precisa ser restaurado e sua função reestabelecida. Dessa forma, alterações na microdureza, módulo de elasticidade e resistência à flexão podem ser critérios decisivos na prevenção de trincas e fraturas. Estudos demonstram que alterações promovidas pelos irrigantes endodônticos em tais propriedades, resultam na susceptibilidade dentinária à fratura (Machnick *et al.*, 2003). Por outro lado, pesquisadores afirmam que a terapia endodôntica é capaz de promover uma redução de apenas

5% na rigidez do elemento dentário, indicando que os procedimentos endodônticos não são capazes de enfraquecer a estrutura dentária (Reeh *et al.*, 1989). No entanto, a filosofia atual de terapia endodôntica difere bastante da preconizada no ano de publicação destes resultados.

O presente estudo também objetivou verificar o efeito de diferentes medicações intracanal sobre o tecido dentinário de canais radiculares de dentes humanos extraídos. A microdureza de Knoop foi o critério escolhido, ao invés da microdureza de Vickers, com base na metodologia de Cruz-Filho *et al.* (2011), a qual realizou indentações na superfície do canal radicular. Nestas superfícies, existem poucas regiões de áreas planas para realizar a indentação, o que justifica a escolha do cristal de Knoop, pois apresenta uma superfície menor do que outros cristais de indentação. No entanto, após o preparo das amostras e início dos testes de microdureza, surgiu a dificuldade em obter foco na imagem das indentações, e inúmeras vezes foram observadas indentações incompletas.

A superfície das paredes dos canais radiculares não é regular, ou seja, apresenta áreas mais elevadas e áreas mais baixas (picos e vales), o que explica a dificuldade em obter o foco no dispositivo microdurômetro, para a visualização do defeito criado. Em inúmeros casos foram observadas indentações incompletas, oriundas da irregularidade da superfície, uma vez que a ponta do

indentador pode ter contato apenas nas áreas mais altas. Para o projeto piloto, foram utilizadas 5 amostras, as quais apresentavam canais amplos e superfícies regulares, o que justifica a não observância de indentações incompletas.

Desta forma, afim de não descartar as amostras já preparadas, e também devido à dificuldade de obtenção de dentes humanos, optou-se por realizar uma modificação na metodologia, realizando as indentações na superfície transversal ao longo eixo do elemento dentário, conforme descrito no estudo de Aslantas *et al.* (2014).

O estudo de Aslantas *et al.* (2014), utilizou cortes transversais nas raízes não clivadas, obtendo três amostras, correspondentes aos terços cervical, médio e apical, realizando as indentações em uma profundidade de 500 μ m de dentina, contados a partir da parede do canal radicular, indo em direção ao tecido cementário.

O presente estudo não objetivou avaliar a microdureza por terços do elemento dentário, portanto as mesmas amostras clivadas e fixadas nas placas de acrílico foram seccionadas transversalmente ao longo eixo do elemento dentário, a 5mm da entrada do canal. O uso desta medida é explicado pelo fato que, durante o período de contato com as medicações, os canais foram selados com bolinha de algodão e cimento obturador provisório. Sendo assim, afim de evitar a área de contato com o selamento do

canal, a secção foi realizada abaixo do mesmo, expondo uma área de dentina que esteve em íntimo contato com as medicações utilizadas na pesquisa.

As amostras foram fixadas verticalmente por meio de uma mini morsa, e uma indentação foi realizada a uma profundidade de 500 μ m da superfície do canal, conforme descrito no estudo de Aslantas *et al.* (2014). Após a primeira indentação, mais duas foram realizadas, uma para o lado direito e para o lado esquerdo, ou seja, mais a vestibular e mais a palatina/lingual da primeira indentação, distantes 200 μ m entre si, totalizando 3 indentações por unidade experimental. A média das 3 indentações foi o valor referência de microdureza utilizado para cada amostra, conforme descrito por Cruz-Filho *et al.* (2011).

Alguns autores acreditam que uma redução na microdureza dentinária é uma característica desejável, isto quando ela estiver localizada na superfície das paredes do canal radicular, pois o “amolecimento” superficial da dentina facilita a ação de corte dos instrumentos endodônticos, aumentando sua efetividade. Tal característica é alcançada por meio do uso de determinados irrigantes endodônticos, que ao mesmo tempo irão remover a *smear layer* permitindo a maior penetração das soluções bactericidas (Cruz-Filho *et al.*, 2011). Sob outra perspectiva, a ação dos irrigantes endodônticos na microdureza ainda não está bem estabelecida, uma vez que, o hipoclorito e a clorexidina diminuem

significativamente os valores desta propriedade dentinária (Oliveira *et al.*, 2007), tornando a estrutura susceptível às fraturas e trincas (Machnick *et al.*, 2003).

De fato, as soluções irrigantes utilizadas durante o preparo endodôntico são capazes de interagir com o tecido dentinário. Inúmeros estudos apontam para a redução da microdureza dentinária quando utilizados hipoclorito, clorexidina e EDTA (Oliveira *et al.*, 2007; Aslantas *et al.*, 2014). No entanto, no presente estudo, ao ser utilizada como medicação intracanal e como veículo da pasta à base de hidróxido de cálcio, a clorexidina não demonstrou diferenças significativas na microdureza da dentina radicular.

O uso isolado de clorexidina gel 2% pelo período de 15 dias, não possui indicação como medicação intracanal na literatura pesquisada. Mesmo assim foi utilizada isoladamente na presente pesquisa, a fim de verificar seus efeitos sobre a dentina radicular. A observação dos resultados nos permite verificar que a redução na microdureza promovida pelo grupo GSE + CHX 2%, possivelmente esteja associada ao extrato de semente de uva, uma vez que, os grupos nos quais fora utilizado, apresentaram os menores valores de microdureza, ao passo que, o grupo da clorexidina apresentou o maior valor de microdureza obtido.

Outros estudos, retrospectivos, têm demonstrado uma alta incidência de fraturas radiculares cervicais nos casos aonde o

hidróxido de cálcio tem sido utilizado como medicação à longo prazo, principalmente em situações de dentes permanentes jovens, possivelmente devido ao enfraquecimento que a alcalinidade desta medicação causa a dentina radicular (Kahler *et al.*, 2017). Por outro lado, dentes permanentes jovens apresentam um canal radicular bastante amplo e paredes radiculares delgadas, características que por si só já tornam o elemento dentário menos resistente à fratura. Além destas características anatômicas, o tratamento de dentes permanentes jovens com hidróxido de cálcio necessita de inúmeras trocas da medicação e um longo período de acompanhamento, durante o qual estará presente uma restauração provisória, sendo ela mais um agravante na resistência do dente permanente. Por estas razões, o tratamento de dentes permanentes jovens com hidróxido de cálcio deixou de ser uma técnica de primeira escolha nos dias atuais, cedendo lugar às terapias regenerativas do tecido pulpar (Diogenes *et al.*, 2016).

A capacidade bactericida do hidróxido de cálcio é promovida pela sua alcalinidade, e a utilização de veículos aquosos garantem uma maior liberação de íons cálcio, o que resulta em um valor de pH mais elevado (De Andrade Ferreira *et al.*, 2004). Sendo assim, é possível levantar a seguinte questão: Qual seria o pH ideal desta medicação intracanal? Levando em consideração a maior efetividade possível na erradicação bacteriana, com o menor dano as propriedades mecânicas do tecido dentinário.

O tratamento com hidróxido de cálcio, além de enfraquecer o tecido dentinário, permite uma menor deformação da dentina tornando o elemento dentário suscetível às trincas e microtrincas. Tal redução das propriedades mecânicas do tecido dentinário, pode ajudar a explicar, em partes, a observação das fraturas radiculares (Grigoratos *et al.*, 2001), devendo esta medicação ser utilizada com cautela em períodos mais longos do que 30 dias, devido a diminuição na resistência a fratura (Batur *et al.*, 2013; Zarei *et al.*, 2013). Ao utilizar o HC como medicação intracanal ocorrem mudanças nas propriedades mecânicas da dentina. Tais mudanças são consequências das alterações de pH promovidas pelo hidróxido de cálcio, que ao interagir com a matriz orgânica da dentina promove uma ruptura na união da rede de colágeno com os cristais de hidroxiapatita, enfraquecendo o tecido dentinário (Andreasen *et al.*, 2002).

Na presente pesquisa o hidróxido de cálcio foi utilizado com dois veículos diferentes, solução fisiológica esterilizada e clorexidina gel 2%, porém ambos aquosos. Veículos viscosos como a clorexidina gel tornam o processo de preenchimento dos canais mais fácil de ser realizado, além do benefício de o veículo ser uma substância bactericida com substantividade. Tal acréscimo na capacidade bactericida poderia, por outro lado, reduzir o período mínimo necessário de uso de medicação, reduzindo assim os

efeitos deletérios promovidos pelo hidróxido de cálcio sobre tecido dentinário.

Os valores de microdureza obtidos neste estudo após o uso de medicações contendo hidróxido de cálcio, não diferem significativamente dos grupos tratados com extrato de semente de uva e clorexidina gel 2% isolada. O extrato de semente de uva por sua vez, com diferença significativa apenas em relação a clorexidina gel 2%, também promoveu uma intensa alteração cromática definitiva nas raízes utilizadas, deixando-as com uma coloração marrom escura, mais acentuada no grupo que utilizou clorexidina como veículo. Tal escurecimento do substrato dentário certamente contraindica o uso desta medicação. Sendo assim, sua utilização seria viável com o isolamento e aplicação de seus componentes bactericidas como medicação intracanal, ou seja, procianidinas monoméricas, conforme constatado em estudos como o de Jayaprakasha *et al.* (2003).

A idade do elemento dentário pode ser uma variável a ser considerada para as medidas de microdureza, uma vez que, dentes de pessoas mais idosas apresentam uma maior mineralização devido a diminuição fisiológica no calibre dos túbulos dentinários. Estudos prévios demonstram um aumento na dureza dentária após 10 anos de erupção (Palti *et al.*, 2008). Porém, os elementos utilizados no presente estudo são provenientes de um banco de dentes com classificação de faixa etária.

Por fim, foram realizadas indentações em cinco amostras do grupo controle, em uma região localizada 500µm distante da superfície cementária, em direção a parede do canal. Tais indentações não faziam parte dos objetivos deste estudo, no entanto demonstraram um valor médio de 70 HK (Hardness Knoop), o que pode ser uma consequência da diminuição do calibre dos túbulos dentinários ao passo que a distância do canal radicular é aumentada. Ou, pode ser fruto da ausência da interação das medicações intracanal com a dentina mais distante da superfície do canal radicular.

Sendo assim, foi possível verificar que as medicações intracanal testadas obtiveram diferentes resultados nas diferentes etapas desta tese. Ao levar em consideração a capacidade de redução bacteriana, influência na resistência de união do material obturador, padrão de falha da obturação e interação com as propriedades mecânicas do tecido dentinário, a escolha mais sensata, equilibrando todos os aspectos estudados, apontam como uma melhor alternativa de medicação intracanal o extrato de semente de uva com a clorexidina gel 2% como veículo. No entanto, é imprescindível que os componentes benéficos sejam isolados do extrato, pois ao se considerar a pigmentação da estrutura dental, esta medicação estaria contraindicada. Desta forma, diante dos resultados obtidos e literatura revisada, o melhor protocolo de medicação intracanal aplicável *in vivo*, atualmente,

seria a utilização do hidróxido de cálcio tendo o soro fisiológico como veículo, com protocolo de descontaminação final prévio utilizando clorexidina líquida na concentração de 2%.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que as medicações à base de extrato de semente de uva e hidróxido de cálcio, são efetivas no combate ao biofilme de *Enterococcus faecalis* após o período de 15 dias de contato, tendo seu potencial antimicrobiano amplificado quando a clorexidina gel 2% é utilizada como veículo para as medicações.

As medicações à base de extrato de semente de uva elevam os valores de valores de resistência de união do material obturador à dentina radicular, imediatamente após a obturação e decorridos 12 meses de armazenamento, independente do veículo utilizado. O mesmo ocorre para as medicações à base de hidróxido de cálcio após 12 meses de armazenamento, quando a solução fisiológica é utilizada como veículo para a medicação.

Nenhuma das pastas testadas como medicação intracanal produz alterações na microdureza do tecido dentinário após 15 dias de contato.

REFERÊNCIAS

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. Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. *J Dent Res*, v. 93, n. 4, p. 417-22, Apr 2014.

AKCAY, M.; ARSLAN, H.; TOPCUOGLU, H. S.; TUNCAY, O. Effect of Calcium Hydroxide and Double and Triple Antibiotic Pastes on the Bond Strength of Epoxy Resin-based Sealer to Root Canal Dentin. *Journal of Endodontics*, v. 40, n. 10, p. 1663-1667, 2014/10/01/ 2014.

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. 357-64, Jun 2010.

ALBINO SOUZA, M.; 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 and Photodynamic Therapy*, v. 17, p. 92-97, 3// 2017.

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. 134-7, Jun 2002.

ANTUNES, H. S.; ROCAS, 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. 41, n. 7, p. 1037-42, Jul 2015.

ARIAS-MOLIZ, M. T.; FERRER-LUQUE, C. M.; ESPIGARES-GARCIA, M.; BACA, P. Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod*, v. 35, n. 5, p. 711-4, May 2009.

ARSLAN, H.; GOK, T.; SAYGILI, G.; ALTINTOP, H.; AKÇAY, M.; ÇAPAR, İ. D. Evaluation of Effectiveness of Various Irrigating Solutions on Removal of Calcium Hydroxide Mixed with 2% Chlorhexidine Gel and Detection of Orange-brown Precipitate after Removal. *Journal of Endodontics*, v. 40, n. 11, p. 1820-1823, 11// 2014.

ASLANTAS, E. E.; BUZOGLU, H. D.; ALTUNDASAR, E.; SERPER, A. Effect of EDTA, Sodium Hypochlorite, and Chlorhexidine Gluconate with or without Surface Modifiers on Dentin Microhardness. *Journal of Endodontics*, v. 40, n. 6, p. 876-879, 6// 2014.

BATUR, Y. B.; ERDEMIR, U.; SANCAKLI, H. S. The long-term effect of calcium hydroxide application on dentin fracture strength of endodontically treated teeth. *Dent Traumatol*, v. 29, n. 6, p. 461-4, Dec 2013.

BEDRAN-RUSSO, A. K.; PAULI, G. F.; CHEN, S. N.; MCALPINE, J.; CASTELLAN, C. S.; PHANSALKAR, R. S.; AGUIAR, T. R.; VIDAL, C. M.; NAPOTILANO, J. G.; NAM, J. W.; LEME, A. A. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater*, v. 30, n. 1, p. 62-76, Jan 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. 1479-83, Nov 2012.

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. *Journal of Endodontics*, v. 41, n. 8, p. 1364-1370, 8// 2015.

BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; NATO, F.; CARRILHO, M.; VISINTINI, E.; TJADERHANE, L.; RUGGERI, A., JR.; 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. 320-5, Apr 2010.

BROWN, J. C.; HUANG, G.; HALEY-ZITLIN, V.; JIANG, X. Antibacterial effects of grape extracts on *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol*, v. 75, n. 3, p. 848-52, Feb 2009.

CARNEIRO, S. M.; SOUSA-NETO, M. D.; RACHED, F. A., JR.; MIRANDA, C. E.; SILVA, S. R.; SILVA-SOUSA, Y. T. Push-out strength of root fillings with or without thermomechanical compaction. *Int Endod J*, v. 45, n. 9, p. 821-8, Sep 2012.

CARRILHO, M. R.; CARVALHO, R. M.; DE GOES, M. F.; DI HIPOLITO, V.; GERALDELI, S.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; TJADERHANE, L. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res*, v. 86, n. 1, p. 90-4, Jan 2007.

CARRILHO, M. R.; CARVALHO, R. M.; SOUSA, E. N.; NICOLAU, J.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; TJADERHANE, L.; TAY, F. R.; AGEE, K.; PASHLEY, D. H. Substantivity of

chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater*, v. 26, n. 8, p. 779-85, Aug 2010.

CARRILHO, M. R.; GERALDELI, S.; TAY, F.; DE GOES, M. F.; CARVALHO, R. M.; TJADERHANE, L.; REIS, A. F.; HEBLING, J.; MAZZONI, A.; BRESCHI, L.; PASHLEY, D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res*, v. 86, n. 6, p. 529-33, Jun 2007.

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

CECCHIN, D.; PIN, L. C.; FARINA, A. P.; SOUZA, M.; VIDAL, C. D. M. P.; BELLO, Y. D.; FERRAZ, C. C. R.; BEDRAN-RUSSO, A. Bond Strength between Fiber Posts and Root Dentin Treated with Natural Cross-linkers. *Journal of Endodontics*, v. 41, n. 10, p. 1667-1671, 10// 2015.

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

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

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

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

COGULU, D.; 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. 443-9, Sep 2008.

COHEN, K. M. H. S. *Caminhos da Polpa*. 11. Rio de Janeiro - RJ: Elsevier, 2011. 900 ISBN 978-85-352-3965-2.

CRUZ-FILHO, A. M.; SOUSA-NETO, M. D.; SAVIOLI, R. N.; SILVA, R. G.; VANSAN, L. P.; PÉCORÁ, J. D. Effect of Chelating Solutions on the Microhardness of Root Canal Lumen Dentin. *Journal of Endodontics*, v. 37, n. 3, p. 358-362, 3// 2011.

CUEVA, C.; MINGO, S.; MUNOZ-GONZALEZ, I.; BUSTOS, I.; REQUENA, T.; DEL CAMPO, R.; MARTIN-ALVAREZ, P. J.; BARTOLOME, B.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Antibacterial activity of wine phenolic compounds and oenological extracts against potential respiratory pathogens. *Lett Appl Microbiol*, v. 54, n. 6, p. 557-63, Jun 2012.

D'AMATO-PALUMBO, S.; 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, Jan 2013.

DAMETTO, F. R.; FERRAZ, C. C.; GOMES, B. P.; ZAIA, A. A.; TEIXEIRA, F. B.; DE 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. 768-72, Jun 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. 1953-7, Dec 2014.

DE ANDRADE FERREIRA, F. B.; SILVA E SOUZA, P. C. D. A. R.; VALE, M. S. D.; DE MORAES, I. G.; GRANJEIRO, J. M. Evaluation of pH levels and calcium ion release in various calcium hydroxide endodontic dressings. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 97, n. 3, p. 388-392, 3// 2004.

DIAS, K. C.; SOARES, C. J.; STEIER, L.; VERSIANI, M. A.; RACHED-JUNIOR, F. J.; PECORA, J. D.; SILVA-SOUSA, Y. T.; DE SOUSA-NETO, M. D. Influence of drying protocol with isopropyl alcohol on the bond strength of resin-based sealers to the root dentin. *J Endod*, v. 40, n. 9, p. 1454-8, Sep 2014.

DIOGENES, A.; RUPAREL, N. B.; SHILOAH, Y.; HARGREAVES, K. M. Regenerative endodontics: A way forward. *J Am Dent Assoc*, v. 147, n. 5, p. 372-80, May 2016.

DRUMMOND, J. L.; SAKAGUCHI, R. L.; RACEAN, D. C.; WOZNY, J.; STEINBERG, A. D. Testing mode and surface treatment effects on dentin bonding. *J Biomed Mater Res*, v. 32, n. 4, p. 533-41, Dec 1996.

ELAKANTI, S.; CHERUKURI, G.; RAO, V. G.; CHANDRASEKHAR, V.; RAO, A. S.; TUMMALA, M. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of QMix 2 in 1, sodium hypochlorite, and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *J Conserv Dent*, v. 18, n. 2, p. 128-31, Mar-Apr 2015.

EPASINGHE, D. J.; YIU, C. K.; BURROW, M. F.; HIRAIISHI, N.; TAY, F. R. The inhibitory effect of proanthocyanidin on

soluble and collagen-bound proteases. *J Dent*, v. 41, n. 9, p. 832-9, Sep 2013.

ERCAN, E.; OZEKINCI, T.; ATAKUL, F.; GUL, K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *J Endod*, v. 30, n. 2, p. 84-7, Feb 2004.

EVANS, M. D.; BAUMGARTNER, J. C.; KHEMALEELAKUL, S. U.; XIA, T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod*, v. 29, n. 5, p. 338-9, May 2003.

FERRAZ, C. C.; 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. 452-5, Jul 2001.

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

FRANZ, A.; LETTNER, S.; WATTS, D. C.; GRAF, A.; MORITZ, A.; SCHEDLE, A. Analysis of pre-test failures and bond-strengths of seven adhesive systems to bovine dentine: A nine-year novice/beginner operator study. *Dental Materials*, v. 34, n. 11, p. 1599-1609, 2018/11/01/ 2018.

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

FURIGA, A.; ROQUES, C.; BADET, C. Preventive effects of an original combination of grape seed polyphenols with amine

fluoride on dental biofilm formation and oxidative damage by oral bacteria. *J Appl Microbiol*, v. 116, n. 4, p. 761-71, Apr 2014.

GHINZELLI, G. C.; SOUZA, M. A.; CECCHIN, D.; FARINA, A. P.; DE FIGUEIREDO, J. A. P. Influence of ultrasonic activation on photodynamic therapy over root canal system infected with *Enterococcus faecalis* – an in vitro study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 11, n. 4, p. 472-478, 12// 2014.

GHONMODE, W. N.; 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. 61-6, Dec 2013.

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. 247-53, Aug 2006.

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. 267-75, Apr 2003.

GORACCI, C.; TAVARES, A. U.; FABIANELLI, A.; MONTICELLI, F.; RAFFAELLI, O.; CARDOSO, P. C.; TAY, F.; FERRARI, M. The adhesion between fiber posts and root canal walls: comparison between microtensile and push-out bond strength measurements. *Eur J Oral Sci*, v. 112, n. 4, p. 353-61, Aug 2004.

GRAZIELE MAGRO, M.; KUGA, M. C.; REGINA VICTORINO, K.; VAZQUEZ-GARCIA, F. A.; ARANDA-

GARCIA, A. J.; FARIA-JUNIOR, N. B.; FARIA, G.; LUIS SHINOHARA, A. Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and several formulations containing chlorhexidine and its effect on the radicular dentin--SEM and push-out bond strength analysis. *Microsc Res Tech*, v. 77, n. 1, p. 17-22, Jan 2014.

GRIGORATOS, D.; KNOWLES, J.; NG, Y. L.; GULABIVALA, K. Effect of exposing dentine to sodium hypochlorite and calcium hydroxide on its flexural strength and elastic modulus. *International Endodontic Journal*, v. 34, n. 2, p. 113-119, 2001.

GRUNDLING, G. L.; ZECHIN, J. G.; JARDIM, W. M.; DE OLIVEIRA, S. D.; DE FIGUEIREDO, J. A. Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. *J Endod*, v. 37, n. 8, p. 1128-33, Aug 2011.

GUERREIRO-TANOMARU, J. M.; DE FARIA-JUNIOR, 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. 346-50, Mar 2013.

GUO, W.; QUAH, S. Y.; LIM, K. C.; YU, V. S. H.; TAN, K. S. Cysteamine Enhances Biofilm Eradication Efficacy of Calcium Hydroxide. *Journal of Endodontics*, v. 42, n. 5, p. 742-746, 5// 2016.

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

HOLLAND, R.; OTOBONI FILHO, J. A.; DE SOUZA, V.; NERY, M. J.; BERNABÉ, P. F. E.; DEZAN JR, E. A Comparison of One Versus Two Appointment Endodontic Therapy in Dogs' Teeth with Apical Periodontitis. *Journal of Endodontics*, v. 29, n. 2, p. 121-124, 2// 2003.

HUFFMAN, B. P.; MAI, S.; PINNA, L.; WELLER, R. N.; PRIMUS, C. M.; GUTMANN, J. L.; PASHLEY, D. H.; TAY, F. R. Dislocation resistance of ProRoot Endo Sealer, a calcium silicate-based root canal sealer, from radicular dentine. *Int Endod J*, v. 42, n. 1, p. 34-46, Jan 2009.

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

KAHLER, S. L.; SHETTY, S.; ANDREASEN, F. M.; KAHLER, B. The Effect of Long-term Dressing With Calcium Hydroxide on the Fracture Susceptibility of Teeth. *J Endod*, Dec 16 2017.

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

KALRA, M.; IQBAL, K.; NITISUSANTA, L. I.; DAOOD, U.; SUM, C. P.; FAWZY, A. S. The effect of proanthocyanidins on the bond strength and durability of resin sealer to root dentine. *Int Endod J*, v. 46, n. 2, p. 169-78, Feb 2013.

KAO, T. T.; 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. 1-2, p. 17-27, Jun 30 2010.

LANA, P. E. P.; SCELZA, M. F. Z.; SILVA, L. E.; MATTOS-GUARALDI, A. L. D.; HIRATA JÚNIOR, R. Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis*

cultivated in Root Canal Systems. *Brazilian Dental Journal*, v. 20, p. 32-36, 2009.

LEONARDO, M. R.; DA SILVA, L. A. B.; FILHO, M. T.; BONIFÁCIO, K. C.; ITO, I. Y. In Vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of Sealers and Pastes Used in Endodontics. *Journal of Endodontics*, v. 26, n. 7, p. 391-394, 7// 2000.

LEONARDO, M. R.; HERNANDEZ, M. E. F. T.; SILVA, L. A. B.; TANOMARU-FILHO, M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 102, n. 5, p. 680-685, 11// 2006.

LEONARDO, M. R. L. R. D. T. Tratamento de canais radiculares: avanços tecnológicos de uma endodontia minimamente invasiva e reparadora. São Paulo: Artes Médicas, 2012. 472 ISBN 978-85-367-0173-8.

MACHNICK, T. K.; TORABINEJAD, M.; MUNOZ, C. A.; SHABAHANG, S. Effect of MTAD on flexural strength and modulus of elasticity of dentin. *J Endod*, v. 29, n. 11, p. 747-50, Nov 2003.

MAEKAWA, L. E.; VALERA, M. C.; OLIVEIRA, L. D. D.; CARVALHO, C. A. T.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. In vitro evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on *Escherichia coli* and its endotoxin in root canals. *Journal of Applied Oral Science*, v. 19, p. 106-112, 2011.

MEHRVARZ FAR, P.; SAGHIRI, M. A.; ASATOURIAN, A.; FEKRAZAD, R.; KARAMIFAR, K.; ESLAMI, G.; DADRESANFAR, B. Additive effect of a diode laser on the antibacterial activity of 2.5% NaOCl, 2% CHX and MTAD against *Enterococcus faecalis* contaminating root canals: an in vitro study. *J Oral Sci*, v. 53, n. 3, p. 355-60, Sep 2011.

MENEZES, M. M.; VALERA, M. C.; JORGE, A. O.; KOGA-ITO, C. Y.; CAMARGO, C. H.; MANCINI, M. N. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J*, v. 37, n. 5, p. 311-9, May 2004.

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

MUNOZ-GONZALEZ, I.; THURNHEER, T.; BARTOLOME, B.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Red wine and oenological extracts display antimicrobial effects in an oral bacteria biofilm model. *J Agric Food Chem*, v. 62, n. 20, p. 4731-7, May 21 2014.

MURAD, C. F.; 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, Jul 2014.

NERURKAR, M. J.; ZENTNER, G. M.; RYTTING, J. H. Effect of chloride on the release of chlorhexidine salts from methyl methacrylate: 2-hydroxyethyl methacrylate copolymer reservoir devices. *Journal of Controlled Release*, v. 33, n. 3, p. 357-363, 3// 1995.

NERWICH, A.; FIGDOR, D.; MESSER, H. H. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *Journal of Endodontics*, v. 19, n. 6, p. 302-306, 6// 1993.

OK, E.; ERTAS, H.; SAYGILI, G.; GOK, T. Effect of photoactivated disinfection on bond strength of root canal filling. *J Endod*, v. 39, n. 11, p. 1428-30, Nov 2013.

OLIVEIRA, L. D.; CARVALHO, C. A.; NUNES, W.; VALERA, M. C.; CAMARGO, C. H.; JORGE, A. O. Effects of chlorhexidine and sodium hypochlorite on the microhardness of root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 104, n. 4, p. e125-8, Oct 2007.

ORDINOLA-ZAPATA, R.; BRAMANTE, C. M.; MINOTTI, P. G.; CAVENAGO, B. C.; GARCIA, R. B.; BERNARDINELLI, N.; JARAMILLO, D. E.; HUNGARO DUARTE, M. A. Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral-infected dentin biofilm model. *J Endod*, v. 39, n. 1, p. 115-8, Jan 2013.

PAIVA, S. S.; SIQUEIRA, J. F., JR.; ROCAS, I. N.; CARMO, F. L.; FERREIRA, D. C.; CURVELO, J. A.; SOARES, R. M.; ROSADO, A. S. Supplementing the antimicrobial effects of chemomechanical debridement with either passive ultrasonic irrigation or a final rinse with chlorhexidine: a clinical study. *J Endod*, v. 38, n. 9, p. 1202-6, Sep 2012.

PALTI, D. G.; MACHADO, M. A. D. A. M.; SILVA, S. M. B. D.; ABDO, R. C. C.; LIMA, J. E. D. O. Evaluation of superficial microhardness in dental enamel with different eruptive ages. *Brazilian Oral Research*, v. 22, p. 311-315, 2008.

PATIERNO, J. M.; RUEGGEBERG, F. A.; ANDERSON, R. W.; WELLER, R. N.; PASHLEY, D. H. Push-out strength and SEM evaluation of resin composite bonded to internal cervical dentin. *Endod Dent Traumatol*, v. 12, n. 5, p. 227-36, Oct 1996.

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

PINHEIRO, E. T.; GOMES, B. P.; FERRAZ, C. C.; SOUSA, E. L.; 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, Jan 2003.

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

RAN, S.; 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. 362-72, Apr 2015.

REEH, E. S.; MESSER, H. H.; DOUGLAS, W. H. Reduction in tooth stiffness as a result of endodontic and restorative procedures. *Journal of Endodontics*, v. 15, n. 11, p. 512-516, 1989/11/01/ 1989.

RIBEIRO, D. A.; SCOLASTICI, C.; DE LIMA, P. L.; MARQUES, M. E.; SALVADORI, D. M. Genotoxicity of antimicrobial endodontic compounds by single cell gel (comet) assay in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 99, n. 5, p. 637-40, May 2005.

RICUCCI, D.; LOGHIN, S.; SIQUEIRA JR, J. F. Exuberant Biofilm Infection in a Lateral Canal as the Cause of Short-term Endodontic Treatment Failure: Report of a Case. *Journal of Endodontics*, v. 39, n. 5, p. 712-718, 5// 2013.

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. 508-15, Jun 2008.

SCAFFA, P. M.; VIDAL, C. M.; BARROS, N.; GESTEIRA, T. F.; CARMONA, A. K.; BRESCHI, L.; PASHLEY, D. H.; TJADERHANE, 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. 420-5, Apr 2012.

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

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

SILVEIRA, A. M. V.; LOPES, H. P.; SIQUEIRA JR, J. F.; MACEDO, S. B.; CONSOLARO, A. Periradicular repair after two-visit endodontic treatment using two different intracanal medications compared to single-visit endodontic treatment. *Brazilian Dental Journal*, v. 18, p. 299-304, 2007.

SIMEZO, A. P.; DA SILVEIRA BUENO, C. E.; CUNHA, R. S.; PELEGRINE, R. A.; ROCHA, D. G. P.; DE MARTIN, A. S.; KATO, A. S. Comparative Analysis of Dentinal Erosion after Passive Ultrasonic Irrigation versus Irrigation with Reciprocating Activation: An Environmental Scanning Electron Study. *Journal of Endodontics*, v. 43, n. 1, p. 141-146, 2017/01/01/ 2017.

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

SLUTZKY-GOLDBERG, I.; MAREE, M.; LIBERMAN, R.; HELING, I. Effect of Sodium Hypochlorite on Dentin Microhardness. *Journal of Endodontics*, v. 30, n. 12, p. 880-882, 12// 2004.

SOARES, C. J.; SANTANA, F. R.; CASTRO, C. G.; SANTOS-FILHO, P. C.; SOARES, P. V.; QIAN, F.; ARMSTRONG, S. R. Finite element analysis and bond strength of a glass post to

intraradicular dentin: comparison between microtensile and push-out tests. *Dent Mater*, v. 24, n. 10, p. 1405-11, Oct 2008.

SOUSA-NETO, M. D.; SILVA COELHO, F. I.; MARCHESAN, M. A.; ALFREDO, E.; SILVA-SOUSA, Y. T. Ex vivo study of the adhesion of an epoxy-based sealer to human dentine submitted to irradiation with Er : YAG and Nd : YAG lasers. *Int Endod J*, v. 38, n. 12, p. 866-70, Dec 2005.

SOUZA, M.; CECCHIN, D.; FARINA, A. P.; LEITE, C. E.; CRUZ, F. F.; PEREIRA CDA, C.; FERRAZ, C. C.; FIGUEIREDO, J. A. Evaluation of chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. *J Endod*, v. 38, n. 9, p. 1249-52, Sep 2012.

SOUZA, S. F.; BOMBANA, A. C.; FRANCCI, C.; GONCALVES, F.; CASTELLAN, C.; BRAGA, R. R. Polymerization stress, flow and dentine bond strength of two resin-based root canal sealers. *Int Endod J*, v. 42, n. 10, p. 867-73, Oct 2009.

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

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

TENNERT, C.; 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. 670-7, May 2014.

THIMOTHE, J.; BONSI, I. A.; PADILLA-ZAKOUR, O. I.; KOO, 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. 55, n. 25, p. 10200-7, Dec 12 2007.

TOPCUOGLU, H. S.; TUNCAY, O.; DEMIRBUGA, S.; DINCER, A. N.; ARSLAN, H. The effect of different final irrigant activation techniques on the bond strength of an epoxy resin-based endodontic sealer: a preliminary study. *J Endod*, v. 40, n. 6, p. 862-6, Jun 2014.

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

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

VIDAL, C. M.; AGUIAR, T. R.; PHANSALKAR, R.; MCALPINE, J. B.; NAPOLITANO, J. G.; CHEN, S. N.; ARAUJO, 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. 3288-94, Jul 2014.

WANEES AMIN, S. A.; SEYAM, R. S.; EL-SAMMAN, M. A. The Effect of Prior Calcium Hydroxide Intracanal Placement on the Bond Strength of Two Calcium Silicate-based and an Epoxy Resin-based Endodontic Sealer. *Journal of Endodontics*, v. 38, n. 5, p. 696-699, 2012/05/01/ 2012.

WEBER, C. D.; MCCLANAHAN, S. B.; MILLER, G. A.; DIENER-WEST, M.; JOHNSON, J. D. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. *J Endod*, v. 29, n. 9, p. 562-4, Sep 2003.

XAVIER, A. C. C.; MARTINHO, F. C.; CHUNG, A.; OLIVEIRA, L. D.; JORGE, A. O. C.; VALERA, M. C.; CARVALHO, C. A. T. One-Visit Versus Two-Visit Root Canal Treatment: Effectiveness in the Removal of Endotoxins and Cultivable Bacteria. *Journal of Endodontics*, v. 39, n. 8, p. 959-964, 2013/08/01/ 2013.

ZAREI, M.; AFKHAMI, F.; MALEK POOR, Z. Fracture resistance of human root dentin exposed to calcium hydroxide intervisit medication at various time periods: an in vitro study. *Dent Traumatol*, v. 29, n. 2, p. 156-60, Apr 2013.

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

ZHOU, H.-M.; DU, T.-F.; SHEN, Y.; WANG, Z.-J.; ZHENG, Y.-F.; HAAPASALO, M. In Vitro Cytotoxicity of Calcium Silicate-containing Endodontic Sealers. *Journal of Endodontics*, v. 41, n. 1, p. 56-61, 2015/01/01/ 2015.

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. 1950-5, Dec 2010.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa:

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MEDICAÇÕES INTRACANAL CONTRA ENTEROCOCCUS FAECALIS E SUA INFLUÊNCIA NA RESISTÊNCIA DE UNIÃO DO MATERIAL OBTURADOR E MICRODUREZA DA DENTINA

Pesquisador: DANIEL DE LIMA DALLA LANA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 66611616.3.0000.5342

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.033.198

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, este Comitê, de acordo com as atribuições definidas na Resolução n. 466/12, do Conselho Nacional da Saúde, Ministério da Saúde, Brasil, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_776004.pdf	28/03/2017 17:16:56		Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao.pdf	28/03/2017 17:15:43	DANIEL DE LIMA DALLA LANA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	temodados.pdf	28/03/2017 17:15:12	DANIEL DE LIMA DALLA LANA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	bancodedentes.pdf	28/03/2017 17:08:23	DANIEL DE LIMA DALLA LANA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetotesedaniel.pdf	29/08/2016 11:35:36	DANIEL DE LIMA DALLA LANA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	24/08/2016 17:33:26	DANIEL DE LIMA DALLA LANA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PASSO FUNDO, 26 de Abril de 2017

Assinado por:
Felipe Cittolin Abal
(Coordenador)

Apêndice 2 – Confirmação de submissão de artigo ao *Journal of Endodontics*:

Fw: Submission Confirmation for Effectiveness of grape seed extract-based intracanal dressings against Enterococcus faecalis and its influence on dentin microhardness and bond strength of filling material

De: Matheus Souza (matheus292@yahoo.com.br)

Para: danieldlana@yahoo.com.br

Data: quinta-feira, 14 de fevereiro de 2019 15:46 BRST

Matheus A. Souza Doutor em Endodontia - CRO 16.658 Professor Adjunto - Endodontia e Clínica Odontológica Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo BR 285 / São José Passo Fundo - RS - Brasil +55 (54) 9970-0777 matheussouza@upf.br / matheus292@yahoo.com.br

— Mensagem encaminhada —

De: The Journal of Endodontics <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Para: "matheus292@yahoo.com.br" <matheus292@yahoo.com.br>

Enviado: quinta-feira, 14 de fevereiro de 2019 14:49:48 BRST

Assunto: Submission Confirmation for Effectiveness of grape seed extract-based intracanal dressings against Enterococcus faecalis and its influence on dentin microhardness and bond strength of filling material

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Souza,

Your submission entitled "Effectiveness of grape seed extract-based intracanal dressings against Enterococcus faecalis and its influence on dentin microhardness and bond strength of filling material" has been received by the Journal of Endodontics.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Journal of Endodontics web site as an author.

The URL is <https://ees.elsevier.com/joe/>

Your username is: matheus292@yahoo.com.br

If you need to retrieve password details,
please go to: http://ees.elsevier.com/joe/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to the Journal of Endodontics.

Kind regards,

Journal of Endodontics

Apêndice 3 – Artigo submetido:

Manuscript Number:

Title: Effectiveness of grape seed extract-based intracanal dressings against *Enterococcus faecalis* and its influence on dentin microhardness and bond strength of filling material

Article Type: Clinical Research

Keywords: antimicrobial activity, bond strength, grape seed extract, intracanal dressing, microhardness.

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; Daniel L Dalla Lana; Amália Pletsch; Huriel S Palhano; Juliane Bervian; Douglas Cecchin

Manuscript Region of Origin: Latin & South America

Abstract: Objectives: The aim of this study was to evaluate the effectiveness of grape seed extract (GSE)-based intracanal dressings against *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*) and its influence on dentin microhardness and bond strength of filling material.

Methods: The root canals of 126 human teeth were distributed into four tests: antimicrobial activity (60 teeth), dentin microhardness (30 teeth) and bond strength (36 teeth). In all four tests, the samples were subdivided into six groups, according to intracanal dressing protocols: G1:distilled water(DW); G2:2% chlorhexidine gel(CHX); G3:calcium hydroxide($\text{Ca}[\text{OH}]_2$)+DW; G4:GSE+DW; G5: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +CHX; G6:GSE+CHX. The counting of colony-forming units(CFUs), the Vickers microhardness tester and the push-out test were performed to evaluate the antimicrobial activity, dentin microhardness and bond strength respectively. Specific statistical analysis was performed for each evaluation ($\alpha=5\%$).

Results: The greatest bacterial reduction was observed in Groups 5($\text{Ca}[\text{OH}]_2$ +CHX) and 6(GSE+CHX) ($p<0.05$). There was no statistically significant difference between all groups in the dentin microhardness evaluation ($p<0.05$). The highest bond strength in the immediate evaluation was observed in Groups 4(GSE+DW) and 6(GSE+CHX), whereas the highest bond strength after 12 months of storage was observed in Groups 2(CHX), 3($\text{Ca}(\text{OH})_2$ +DW), 4(GSE+DW) and 6(GSE+CHX) ($p<0.05$). After the storage period, the bond strength was increased in the Groups 2(CHX) and 3($\text{Ca}(\text{OH})_2$ +DW), as well as preserved in the group 4(GSE+DW) and 6(GSE+CHX) ($p<0.05$).

Conclusions: the GSE-based intracanal dressings has antimicrobial potential against *E.faecalis*, does not have influence in the dentin microhardness and preserves the high bond strength of filling material to root dentin along the time.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

**Effectiveness of grape seed extract-based intracanal dressings against
Enterococcus faecalis and its influence on dentin microhardness and bond strength
of filling material**

Matheus Albino Souza¹, Daniel de Lima Dalla Lana¹, Amália Pletsch¹, Huriel Scartazzini Palhano¹, Juliane Bervian¹, Douglas Cecchin¹.

¹ School of Dentistry, University of Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil

Acknowledgments: We have no financial affiliation (e.g., employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultancies, patent licensing arrangements, or honoraria) or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, and neither have any such arrangements existed in the past 3 years.

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

Statement of clinical significance:

Using GSE-based intracanal dressings has benefits on antimicrobial activity, dentin microhardness and bond strength of filling material. Then, it can be an alternative to be used as intracanal dressing in the endodontic therapy.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 **ABSTRACT**

2
3 *Objectives:* The aim of this study was to evaluate the effectiveness of grape seed extract (GSE)-
4 based intracanal dressings against *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*) and its influence on dentin
5 microhardness and bond strength of filling material.

6 *Methods:* The root canals of 126 human teeth were distributed into four tests: antimicrobial
7 activity (60 teeth), dentin microhardness (30 teeth) and bond strength (36 teeth). In all four tests,
8 the samples were subdivided into six groups, according to intracanal dressing protocols:
9 G1:distilled water(DW); G2:2% chlorhexidine gel(CHX); G3:calcium
10 hydroxide(Ca[OH]₂)+DW; G4:GSE+DW; G5:Ca(OH)₂+CHX; G6:GSE+CHX. The counting of
11 colony-forming units(CFUs), the Vickers microhardness tester and the push-out test were
12 performed to evaluate the antimicrobial activity, dentin microhardness and bond strength
13 respectively. Specific statistical analysis was performed for each evaluation ($\alpha=5\%$).

14 *Results:* The greatest bacterial reduction was observed in Groups 5(Ca[OH]₂+CHX) and
15 6(GSE+CHX) ($p<0.05$). There was no statistically significant difference between all groups in
16 the dentin microhardness evaluation ($p<0.05$). The highest bond strength in the immediate
17 evaluation was observed in Groups 4(GSE+DW) and 6(GSE+CHX), whereas the highest bond
18 strength after 12 months of storage was observed in Groups 2(CHX), 3(Ca(OH)₂+DW),
19 4(GSE+DW) and 6(GSE+CHX) ($p<0.05$). After the storage period, the bond strength was
20 increased in the Groups 2(CHX) and 3(Ca(OH)₂+DW), as well as preserved in the group
21 4(GSE+DW) and 6(GSE+CHX) ($p<0.05$).

22 *Conclusions:* the GSE-based intracanal dressings has antimicrobial potential against *E.faecalis*,
23 does not have influence in the dentin microhardness and preserves the high bond strength of
24 filling material to root dentin along the time.

25
26 **Keywords:** antimicrobial activity, bond strength, grape seed extract, intracanal dressing,
27 microhardness.

1
2
3
4 **1 Introduction**
5

6 2 The conventional chemo-mechanical preparation by using irrigants and endodontic
7 3 instruments do not promote complete neutralization of microorganisms during endodontic
8 4 therapy [1]. This occurs because the presence of resistant bacteria in the endodontic microbiota
9 5 that colonize the root canals and persist after decontamination procedures [2]. Furthermore,
10 6 because the anatomical complexity of the root canal system, microorganisms, inorganic and
11 7 organic components cannot always be reached by chemical auxiliary substances, as well as some
12 8 areas of the main root canal are not touched by endodontic instruments [3]. Thus, additional
13 9 antimicrobial strategies are necessary, such as intracanal dressings, in order to aid the
14 10 decontamination of root canal system.

15 11 Calcium hydroxide (Ca[OH]₂) is the most used intracanal dressing in endodontics, due to its
16 12 ability to neutralise bacterial endotoxins, induce mineralisation on periapical tissues and
17 13 biocompatibility [4]. Furthermore, Ca(OH)₂-based intracanal dressings act as physical barrier,
18 14 inhibiting the flow of nutrients and bacterial recolonization [5]. However, microorganisms such
19 15 as *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*) demonstrate resistance to Ca(OH)₂ [6]. Finally, Ca(OH)₂
20 16 based intracanal dressings decrease the root fracture resistance [7], increase the root dentin
21 17 microhardness [7] and can present negative effect on the bond strength of resin-based endodontic
22 18 sealers [8]. Thus, it is important to identify new alternatives that contribute in a better way to the
23 19 decontamination process of root canal system, with no harmful effects to root dentin and root
24 20 canal filling.

25 21 Nowadays, there are a growing number of studies testing natural substances in the endodontic
26 22 field, since the literature has shown antimicrobial potential against endodontic pathogens for
27 23 these substances, such as grape seed extract (GSE) [9,10]. The GSE represent a natural
28 24 compound, which has proanthocyanidins (PACs) in its composition. The PACs are recognized to
29 25 present therapeutic activities, providing antioxidant, antimutagenic and antibacterial effects [11].
30 26 In addition, PACs are known to enhance the dentine biomechanical properties and biostability
31 27 [12]. However, the previous studies are related with the use of GSE as chemical auxiliary
32 28 substance or final decontamination protocol [9,10]. There are no studies in the literature
33 29 regarding the use of GSE as intracanal dressing, evaluating the antimicrobial effectiveness and
34 30 the influence on dentin mechanical properties and bond strength of filling material.

1
2
3
4 1 The purpose of this study was to evaluate, *in vitro*, the effectiveness of GSE-based intracanal
5 dressings against *E.faecalis* and its influence on dentin microhardness and bond strength of
6
7 2 filling material. The present hypotheses were that GSE-based intracanal dressings (i) promote
8 3 effective reduction of *E.faecalis* (ii), do not interfere in the dentin microhardness and (iii)
9 4 improve the bond strength of the filling material.
10 5
11 6

15 7 **Materials and Methods**

17 8 This study was approved by the local ethics committee (Passo Fundo, RS, Brazil) (protocol
18 9 2.033.198).
19
20
21 10

22 11 **Sample obtaining and preparation**

24 12 One hundred and twenty six extracted single-rooted human teeth were obtained from the
25 13 Biobank of the School of Dentistry of the University of Passo Fundo. Dental crowns were
26 14 sectioned at the cementoenamel junction using a rotating diamond saw so that all roots retained a
27 15 length of 15 mm.
28
29
30

31 16 The cervical third was prepared using a Largo drill #3 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues,
32 17 Switzerland). The working length was established by inserting a K-file #10 (Dentsply-Maillefer)
33 18 into the canal until its tip was visualized at the apical foramen. From this measurement, 1 mm
34 19 was subtracted, thus establishing the working length. The root canals were enlarged to working
35 20 length using the ProTaper system (Dentsply Tulsa Dental Specialties, Johnson City, TN, USA),
36 21 following the sequence S1 to F3. The ProTaper files (Dentsply Tulsa Dental Specialties) were
37 22 used in a 16:1 gear reduction handpiece powered by a torque-controlled electric at a constant
38 23 rotation speed of 300 rpm in a crown-down manner, by using a gentle in-and-out digital motion.
39 24 The irrigant solution was distilled water (DW) (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brazil) and it was
40 25 replaced with each change of instrument. After instrumentation, the root canals were irrigated
41 26 with 5 mL of DW and 3 mL of 17% EDTA (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brazil), which
42 27 remained for 1 minute into the root canal, in order to remove the smear layer. Then, the root
43 28 canals were irrigated with 5 mL of DW again and dried using a suction cannula. The 126 roots
44 29 were randomly divided into three experimental test groups, as follows: 60 roots were used for
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 antimicrobial activity evaluation, 30 roots for microhardness evaluation and 36 roots for bond strength evaluation.

4 **Evaluation of antimicrobial activity**

5 The 60 roots were fixed in a plastic micro-tube (Axygen Inc., Union City, CA, USA), and
6 sterilized at 120°C in an autoclave (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brazil) for 30 min. After
7 sterilization, six teeth were randomly submitted to the sterilization control. A sterile paper point
8 #30 (Tanari, Manucapuru, AM, Brazil) was placed in contact with the root canal walls for 30
9 seconds and individually transported to a plastic microtube containing 1 ml of 0.9% saline
10 solution (Basso, Caxias do Sul, RS, Brazil). The material was homogenized and an aliquot of
11 100 µL of saline solution was cultivated on blood agar after five minutes. The samples were
12 incubated at 37°C for 48 hours, in order to verify bacterial growth. Those samples did not show
13 any bacterial growth.

14 After that, a 100-µL aliquot of a culture of *E.faecalis* (ATCC 19433) was inoculated into the
15 root canal of each sample. The remaining volume was completely filled with sterile brain-heart-
16 infusion (BHI) broth (Acumedia – Neogen, Lansing, MI, USA). The culture of *E.faecalis* was
17 maintained for 14 days, promoting the bacterial growth. The BHI broth was replaced every 48
18 hours. Once a week, an aliquot of BHI obtained from six teeth randomly selected was submitted
19 to Gram staining and cultured on blood agar, followed by catalase and esculin tests, in order to
20 verify the absence of contamination with other microorganisms. These fact was detected,
21 obtaining a pure culture of *E.faecalis* after 14 days.

22 After contamination, the 60 samples were irrigated with 5 mL of DW and randomly divided
23 into six groups (n=10) according to the intracanal dressing: G1 – DW (negative control); G2 –
24 2% chlorhexidine gel (CHX); G3 – Ca(OH)₂+DW; G4 – GSE+DW; G5 – Ca(OH)₂+CHX; and
25 G6 – GSE+CHX. In groups 1 (DW) and 2 (CHX), the intracanal dressing was inserted with a 3
26 mL disposable syringe (Descarpack, São Paulo, SP, Brazil) and a 30 gauge needle (Navi-Tip -
27 Ultradent, South Jordan, UT, Estados Unidos), until the root canal was completely filled. In
28 groups 3 (Ca[OH]₂+DW) and 4 (GSE+DW), the intracanal dressing was obtained from mixing
29 0.1g of the powder of tested substance and 100 µl of DW. After paste obtaining, the root canals
30 were completely filled with the respective intracanal dressing, by using a Lentulo drill (Dentsply-

1
2
3
4 1 Maillefer, Ballaigues, Switzerland), which was positioned 3 mm short to working length. In
5
6 2 groups 5 (Ca[OH]₂+CHX) and 6 (GSE+CHX), the intracanal dressing was obtained from mixing
7
8 3 0.1g of the powder of tested substance and 100 µl of CHX. After paste obtaining, the root canals
9
10 4 were completely filled with the respective intracanal dressing in the same way as that described
11
12 5 in groups 3 and 4.

13 6 The 60 samples were sealed with provisional restorative material (Cavitec – Caitthec, Rio do
14
15 7 Sul, SC, Brazil) and stored for 14 days at 37°C and under humidity. After 14 days, the
16
17 8 provisional restoration and intracanal dressing were removed by using #1012 drill (Dentsply-
18
19 9 Maillefer, Ballaigues, Switzerland) and irrigation with 10 mL of DW respectively.

20 10 The microbiological analysis was performed in two stages: initial sample (S1) – after
21
22 11 contamination and before intracanal dressing protocols; and final sample (S2) – after 14 days of
23
24 12 storage and removal of intracanal dressing protocols. In both stages, the root canals were filled
25
26 13 with sterile saline solution. A sterile K-file #30 (Dentsply-Maillefer) was inserted at the working
27
28 14 length, promoting contact with the root canal walls for 30 seconds. A sterile absorbent paper
29
30 15 point #30 (Tanari) worked into the root canal in the same way for 30 seconds, after which it was
31
32 16 transferred to a tube containing 450 µL of sterile saline solution. The material was homogenized
33
34 17 and diluted to 1×10⁻³. Aliquots of 100 µL of solution and each of the dilutions were cultivated on
35
36 18 the surface of blood agar in duplicate. These samples were incubated for 18–24 h at 37°C. The
37
38 19 numbers of colony-forming units (CFUs) were then counted on the plates.

39 20 The effectiveness of the intracanal dressing protocols was analyzed according to the
40
41 21 percentage reduction of *E.faecalis* from the initial (S1) and final (S2) samples. All procedures
42
43 22 were performed under aseptic conditions in a laminar flow hood.

23 24 **Evaluation of microhardness**

25
26 27 After sample obtaining and dental crowns removal, two longitudinal grooves were produced
28
29 28 in the external root surface of each one of 30 roots without reaching the canal space, by using a
30
31 29 diamond disc. The chemomechanical preparation was performed as previously described in the
32
33 30 antimicrobial activity evaluation. The 30 samples were randomly divided into six groups (5 roots
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 1 per group) and submitted to the same intracanal dressing protocols, as described previously in
5
6 2 the antimicrobial activity evaluation.

7
8 3 After 14 days, the provisional restoration and intracanal dressing were removed by using
9
10 4 #1012 drill (Dentsply-Maillefer) and irrigation with 10 mL of DW respectively. The roots were
11
12 5 split into two halves with a hammer and chisel, providing 2 halves of each root and resulting in
13
14 6 10 samples per group (n=10).

15
16 7 The roots were embedded in self-curing acrylic resin held in plastic rings. The coronal portion
17
18 8 of each segment was ground with carborundum discs (300, 600, and 1200 grade) under
19
20 9 refrigeration and then polished using diamond paste. Microhardness measurements were
21
22 10 performed on each section at 500 μm from the pulp-dentin interface, and two other indentations
23
24 11 were made at a distance of 200 μm from each other. At each depth, one indentation were made
25
26 12 using a 10-g load oriented perpendicular to the indentation surface for 15 seconds. Measurements
27
28 13 were taken with a Knoop Microhardness Tester (HVM 2000 – Shimadzu, Kyoto, Japan). The
29
30 14 dentin microhardness value for each specimen was obtained as the average of the results for the
31
32 15 three indentations.

33 17 **Evaluation of bond strength**

34
35 18 After sample obtaining and dental crowns removal, the chemomechanical preparation was
36
37 19 performed in each one of 36 remaining roots, as previously described in the antimicrobial
38
39 20 activity evaluation. The 36 samples were randomly divided into six groups (6 roots per group)
40
41 21 and submitted to the same intracanal dressing protocols, as described previously in the
42
43 22 antimicrobial activity evaluation. After 14 days, the provisional restoration and intracanal
44
45 23 dressing were removed by using #1012 drill (Dentsply-Maillefer) and irrigation with 10 mL of
46
47 24 DW respectively. Then, the root canals were dried with suction cannula and absorbent paper
48
49 25 points.

50 26 The root canals were filled by the lateral compaction using gutta-percha points and AH Plus
51
52 27 endodontic sealer (Dentsply Tulsa Dental Specialties). The excess filling material was removed
53
54 28 by cutting with a #2 heated plugger (SS White Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The 6
55
56 29 specimens of each group were randomly divided into 2 subgroups (3 roots per subgroup),
57
58 30 according to their storage: 21 days and 12 months of storage, being immersed in DW at 37° C.

1
2
3
4 1 In both time evaluations, each root was sectioned transversely from the root canal entrance
5
6 2 into 1-mm-thick discs in a metallographic cutter with a diamond disk, at a speed of 350 rpm
7
8 3 under cooling. The first disc was discarded and the next five root discs were selected from each
9
10 4 sample, totaling 15 specimens per group ($n=3 \times 5=15$). Each disc was subjected to the push-out
11
12 5 test in a mechanical testing machine (EMIC DL 2000 – São José dos Pinhais, PR, Brazil) at a
13
14 6 speed of 1 mm/min, until displacement of the filling material. Care was taken to ensure that the
15
16 7 contact between the punch tip and the filling material occurred over the most extended area as
17
18 8 possible to avoid a notching effect of the punch tip on the filling material surface. Furthermore,
19
20 9 the punch tip was centralized in the root canal and positioned to contact only the filling material
21
22 10 without stressing the surrounding root canal walls. The force required to displace the material
23
24 11 from the root canal was recorded in newtons (N). To express the bond strength in megapascals,
25
26 12 the load at failure recorded in N was divided by the area (mm^2) of the filling material interface.
27
28 13 To calculate the bonding area, we used the formula $\pi(R + r) [(h)^2 + (R - r)^2]^{0,5}$, where R represents
29
30 14 the coronal root canal radius, r the apical root canal radius, and h the thickness of the slice. The
31
32 15 debonded specimens were measured under 20x magnification with a stereoscope to classify the
33
34 16 failure pattern into three types: 1: adhesive failure (between the dentin and the filling material,
35
36 17 presenting absence of filling material on the root canal walls); 2: cohesive failure (presence of
37
38 18 filling material on the root canal walls); 3: mixed (failures 1 and 2 may be observed) (Figure 1).

39 20 **Statistical analysis**

40
41 21 Bacterial reduction and dentin microhardness values were statically analyzed by one-way
42
43 22 analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey post-hoc test. Bond strength values were
44
45 23 statically analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by the Student-Newman-Keuls post-hoc
46
47 24 test. The failure mode distribution was evaluated by the chi-square test. All tests were set at 5%
48
49 25 level of significance. Data were analyzed using Stat Plus AnalystSoft Inc. version 6.0
50
51 26 (Vancouver, BC, Canada).

52 27 53 28 **Results**

54
55 29 The mean and standard deviation of *E.faecalis* percentage reduction and dentin microhardness
56
57 30 values after intracanal dressing protocols are presented in Table 1. The greatest bacterial

1
2
3
4 1 reduction was observed in Groups 5(Ca[OH]₂+CHX) and 6(GSE+CHX) (p<0.05). There was no
5
6 2 statistically significant difference between all groups in the evaluation of dentin microhardness
7
8 3 (p<0.05).
9

10 4 The median and percentiles of bond strength after intracanal dressing protocols and storage
11 5 periods are presented in Table 2. The highest bond strength in the immediate evaluation was
12 6 observed in Groups 4(GSE+DW) and 6(GSE+CHX), whereas the highest bond strength after 12
13 7 months of storage was observed in Groups 2(CHX), 3(Ca(OH)₂+DW), 4(GSE+DW) and
14 8 6(GSE+CHX) (p<0.05). Regarding the pattern of failure, it was observed a great number of
15 9 adhesive failures in the immediate evaluation and cohesive failures after 12 months of storage,
16 10 regardless the tested intracanal dressing protocols (p<0.05).
17
18
19
20
21
22
23

24 12 Discussion

25
26 13 The use of intracanal dressings results in improved microbiological and structural status of the
27 14 root canal system [13], being necessary adequate tests to evaluate its properties. The counting of
28 15 CFUs provides bacterial quantification from the root canals in an acceptable way, allowing to
29 16 calculate the *E.faecalis* percentage reduction [14]. The Knoop test is more sensitive to surface
30 17 conditions and, because of its longer diagonals, less sensitive to measurement errors when equal
31 18 loads are applied [15]. The push-out test is compatible with the clinical situation, produces
32 19 effective power for material displacement and induces less stress at the bond interface during
33 20 disc preparation [16]. On this way, the present study used these tests, in order to evaluate the use
34 21 of GSE-based intracanal dressings against *E.faecalis* and its influence on dentin microhardness
35 22 and bond strength of filling material.
36
37
38
39
40
41
42
43

44 23 The antimicrobial mechanism of Ca(OH)₂ is known to be dependent on the dissociation and
45 24 diffusion of hydroxyl ions, elevating the pH and the inhibiting enzymatic activities [4]. Previous
46 25 studies reported that 14 to 21 days are necessary to obtain an elevated pH and effective
47 26 antimicrobial activity of Ca(OH)₂ [4]. In addition, due to microbial resistance, some studies
48 27 suggested the addition of CHX to Ca(OH)₂-based intracanal dressings, in order to improve its
49 28 antimicrobial activity [17,18]. For these reasons, 14 days of maintenance in the root canals and
50 29 the addition of CHX to the tested intracanal dressings were adopted in the present study.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 1 The intracanal dressings has an effective action against inflammatory contents of root canals
5
6 2 with primary infections [19] and primary periodontal lesions with secondary endodontic
7
8 3 involvement [20]. The present results showed that the GSE-based intracanal dressings (groups 4
9
10 4 and 6) were as effective as Ca(OH)₂-based intracanal dressings in the *E.faecalis* reduction,
11
12 5 confirming the first hypothesis of present study. These findings are in accordance with previous
13
14 6 studies, where the use of GSE showed effective bacterial reduction from root canals [9,10]. The
15
16 7 GSE is a natural product composed of PACs, which is structurally formed by flavonols. These
17
18 8 polyphenolic components present antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, acting in
19
20 9 structural components of the bacterial cell wall [11]. It can help to explain the satisfactory results
21
22 10 of GSE-based intracanal dressings in the *E.faecalis* reduction, after 14 days into the root canals.

23 11 CHX is a cationic bisguanide that binds to the cell wall of the microorganism and causes the
24
25 12 leakage of intracellular components [21]. The addition of CHX to tested intracanal dressings
26
27 13 revealed higher reduction of *E.faecalis*, being in accordance with previous studies that obtained
28
29 14 similar results by addition of 2% CHX to intracanal dressings [17,18]. The antimicrobial
30
31 15 mechanism occurs by the interaction between CHX molecules (positively charged) and bacterial
32
33 16 cellular wall (negatively charged). Then, CHX induces changes in cellular osmotic equilibrium,
34
35 17 resulting in the precipitation of cytoplasmic content and the death of microorganisms [21].
36
37 18 Therefore, the antimicrobial properties of tested intracanal dressings and CHX may explain the
38
39 19 greater elimination of *E.faecalis* from these groups.

40 20 Dentin discs are usually obtained by transversal cuts from roots of human teeth, in order to
41
42 21 investigate the effects of chemical substances on dentin microhardness, [22]. In these cases, the
43
44 22 dentin surface is covered by the chemical substance and the microhardness is measured after this
45
46 23 protocol. However, the intracanal dressing contact initially the most superficial dentin layer of
47
48 24 the root canal lumen and then diffuses through the dentinal tubules [23]. Thus, the present study
49
50 25 adopted the same methodology of Slutzky-Goldberg et al [23], where the roots are filled with the
51
52 26 chemical substance for a period of time and it is split longitudinally to measure the
53
54 27 microhardness in the pulp-dentin interface. It seems closer to a clinical situation, providing a
55
56 28 better approach regarding the effects of tested intracanal dressings on dentin structure.

57 29 The Ca(OH)₂-based intracanal dressings can lead to physical changes on dentin structure,
58
59 30 since promotes denaturation of the collagen matrix of root dentin. It is caused by the low

1
2
3
4 1 molecular weight and highly alkaline pH of Ca(OH)₂ [24]. In the other hand, the results of
5
6 2 present study revealed that GSE-based intracanal dressings did not influence in the dentin
7
8 3 microhardness values, being similar to control group and Ca(OH)₂ groups, regardless the
9
10 4 addition of CHX. It confirms the second hypothesis of study. The extracts that are rich in PACs
11
12 5 improve dentin mechanical properties due to their highly stable interaction with dentinal
13
14 6 collagen. It occurs by the formation of hydrogen bonds between the protein amide carbonyl and
15
16 7 the phenolic hydroxyl group of the polyphenol associated with covalent and hydrophobic bonds.
17
18 8 The covalent-like bonds resulted from this interaction can help to preserve the dentin structure
19
20 9 [25].

21 10 According to present results in the immediate evaluation, the highest bond strength values
22
23 11 were observed in the groups that were treated with GSE-based intracanal dressings, regardlles
24
25 12 the addition of CHX. After 12 months, the bond strength values were preserved in these groups.
26
27 13 It confirms the third hypothesis of study. Cecchin et al [26] showed that GSE preserves the bond
28
29 14 strength of fiber posts to root dentin for 12 months, improving bond strength stability of dentin–
30
31 15 adhesive interfaces in root canals. The PACs present in its composition preserves the mechanical
32
33 16 properties [9] and stabilises the collagen degradation of the dentin [27]. It contributes to the
34
35 17 maintenance of dentinal substrates for satisfactory bond strength of the resin-based filling
36
37 18 materials and prevents microbial leakage, creating a favourable environment for regeneration in
38
39 19 the periapical region [27].

40 20 After 12 months of storage, the bond strength values decreased in the control group where
41
42 21 intracanal dressing protocol was not performed. In the other hand, the bond strength values
43
44 22 improved in the groups 2 (CHX) and 3 (Ca[OH]₂). The use of CHX does not interfere with
45
46 23 collagen present in the organic matrix of root dentin [28]. At the same way, Ca(OH)₂ residues
47
48 24 have a positive effect on dislodgement resistance of root canal sealers [29]. It can contributes for
49
50 25 improvement of bond strength values in these groups. In addition, the present results showed a
51
52 26 higher number of adhesive failures in the immediate evaluation and cohesive failures after 12
53
54 27 months of storage. The AH Plus epoxy-resin-based endodontic sealer has high flowability and
55
56 28 long polymerization time. Moreover, cohesion between the AH Plus molecules increases the
57
58 29 resistance to displacement of the filling material from the root dentin along the time, providing
59
60 30 greater adhesion [30]. It can help to explain the present results regarding the pattern of failures.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Conclusion

2 Despite the limitations of the present study, it is possible to conclude that the GSE-based
3 intracanal dressings has antimicrobial potential against *E.faecalis*, does not have influence in the
4 dentin microhardness and preserves the high bond strength of filling material to root dentin along
5 the time.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 **Acknowledgments:** We have no financial affiliation (e.g., employment, direct payment, stock
2 holdings, retainers, consultancies, patent licensing arrangements, or honoraria) or involvement
3 with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials
4 discussed in this manuscript, and neither have any such arrangements existed in the past 3 years.

7 **Compliance with Ethical Standards**

9 **Conflict of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

10 **Funding:** The work received no financial support.

11 **Ethical Approval:** All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the
12 care and use of animals were followed. This article does not contain any studies with human
13 participants or animals performed by any of the authors. Extracted human teeth were used in this
14 study. This study was approved by the Ethics Committee of the University of Passo Fundo.

15 **Informed Consent:** Informed consent was not obtained because there were no human
16 participants included in the study.

1
2
3
4 **1** **References**
5
6 **2**
7
8 **3**
9
10 **4**
11 **5**
12 **6**
13 **7**
14
15 **8**
16
17 **9**
18
19 **10**
20 **11**
21 **12**
22 **13**
23 **14**
24 **15**
25 **16**
26 **17**
27 **18**
28 **19**
29 **20**
30 **21**
31 **22**
32 **23**
33 **24**
34 **25**
35 **26**
36 **27**
37 **28**
38 **29**
39 **30**
40 **31**
41 **32**
42 **33**
43 **34**
44 **35**
45 **36**
46 **37**
47 **38**
48 **39**
49 **40**
50 **41**
51 **42**
52 **43**
53 **44**
54 **45**
55 **46**
56 **47**
57 **48**
58 **49**
59 **50**
60 **51**
61 **52**
62 **53**
63 **54**
64 **55**
65

1. Souza MA, Tumelero Dias C, Zandoná J, Paim Hoffmann I, Sanches Menchik VH, Palhano HS, Bertol CD, Rossato-Grando LG, Cecchin D, de Figueiredo JAP. Antimicrobial activity of hypochlorite solutions and reciprocating instrumentation associated with photodynamic therapy on root canals infected with *Enterococcus faecalis* - An in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2018;23:347-352.
2. Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, 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* 2014; 40(5):670-677.
3. Vaudt J, Bitter K, Neumann K, Kielbassa AM. Ex vivo study on root canal instrumentation of two rotary nickel-titanium systems in comparison to stainless steel hand instruments. *Int Endod J* 2009;42:22–33.
4. Leonardo MR, Hernandez ME, Silva LA, 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* 2006;102:680–685.
5. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP, de Uzeda M. Coronal leakage of two root canal sealers containing calcium hydroxide after exposure to human saliva. *J Endod* 1999;25:14–16.
6. Sathorn C, Parashos P, Messer H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J* 2007;40:2–10.
7. Yassen GH, Vail MM, Chu TG, Platt JA. The effect of medicaments used in endodontic regeneration on root fracture and microhardness of radicular dentine. *Int Endod J* 2013;46:688-695.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 8. Guiotti FA, Kuga MC, Duarte MA, Sant'Anna AJ, Faria G. Effect of calcium hydroxide
2 dressing on push-out bond strength of endodontic sealers to root canal dentin. *Braz Oral Res*
3 2014;28:1-6.
4
5 9. Cecchin D, Farina AP, Souza MA, Albarello LL, Schneider AP, Vidal CM, Bedran-Russo
6 AK. Evaluation of antimicrobial effectiveness and dentine mechanical properties after use of
7 chemical and natural auxiliary irrigants. *J Dent* 2015;43:695-702.
8
9 10. Albino Souza M, Dalla Lana D, Gabrielli E, Barbosa Ribeiro M, Miyagaki DC, Cecchin
10 D. Effectiveness of final decontamination protocols against *Enterococcus faecalis* and its
11 influence on bond strength of filling material to root canal dentin. *Photodiagnosis Photodyn*
12 *Ther* 2017;17:92-97.
13
14 11. Furiga A, Roques C, Badet C. Preventive effects of an original combination of grape seed
15 olyphenols with amine fluoride on dental biofilm formation and oxidative damage by oral
16 bacteria. *J Appl Microbiol* 2014;116:761–771.
17
18 12. Vidal CM, Aguiar TR, Phansalkar R, McAlpine JB, Napolitano JG, Chen SN et al.
19 Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. *Acta*
20 *Biomater* 2014;10:3288–3294.
21
22 13. Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B et al. One- versus two-
23 visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J*
24 *Endod* 2012;38:1040-1052.
25
26 14. Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR. The fate and the role of bacteria left in root
27 dentinal tubules. *Int Endod J* 1995; 28:95–99.
28
29 15. Lysaght VE, DeBellis A. Microhardness testing. In: Wilkes B, ed. *Hardness testing*
30 *handbook*. New York: American Chain and Cable Co; 1969:76–105.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

16. Huffman BP, Mai S, Pinna L, Weller RN, Primus CM, Gutmann JL et al. Dislocation resistance of ProRoot Endo Sealer, a calcium-silicate-based root canal sealer, from radicular dentine. *Int Endod J* 2009;42:34–46.

17. Gomes BP, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ. 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* 2006;102:544-550.

18. Signoretti FG, Gomes BP, Montagner F, Barrichello Tosello F, Jacinto RC. Influence of 2% chlorhexidine gel on calcium hydroxide ionic dissociation and its ability of reducing endotoxin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;111:653-658.

19. Martinho FC, Gomes CC, Nascimento GG, Gomes APM, Leite FRM. Clinical comparison of the effectiveness of 7- and 14-day intracanal medications in root canal disinfection and inflammatory cytokines. *Clin Oral Investig* 2018;22:523–530.

20. Duque TM, Prado M, Herrera DR, Gomes BPFA. Periodontal and endodontic infectious/inflammatory profile in primary periodontal lesions with secondary endodontic involvement after a calcium hydroxide-based intracanal medication. *Clin Oral Investig* 2019;23:53-63.

21. Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. 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* 2005;99:768–772.

22. Sayin TC, Serper A, Cehreli ZC, Otlu HG. The effect of EDTA, EGTA, EDTAC and tetracycline-HCl with and without subsequent NaOCl treatment on the microhardness of root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:418–424.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 23. Slutzky-Goldberg I, Maree M, Liberman R, Heling I. Effect of sodium hypochlorite on
2 dentin microhardness. *J Endod* 2004;30:880-882.
3
4 24. Leiendecker AP, Qi YP, Sawyer AN, Niu LN, Agee KA, Loushine RJ et al. Effects of
5 calcium silicate-based materials on collagen matrix integrity of mineralized dentin. *J Endod*
6 2012;38:829–833.
7
8 25. Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, et al.
9 Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater*
10 2014;30:62–76.
11
12 26. Cecchin D, Pin LC, Farina AP, Souza M, Vidal CM, Bello YD et al. Bond Strength
13 between Fiber Posts and Root Dentin Treated with Natural Cross-linkers. *J Endod*
14 2015;41:1667-1671.
15
16 27. Aguiar TR, Vidal CM, Phansalkar RS, Todorova I, Napolitano JG, McAlpine JB et al
17 Dentin biomodification potential depends on polyphenol source. *J Dental Res* 2014;93:417–
18 422.
19
20 28. Moreira DM, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Line SR, Zaia AA. Structural analysis
21 of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. *J*
22 *Endod* 2009;35:1023–1027.
23
24 29. Amin SA, Seyam RS, El-Samman MA. The effect of prior calcium hydroxide intracanal
25 placement on the bond strength of two calcium silicate-based and an epoxy resin based
26 endodontic sealer. *J Endod* 2012;38:696–699.
27
28 30. Silva EJ, Carvalho NK, Prado MC, Zanon M, Senna PM, Souza EM, De-Deus G. Push-
29 out bond strength of injectable pozzolan-based root canal sealer. *J Endod.* 2016;42:1656-
30 1659.

Table 1: Mean \pm standard deviation of *E.faecalis* percentage reduction (%) and dentin microhardness values (Knoop microhardness number) of tested intracanal dressing protocols.

Groups	Bacterial reduction (%)	Dentin microhardness (KMN)
1. DW	29.32 \pm 1.76 ^a	25.83 \pm 4.84 ^a
2. CHX	89.78 \pm 1.99 ^b	32.48 \pm 5.41 ^a
3. Ca(OH) ₂ + DW	91.29 \pm 1.43 ^b	28.11 \pm 5.74 ^a
4. GSE + DW	92.96 \pm 2.07 ^b	22.85 \pm 4.82 ^a
5. Ca(OH) ₂ + CHX	98.25 \pm 1.28 ^c	27.77 \pm 7.02 ^a
6. GSE + CHX	99.15 \pm 1.14 ^c	21.94 \pm 5.31 ^a

* Data are presented as mean \pm standard deviation. Different index letters represent statistically significant differences in the post hoc procedure (Tukey test).

** DW = distilled water; CHX = 2% chlorhexidine gel; Ca(OH)₂ = calcium hydroxide; GSE = grape seed extract; KMN = Knoop microhardness number.

Table 2: Median and percentiles (25th – 75th value) of bond strength of filling material to root dentin after intracanal dressing protocols and storage periods.

Groups	Bond strength (MPa)	
	Immediate	After 12 months
1. DW	0.74 / 0,34 ^{A,a}	0,21 / 0,14 ^{A,b}
2. CHX	0.51 / 1,02 ^{A,a}	2,94 / 2,05 ^{B,b}
3. Ca(OH) ₂ + DW	1.19 / 1,41 ^{A,a}	2,60 / 2,17 ^{B,b}
4. GSE + DW	2.59 / 2,59 ^{B,a}	3,00 / 1,05 ^{B,a}
5. Ca(OH) ₂ + CHX	0.69 / 0,61 ^{A,a}	0,62 / 0,72 ^{C,a}
6. GSE + CHX	2.98 / 2,90 ^{B,a}	2,80 / 1,85 ^{B,a}

* Data are presented as mean and percentiles. Different superscript index letters represent statistically significant differences in the column; different lower script index letters represent statistically significant differences in the row (p<0.05).

** DW = distilled water; CHX = 2% chlorhexidine gel; Ca(OH)₂ = calcium hydroxide; GSE = grape seed extract; MPa = megapascals.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 **Figure 1:** Optical microscopy images illustrating the patterns of failure after push out test –
2 A: adhesive failure; B: cohesive failure; C: mixed failure.

3

Table 1: Mean \pm standard deviation of *E.faecalis* percentage reduction (%) and dentin microhardness values (Knoop microhardness number) of tested intracanal dressing protocols.

Groups	Bacterial reduction (%)	Dentin microhardness (KMN)
1. DW	29.32 \pm 1.76 ^a	25.83 \pm 4.84 ^a
2. CHX	89.78 \pm 1.99 ^b	32.48 \pm 5.41 ^a
3. Ca(OH) ₂ + DW	91.29 \pm 1.43 ^b	28.11 \pm 5.74 ^a
4. GSE + DW	92.96 \pm 2.07 ^b	22.85 \pm 4.82 ^a
5. Ca(OH) ₂ + CHX	98.25 \pm 1.28 ^c	27.77 \pm 7.02 ^a
6. GSE + CHX	99.15 \pm 1.14 ^c	21.94 \pm 5.31 ^a

* Data are presented as mean \pm standard deviation. Different index letters represent statistically significant differences in the post hoc procedure (Tukey test).

** DW = distilled water; CHX = 2% chlorhexidine gel; Ca(OH)₂ = calcium hydroxide; GSE = grape seed extract; KMN = Knoop microhardness number.

Table 2: Median and percentiles (25th – 75th value) of bond strength of filling material to root dentin after intracanal dressing protocols and storage periods.

Groups	Bond strength (MPa)	
	Immediate	After 12 months
1. DW	0.74 / 0,34 ^{A,a}	0,21 / 0,14 ^{A,b}
2. CHX	0.51 / 1,02 ^{A,a}	2,94 / 2,05 ^{B,b}
3. Ca(OH) ₂ + DW	1.19 / 1,41 ^{A,a}	2,60 / 2,17 ^{B,b}
4. GSE + DW	2.59 / 2,59 ^{B,a}	3,00 / 1,05 ^{B,a}
5. Ca(OH) ₂ + CHX	0.69 / 0,61 ^{A,a}	0,62 / 0,72 ^{C,a}
6. GSE + CHX	2.98 / 2,90 ^{B,a}	2,80 / 1,85 ^{B,a}

* Data are presented as mean and percentiles. Different superscript index letters represent statistically significant differences in the column; different lower script index letters represent statistically significant differences in the row (p<0.05).

** DW = distilled water; CHX = 2% chlorhexidine gel; Ca(OH)₂ = calcium hydroxide; GSE = grape seed extract; MPa = megapascals.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Editor-in-Chief

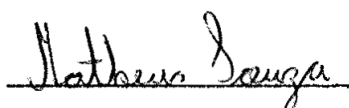
Journal of Endodontics

We would like to submit the manuscript entitled “**Effectiveness of grape seed extract-based intracanal dressings against *Enterococcus faecalis* and its influence on dentin microhardness and bond strength of filling material**” for review by the Editorial Board of the “**Journal of Endodontics**”. Authors assure that the manuscript is not under consideration elsewhere. All authors have read and approved this manuscript.

COPYRIGHT RELEASE STATEMENT

We are transfer all copyright ownership of the manuscript entitled “**Effectiveness of grape seed extract-based intracanal dressings against *Enterococcus faecalis* and its influence on dentin microhardness and bond strength of filling material**” to the “**Journal of Endodontics**” in the event the work is published. We warrant that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, has not been previously published, and includes any product that may derive from the published journal, whether print or electronic media. We sign for and accept responsibility for releasing this material."

Sincerely



Matheus Albino Souza – Corresponding author

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MEDICAÇÕES INTRACANAL CONTRA ENTEROCOCCUS FAECALIS E SUA INFLUÊNCIA NA RESISTÊNCIA DE UNIÃO DO MATERIAL OBTURADOR E MICRODUREZA DA DENTINA

Pesquisador: DANIEL DE LIMA DALLA LANA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 66611616.3.0000.5342

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.033.198

Apresentação do Projeto:

O preparo endodôntico do sistema de canais radiculares objetiva a descontaminação dos condutos, e por meio da obturação e blindagem prevenir a recontaminação deste sistema, devolvendo a função ao elemento dentário. Protocolos atuais preconizam o tratamento endodôntico em sessão única, porém um requisito básico é conseguir um canal “seco”, evitando a recontaminação promovida pela infiltração do material obturador pelo excesso de umidade, o que levaria ao insucesso da terapia endodôntica. Nos casos, cuja condição pós instrumentação dos canais não é a ideal para obturação, é necessário lançar mão do uso de medicações intracanal, que irão garantir o estado de desinfecção entre as sessões. Tais medicações devem ter propriedades bactericidas e não interferir, tanto nas propriedades mecânicas do tecido dentinário como na resistência de união do material obturador á dentina radicular.

Objetivo da Pesquisa:

- Avaliar, in vitro, a efetividade antimicrobiana das medicações intracanal contra o biofilme de Enterococcus faecalis.
- Avaliar, in vitro, a influência das medicações intracanal na microdureza do tecido dentinário e resistência de união do material obturador a dentina radicular

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo

Bairro: Divisão de Pesquisa / São José

CEP: 99.052-900

UF: RS

Município: PASSO FUNDO

Telefone: (54)3316-8157

E-mail: cep@upf.br

Continuação do Parecer: 2.033.198

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos não se aplicam nesta pesquisa, uma vez que serão empregados dentes do banco de dentes da UPF. A partir dos resultados obtidos, será possível aplicar clinicamente as metodologias estudadas nos procedimentos de tratamento endodôntico realizados em consultório particular ou clínicas da FOUPF

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão utilizados 150 dentes unirradiculares humanos extraídos, com 15mm de comprimento, preparados pelo sistema ProTaper Next e esterilizados. Os grupos de tratamento serão: água destilada esterilizada, clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio, extrato de semente de uva, hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2% e extrato de semente de uva + clorexidina gel 2%. O estudo será dividido em 3 etapas: microbiológica, resistência de união e microdureza. A etapa microbiológica utilizará 60 raízes contaminadas durante 15 dias com *Enterococcus faecalis*, seguidas da exposição às medicações. Um percentual de redução microbiana será calculado com base nas contagens de unidades formadoras de colônias pré e pós tratamentos. Os testes de resistência de união serão realizados em dois momentos, 21 dias e 12 meses após a obturação, utilizando 30 raízes para cada período. Cinco amostras de cada grupo serão seccionadas em discos de dentina com 1mm de espessura e submetidas ao push out. O teste de microdureza utilizará 30 raízes clivadas após os tratamentos. A média das 3 indentações em cada amostra resultará no valor de microdureza utilizado para comparação. O tempo de contato com as medicações será de 15 dias nas três etapas e os dados obtidos serão tabulados e analisados estatisticamente com nível de significância de 5%.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os direitos fundamentais dos participantes foram garantidos no projeto e no TCLE. O protocolo foi instruído e apresentado de maneira completa porém em alguns momentos encontra-se confusa. Os compromissos do pesquisador e das instituições

estavam presentes. O projeto foi considerado claro em seus aspectos científicos e éticos, porém a metodologia deve ser melhor explicada ou redigida.

Recomendações:

Ajustar o cronograma do projeto de pesquisa, item "Execução da metodologia", para um período posterior a avaliação do CEP.

Após o término da pesquisa, o CEP UPF solicita:

a) A devolução dos resultados do estudo aos sujeitos da pesquisa ou a instituição que forneceu os dados;

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo

Bairro: Divisão de Pesquisa / São José

CEP: 99.052-900

UF: RS

Município: PASSO FUNDO

Telefone: (54)3316-8157

E-mail: cep@upf.br

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-



Continuação do Parecer: 2.033.198

b) Enviar o relatório final da pesquisa, pela plataforma, utilizando a opção, no final da página, "Enviar Notificação" + relatório final

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, este Comitê, de acordo com as atribuições definidas na Resolução n. 466/12, do Conselho Nacional da Saúde, Ministério da Saúde, Brasil, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_776004.pdf	28/03/2017 17:16:56		Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao.pdf	28/03/2017 17:15:43	DANIEL DE LIMA DALLA LANA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	temodados.pdf	28/03/2017 17:15:12	DANIEL DE LIMA DALLA LANA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	bancodedentes.pdf	28/03/2017 17:08:23	DANIEL DE LIMA DALLA LANA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetotesedaniel.pdf	29/08/2016 11:35:36	DANIEL DE LIMA DALLA LANA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	24/08/2016 17:33:26	DANIEL DE LIMA DALLA LANA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo

Bairro: Divisão de Pesquisa / São José

CEP: 99.052-900

UF: RS

Município: PASSO FUNDO

Telefone: (54)3316-8157

E-mail: cep@upf.br

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-



Continuação do Parecer: 2.033.198

PASSO FUNDO, 26 de Abril de 2017

Assinado por:
Felipe Cittolin Abal
(Coordenador)

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo

Bairro: Divisão de Pesquisa / São José

CEP: 99.052-900

UF: RS

Município: PASSO FUNDO

Telefone: (54)3316-8157

E-mail: cep@upf.br