

DAIANA ELISABETH BÖTTCHER

**Avaliação do efeito da presença do biofilme de *Enterococcus faecalis* no canal radicular sobre a manutenção da substantividade da clorexidina a 2%: estudo *in vitro*.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de concentração Clínica Odontológica/Endodontia

Linha de Pesquisa: Biomateriais e técnicas terapêuticas em odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Soares Grecca

**PORTO ALEGRE**

**2014**

### CIP - Catalogação na Publicação

Böttcher, Daiana Elisabeth

Avaliação do efeito da presença do biofilme de *Enterococcus faecalis* no canal radicular sobre a manutenção da substantividade da clorexidina a 2%: estudo in vitro. / Daiana Elisabeth Böttcher. -- 2014. 82 f.

Orientadora: Fabiana Soares Grecca.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Clorexidina. 2. *Enterococcus faecalis*. 3. Substantividade. I. Grecca, Fabiana Soares, orient. II. Título.

DAIANA ELISABETH BÖTTCHER

**Avaliação do efeito da presença do biofilme de *Enterococcus faecalis* no canal radicular sobre a manutenção da substantividade da clorexidina a 2%: estudo *in vitro*.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de concentração Clínica Odontológica/Endodontia

Banca examinadora:

Profa. Dra. Fabiana Soares Grecca (orientadora)

Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

Profa. Dra. Renata Dornelles Morgental

Prof. Dr. Régis Burmeister dos Santos

Prof. Dra. Patrícia Maria Poli Kopper (suplente)

**PORTO ALEGRE**

**2014**

Dedico esse trabalho...

... aos meus pais, Darcy Célio Böttcher e Noeli Elisabetha Böttcher.

## **Agradeço...**

À Deus, pelos ensinamentos de fé, gratidão e humildade:

*Combati o bom combate, terminei a corrida, guardei a fé (2 Timóteo 4:7)*

Aos meus pais, Darcy e Noeli, por tudo o que representam para mim:

Minha razão de viver, amor maior e eterno.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fabiana Soares Grecca, pela confiança, apoio constante e, acima de tudo, pela amizade construída ao longo destes sete anos. És, por escolha, a “irmã mais velha” que não tive a oportunidade de ter. Não há palavras para descrever a minha gratidão.

À minha eterna orientadora Profa. Dra. Anna Christina Medeiros Fossatti, pelo apoio e exemplo de vida.

À minha amiga e parceira de vida acadêmica Profa. Dra. Roberta Kochenborger Scarparo, pelo exemplo de dedicação e perseverança.

À equipe de professores de Endodontia da Faculdade de Odontologia da UFRGS: Prof. Dr. Régis Burmeister dos Santos, Prof. Dr. João Ferlini Filho, Prof. Dr. Marcus Vinícius Reis Só, Profa. Dra. Patrícia Maria Poli Kopper Móra, Prof. Dr. Francisco Montagner, Profa. Dra. Simone Bonato Luisi e Profa. Dra. Renata Grazziotin Soares, pelos ensinamentos e convivência.

À secretária da Endodontia da Faculdade de Odontologia da UFRGS Andréa Maria Freire Dill, pela disponibilidade, competência e amistosa convivência.

Aos colegas de Pós-Graduação da área de Endodontia da UFRGS, pela convivência, apoio mútuo e amizade construída.

Aos amigos que a Pós-Graduação me presenteou: Bruna Frizzon Greggianin, Cristiane Meira Assunção, Daiane Cerutti Kopplin, Deisi Fátima Damin e Renan Langie. Não haverá distância que separe os nossos corações.

Aos professores, Dr. Francisco Montagner, Dra. Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo e à técnica de laboratório Luiza Mercado pelos ensinamentos e auxílio na área de microbiologia.

Aos professores, Dr. Marco Antônio Zachia Ayub e Dra. Nicole Sehnem por possibilitarem a realização das análises de HPLC nas dependências dos laboratórios do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS por disponibilizar suas dependências para a execução da análise por microscopia confocal a laser.

Aos órgãos de fomento: Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior ) e PROPESq (Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

À Faculdade de Odontologia da UFRGS, onde realizei o sonho de me tornar Cirurgiã-Dentista. A Odontologia é a profissão que escolhi exercer, motivo do meu orgulho e na qual me sinto plenamente realizada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFRGS, por viabilizar a minha formação *Stricto Sensu*, que me habilita para o magistério, minha vocação.

Aos professores Dr. José Antônio Poli de Figueiredo, Dra. Renata Dornelles Morgental, Dra. Patrícia Maria Poli Kopper Móra e Dr. Régis Burmeister dos Santos por aceitarem o convite de participar desse momento de reflexão científica.

A todos os demais que contribuíram para a realização desse trabalho.

“O que você faz com amor e cuidado tem uma chance de fazer diferença, tanto para você como para a vida de outras pessoas. Tudo o que se faz sem amor e sem convicção é fadado ao fracasso e à perda de tempo, para você e para os outros”

Wim Wenders

## RESUMO

**Introdução:** O objetivo do presente estudo foi correlacionar o efeito antimicrobiano residual e a substantividade da solução de clorexidina a 2%, em dentina humana de dentes extraídos e contaminada com *E. faecalis*, por 48 horas, 7 e 30 dias. **Metodologia:** Cento e vinte e três dentes humanos extraídos foram utilizados para esse estudo. As amostras foram divididas em quatro grupos conforme a solução irrigadora utilizada (CHX 2% ou soro fisiológico) e na presença ou ausência do biofilme de *Enterococcus faecalis*. As amostras foram mantidas em contato com a respectiva solução durante 5 minutos. Cada grupo foi distribuído aleatoriamente em 3 subgrupos de acordo com o período de avaliação (n=10). A quantidade de CHX presente foi avaliada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a viabilidade bacteriana foi analisada através de microscópio confocal a laser (CLSM). A análise estatística foi feita através dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney U ( $P < .05$ ) e teste de correlação de Spearman ( $P < .01$ ). **Resultados:** Houve uma correlação negativa entre o percentual de células viáveis e a quantidade de CHX remanescente ( $P = .000$ ). A CHX reduziu significativamente o percentual de células viáveis em relação ao soro após 48 horas ( $P = .007$ ). A diferença foi mantida no período de 7 dias ( $P = .001$ ). Após 30 dias, o grupo CHX apresentou um aumento da viabilidade bacteriana tornando-se semelhante ao soro ( $P = .623$ ). Simultaneamente, a quantidade de CHX reduziu significativamente após 30 dias ( $P = .000$ ). **Conclusão:** Os resultados do presente estudo indicam que a CHX a 2% foi detectada nos períodos de 48 horas e 7 dias, mantendo reduzido o percentual de células viáveis. A presença de microrganismos na dentina humana não alterou a quantidade de CHX residual.

Palavras – Chave: Clorexidina, *Enterococcus faecalis*, substantividade



## ABSTRACT

**Introduction:** The aim of this study was to correlate the bacterial viability and the presence of 2% chlorhexidine (CHX) on dentin by means of confocal laser scanning microscope (CLSM) and high-performance liquid chromatography (HPLC) for 48 hours, 7 and 30 days. **Methods:** One hundred twenty three extracted human teeth were used. Samples were divided into 4 groups according to the solution (CHX or saline) and the presence of *Enterococcus faecalis* biofilm. Samples were kept in contact with 5mL of the solution for 5 minutes. Each group was divided into 3 subgroups according to the evaluation period (n = 10). Statistical analysis was performed by using the Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U tests ( $P < .05$ ) and Spearman's Rank Correlation Coefficient ( $P < .01$ ). **Results:** There was a negative correlation between the percentage of live cells and the amount of remaining CHX ( $P = .000$ ). CHX significantly reduced the percentage of viable cells compared to saline after 48 hours ( $P = .007$ ). Differences were maintained in the 7-day evaluation ( $P = .001$ ). After 30 days, CHX group presented an increase of viable cells, thereby becoming similar to saline ( $P = .623$ ). Simultaneously, remaining CHX significantly reduced in the 30-day specimens ( $P = .000$ ). **Conclusion:** The results of this study indicate that 2% CHX solution was detected for 48 hours and 7 days, keeping a low percentage of viable cells. The presence of microorganisms on human dentin did not affect 2% chlorhexidine maintenance.

Keywords: Chlorhexidine, *Enterococcus faecalis*, substantivity

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO AO TEMA.....	11
1.1	INTRODUÇÃO.....	11
1.2	REVISÃO DA LITERATURA.....	12
1.2.1	INFECÇÃO ENDODÔNTICA.....	12
1.2.2	<i>Enterococcus faecalis</i> .....	14
1.2.3	SOLUÇÕES IRRIGADORAS.....	17
	CLOREXIDINA.....	18
	EFEITO ANTIMICROBIANO RESIDUAL DA CLOREXIDINA.....	22
2	OBJETIVOS.....	26
2.1	OBJETIVO GERAL.....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3	ARTIGO CIENTÍFICO.....	27
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
5	CONCLUSÕES.....	51
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
7	APÊNDICE.....	70
	ANEXOS.....	72

## 1. INTRODUÇÃO AO TEMA

### 1.1. INTRODUÇÃO

A infecção endodôntica é caracterizada pela presença de microrganismos no sistema de canais radiculares e é a principal causa da instalação e progressão da periodontite apical (Takehashi, Stanley e Fitzgerald, 1965; Möller *et al.*, 1981; Siqueira *et al.*, 2001). Apesar de serem encontrados fungos, archaea e vírus na microbiota endodôntica, as bactérias são os microrganismos mais comuns nesse tipo de infecção (Siqueira *et al.*, 2001). Além disso, a relação entre as espécies e o suprimento nutricional são fatores imprescindíveis para a manutenção da infecção endodôntica.

O canal radicular representa um ambiente especial, no qual, as condições diferenciadas de aerobiose e anaerobiose permitem o estabelecimento de uma microbiota restrita. Alterações na população microbiana ocorrem ao longo do tempo, caracterizando o “shift microbiano” descrito por Sundqvist (1992). Em estágios mais avançados, as espécies anaeróbias restritas tornam-se predominantes (Sundqvist, 1992).

No momento do acesso à câmara pulpar, a anaerobiose é rompida. Por isso, o tratamento endodôntico é capaz de romper esta delicada ecologia além de privar os microrganismos de sua fonte nutricional (Sundqvist, 1992). Além disso, o preparo químico-mecânico (PQM) elimina os microrganismos e restringe os nutrientes, interferindo na interação microbiana. Porém, mesmo após a obturação do canal radicular, a penetração de fluidos oriundos do periápice e dos túbulos dentinários proporciona ambiente favorável para a recontaminação quando da falha do selamento (Sundqvist *et al.*, 1998; Figdor, Davies e Sundqvist, 2003; Love, 2002).

Infecções persistentes são causadas por microrganismos que, de alguma forma, resistiram aos procedimentos de limpeza e desinfecção do canal radicular (Siqueira, 2002). Elas são responsáveis por variadas alterações clínicas e radiográficas, incluindo a manutenção ou o surgimento de alteração periapical, caracterizando o insucesso do tratamento endodôntico (Siqueira *et al.*, 2001). Por isso, tem sido dada especial atenção ao estudo dos microrganismos causadores das infecções persistentes (Siqueira *et al.*, 2001). O microrganismo *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) está

frequentemente associado aos casos de insucesso endodôntico (Rôças, Siqueira e Santos, 2004; Sedgley, Buck e Appelbe, 2006; Stuart et al. 2006). Este microrganismo tem se mostrado resistente aos protocolos de desinfecção utilizados durante o retratamento (Gomes, Lilley e Drucker, 1996; Peciulienė *et al.*, 2001; Möller *et al.*, 2004; Chávez De Paz *et al.*, 2003).

A desinfecção do sistema de canais radiculares pode ser alcançada a partir do uso de diferentes agentes antimicrobianos. O tempo de ação destes agentes varia conforme a sua indicação. Irrigantes atuam por um curto período de tempo, seu uso é restrito ao tempo do preparo do canal radicular, enquanto que os utilizados como medicação intracanal permanecem por períodos mais longos. Se os irrigantes e/ou a medicação intracanal possuírem ação antimicrobiana residual, poderá haver a prevenção da recontaminação do sistema de canais radiculares. No entanto, a ação residual destes agentes depende deles possuírem a propriedade de substantividade (Mohammadi e Abbott, 2009a). Tem sido demonstrado que a clorexidina (CHX) apresenta essa característica (White, Hays e Janer, 1997; Leonardo *et al.*, 1999; Rosenthal, Spångberg e Safavi, 2004; Dametto *et al.*, 2005; Khademi, Mohammadi e Havaee, 2006; Souza *et al.*, 2012). Porém, existem poucos trabalhos neste sentido, especialmente avaliando a manutenção da substantividade a longo prazo (Rosenthal, Spångberg e Safavi, 2004; Souza *et al.*, 2012, Ferrer-Luque *et al.* 2014). Além disso, ainda não há evidência de que a presença de microrganismos durante o preparo do canal radicular possa influenciar na manutenção desta propriedade.

## 1.2. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.2.1. Infecção endodôntica

Há consenso de que a principal causa da necrose pulpar e a subsequente ocorrência de alteração periapical é a cárie dentária. A progressão da lesão de cárie na dentina leva a micro-abscessos no tecido pulpar e a ação de enzimas proteolíticas causa a destruição da polpa (Zehnder, 2006). As bactérias e seus sub produtos propagam por todo o sistema de canais radiculares alcançando a região periapical, causando a periodontite apical (Ramachandran Nair, 1987; Baumgartner e Falkler, 1991; Sjögren *et al.*, 1991).

Apesar de haver mais de 700 diferentes espécies de microrganismos na cavidade bucal (Aas *et al.*, 2005; Siqueira e Rôças, 2009), apenas um grupo restrito de espécies tem sido identificado nos casos de necrose pulpar (Kantz e Henry, 1974; Wittgow e Sabiston, 1975; Sundqvist, 1994; Siqueira e Rôças, 2009). A infecção endodôntica primária é caracterizada pela presença, no canal, de 10 a 30 diferentes espécies bacterianas, em sua maioria, anaeróbias (Munson *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2004; Siqueira e Rôças, 2004b; 2005).

No entanto, o perfil bacteriano da microbiota endodôntica, conforme a diversidade e a abundância, varia de indivíduo para indivíduo (Siqueira e Rôças, 2004b; Sakamoto *et al.*, 2006). Fatores microbiológicos e de disponibilidade de nutrientes definem a composição dessa microbiota. Assim, é possível afirmar que a infecção primária tem etiologia heterogênea e uma única espécie não pode ser considerada o agente causador exclusivo (Siqueira *et al.*, 2001).

Diversos grupos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas têm sido identificadas nas infecções primárias: do gênero *Prevotella*, os microrganismos mais frequentemente encontrados nas infecções primárias são: *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. tanneriae*, *P. baroniae* e *P. denticola*. Já do gênero *Porphyromonas*, as *P. endodontalis* e *P. gingivalis* têm sido as espécies encontradas em maior quantidade e estão relacionadas, principalmente, com os quadros de abscesso agudo (Van Winkelhoff, Carlee e De Graaff, 1985; Haapasalo *et al.*, 1986; Sundqvist, Johansson e Sjögren, 1989; Siqueira *et al.*, 2001; Seol *et al.*, 2006). Os microrganismos Gram-negativos, encontrados em grande quantidade nas infecções endodônticas, merecem especial atenção por apresentarem fatores de virulência diferenciados. A sua presença é responsável pelos produtos e subprodutos tóxicos, como a endotoxina LPS, à região periapical como a endotoxina LPS (Gomes, Lilley e Drucker, 1996b; a; Safavi e Nichols, 1993; Gomes *et al.*, 2004).

Enquanto isso, a infecção secundária é causada por microrganismos que não estavam presentes na infecção primária, mas que foram introduzidos no canal radicular em algum momento após a intervenção profissional. De acordo com Gomes *et al.* (2004), a microbiota dos dentes com infecções

primárias difere daquela das infecções secundárias; além da predominância de Gram-positivos nas infecções secundárias, também é observada uma menor diversidade bacteriana em relação às infecções primárias.

As bactérias Gram-negativas, membros comuns da infecção primária, são normalmente eliminadas durante o preparo químico-mecânico do canal radicular. Todavia, há a possibilidade de alguns microrganismos sobreviverem por incapacidade do preparo químico-mecânico de eliminá-los e pela manutenção de nutrientes. Essa condição permite que tais microrganismos se multipliquem e restabeleçam a contaminação do sistema de canais radiculares constituindo a, assim denominada, infecção persistente (Gomes, Lilley e Drucker, 1996; Bystrom, Claesson e Sundqvist, 1985).

Entre os Gram-positivos resistentes, relacionados às infecções persistentes, estão: os *Streptococcus* (*S. mitis*, *S. gordonii*, *S. anginosus*, *S. sanguinis* e *S. oralis*), *P. micra*, as espécies de *Actinomyces* (*A. israelii* e *A. odontolyticus*), as espécies *Propionibacterium* (*P. acnes* e *P. propionicum*), *P. alactolyticus*, os *Lactobacillus* (*L. paracasei* e *L. acidophilus*), *E. faecalis* e *O. uli* (Siqueira *et al.*, 2001).

Estudos têm demonstrado que o *E. faecalis* é a espécie mais frequentemente encontrada nos canais tratados que apresentaram insucesso (Sundqvist *et al.*, 1998; Pinheiro *et al.*, 2003; Rôças, Jung *et al.*, 2004; Rôças, Siqueira e Santos, 2004; Siqueira e Rôças, 2004a; Sedgley *et al.*, 2006; Seol *et al.*, 2006; Zoletti, Siqueira e Santos, 2006). Dentes com o canal tratado são cerca de 9 vezes mais suscetíveis de abrigar o *E. faecalis* em relação aos casos de infecção primária (Rôças, Siqueira e Santos, 2004).

Em um estudo recente (Murad *et al.*, 2014), foi investigada a composição da microbiota de 36 canais radiculares com lesão periapical persistente através de “Checkerboard DNA-DNA Hybridization”. Os autores demonstraram que se trata de uma microbiota mista e de perfil complexo, com predominância de *E. faecium* e *S. epidermidis*. *Enterococcus faecalis* foi identificado em 28% das amostras. Já Stuart *et al.* (2006) relatam que ele está em 24 a 77% dos casos. Apesar de alguns autores questionarem o papel desse microrganismo na persistência de lesões periapicais (Rôças e Siqueira, 2012; Wang *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2013), Murad *et al.* (2014) atesta que, mesmo em pequena quantidade, esse microrganismo merece

atenção frente à sua capacidade de resitência aos agentes antimicrobianos e capacidade de sobrevivência em ambientes hostis. Essa característica também facilita sua aplicação em estudos laboratoriais.

### 1.2.2. *Enterococcus faecalis*

*E. faecalis* representa uma pequena parcela da flora do canal radicular nas infecções primárias mas, conforme descrito anteriormente, é um microrganismo frequentemente associado às infecções secundárias e aos insucessos de tratamento endodôntico, independente dos métodos de detecção bacteriana aplicados (Sedgley, Buck e Appelbe, 2006; Rôças, Siqueira e Santos, 2004; Williams *et al.*, 2006). Além disso, estudos têm demonstrado que, raramente, esse microrganismo é predominante nos casos em que está indicado o retratamento endodôntico (Rôças, Siqueira *et al.*, 2004; Rôças, Siqueira e Santos, 2004; Siqueira e Rôças, 2004a; Stuart *et al.*, 2006; Sakamoto *et al.*, 2008).

Porém, quando presente, este microrganismo tem se mostrado resistente aos protocolos de desinfecção aplicados durante a endodontia (Gomes, Lilley e Drucker, 1996; Peciulienė *et al.*, 2001; Möller *et al.*, 2004; Chávez De Paz *et al.*, 2003; Berber *et al.*, 2006; Sirtes *et al.*, 2005; Mercade *et al.*, 2009; Shahriari *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2007; Komorowski *et al.*, 2000; Seet *et al.*, 2012) e, por isso, é alvo frequente de estudos. Diferente de outras espécies, *E. faecalis* pode sobreviver isoladamente além de se apresentar tolerante às alterações no ambiente do canal radicular. Ele é capaz de sobreviver em ambientes alcalinos, de restrição nutricional além de ser capaz de penetrar nos túbulos dentinários (Rincé *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2006; Bailón-Sánchez *et al.*, 2014). Estudos relatam que o *E. faecalis* é capaz de sobreviver dentro dos túbulos por até 10 dias sem suprimento nutricional (Bystrom, Claesson e Sundqvist, 1985; Siqueira, 2001). Além disso, esse microrganismo é capaz de sobreviver na presença de smear layer e de debris (Estrela *et al.*, 2007).

Esta bactéria tem sido encontrada tanto nos casos de insucesso de dentes onde a técnica endodôntica foi conduzida de forma satisfatória (Sundqvist *et al.*, 1998) como naqueles casos em que se observam falhas na obturação (Peciulienė *et al.*, 2001). Teoricamente, há duas explicações para

esta observação: *E. faecalis* está presente no canal radicular desde a infecção primária e consegue sobreviver ao tratamento; ou são bactérias oportunistas que invadem o espaço do canal radicular quando há falhas no selamento coronário durante ou após a conclusão da endodontia. No entanto, a partir da literatura corrente, eles não parecem ser colonizadores durante o estabelecimento da necrose pulpar (Zehnder e Guggenheim, 2009). A via de contaminação por este microrganismo, na cavidade oral, parece ser através da ingestão de alimentos que o contenham na sua composição (Zehnder e Guggenheim, 2009; Vidana *et al.*, 2011; Penas *et al.*, 2013).

A habilidade de formar biofilmes é fator significativo para a persistência desse microrganismo durante o tratamento de canal (Jenkinson e Lappin-Scott, 2001). Os biofilmes são formados a partir de agregados bacterianos protegidas por uma matriz extracelular polimérica (Hall-Stoodley, Costerton e Stoodley, 2004). Além disso, tem sido notado o desenvolvimento de cepas de *E. faecalis* resistentes a diferentes agentes antimicrobianos (Huycke, Sahm e Gilmore, 1998).

Os estudos que avaliam mRNA através de RT-PCR demonstram que o *E. faecalis* permanece viável e patogênico, mesmo quando abaixo do nível de detecção por cultivo (Lleò *et al.*, 2001). Este período de inatividade é variável e a eventual reativação tem particular relevância para a endodontia. No estudo de Figdor, Davies e Sundqvist (2003), o *E. faecalis* apresentou um rápido declínio na contagem celular, após um período de restrição de nutrientes, no entanto, uma pequena porção foi capaz de sobreviver à restrição de água e nutrientes durante vários meses. Williams *et al.* (2006) sugerem que a combinação de *E. faecalis* viáveis e a manutenção da fonte nutricional, através do fluido proveniente dos túbulos dentinários e dos tecidos periapicais (Sundqvist *et al.*, 1998; Figdor, Davies e Sundqvist, 2003), seriam os responsáveis pela perpetuação do ciclo de colonização desta bactéria.

Além disso, o *E. faecalis* possui alguns fatores de virulência como a serina protease, a gelatinase (gelE) além de proteínas que se ligam ao colágeno, o que facilita a sua adesão à dentina (Lleò *et al.*, 2001). No estudo de Wang *et al.* (2011), foi constatado o aumento da expressão de gelE nos *E. faecalis* coletados de dentes que apresentavam evidência radiográfica de



lesão periapical. A gelE é uma zinco-metaloprotease secretada por *E. faecalis* responsável pela correção de proteínas na superfície celular bacteriana (Waters *et al.*, 2003). Além disso, esta enzima pode estar relacionada à característica da formação de biofilme pelo *E. faecalis* (Ciardi *et al.*, 1977; Waar *et al.*, 2002; Kristich *et al.*, 2004; Mohamed *et al.*, 2004). A capacidade do *E. faecalis* de aderir à parede dentinária, acumular e formar uma comunidade organizada na forma de biofilme, provavelmente, é o que faz com que essa bactéria se torne tão resistente às alterações do meio (Wang *et al.*, 2011).

### 1.2.3. Soluções irrigadoras

Para promover a limpeza e desinfecção do canal radicular é realizado o preparo químico-mecânico (Bystrom, Claesson e Sundqvist, 1985). Durante esse preparo, são utilizadas substâncias químicas de ação local a fim de romper o equilíbrio do ecossistema microbiano (Vianna *et al.*, 2006). Também podem ser utilizados medicamentos intracanal nos intervalos entre as sessões do tratamento endodôntico (Chong e Pitt Ford, 1992).

As substâncias químicas auxiliares são fundamentais, pois, é sabido que a ação mecânica dos instrumentos é incapaz de promover a completa limpeza e desinfecção daquelas áreas de maior complexidade anatômica (Bystrom, Claesson e Sundqvist, 1985). Além de promover a redução dos depósitos bacterianos, as soluções irrigadoras terão ação lubrificante, de dissolução tecidual e auxiliarão na remoção do *smear* layer (Byström e Sundqvist, 1983).

Diversas soluções têm sido propostas com esta finalidade (Mohammadi e Abbott, 2009). Até o presente momento, o hipoclorito de sódio (NaOCl) em diferentes concentrações, o ácido diamino etileno tetracético (EDTA), o ácido cítrico e a clorexidina têm sido os mais considerados para o preparo dos canais radiculares (Carson, Goodell e Mcclanahan, 2005; Molander *et al.*, 2007; Paiva *et al.*, 2012).

Desde a introdução do NaOCl na Endodontia, esta substância é o irrigante mais comumente utilizado e é considerado o padrão ouro (Garcia *et al.*, 2010). Ela tem a capacidade de dissolver os tecidos orgânicos (Beltz, Torabinejad e Pouresmail, 2003; Naenni, Thoma e Zehnder, 2004) e

apresenta potente ação antimicrobiana (Haapasalo M, 2005; Byström e Sundqvist, 1983; Foley *et al.*, 1983; Hauman e Love, 2003; Berber *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2001; Ferraz *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2004). No entanto, não há comprovação de que possua alguma ação antimicrobiana residual (Weber, 2003). Além disso, a eficácia da sua ação antimicrobiana é proporcional ao aumento da sua concentração (Gomes *et al.*, 2001; Berber *et al.*, 2006) ampliando, assim, a sua toxicidade (Becking, 1991; Hülsmann e Hahn, 2000; Tanomaru Filho *et al.*, 2002).

Como alternativa, a clorexidina tem sido proposta justamente em função da sua biocompatibilidade (Jeansonne e White, 1994) e substantividade, que gera efeito o antimicrobiano residual (White, Hays e Janer, 1997; Leonardo *et al.*, 1999; Rosenthal, Spångberg e Safavi, 2004; Dametto *et al.*, 2005; Khademi, Mohammadi e Havaee, 2006; Souza *et al.*, 2012; Keenan, 2012).

### *Clorexidina*

Muitos estudos têm sido conduzidos na busca de um irrigante que cumpra quatro pré-requisitos essenciais: ação antimicrobiana, ausência de toxicidade aos tecidos periapicais, solubilidade em água e capacidade de dissolver a matéria orgânica. A clorexidina se destaca pelas seguintes propriedades: ação antimicrobiana imediata; amplo espectro bacteriano, atuando em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, anaeróbias, facultativas e aeróbias, leveduras e fungos (Hennessey, 1973; Greenstein, Berman e Jaffin, 1986; Fardal e Turnbull, 1986; Vianna *et al.*, 2004; Dametto *et al.*, 2005; Waltimo *et al.*, 1999); baixa toxicidade (Greenstein, Berman e Jaffin, 1986); capacidade de adsorção pela dentina gerando efeito antimicrobiano residual (Heling *et al.*, 1992; Jeansonne e White, 1994; White, Hays e Janer, 1997).

A CHX é uma molécula sintética polibiguanida de cadeia simétrica formada por uma cadeia alifática de seis carbonos no centro e uma biguanida substituída por um anel p-clorobenzênico em cada extremidade (Greenstein, Berman e Jaffin, 1986). É uma molécula hidrofóbica e lipofílica, carregada positivamente, que interage com os fosfolipídios e lipopolissacarídios da membrana celular da bactéria (Greenstein, Berman e Jaffin, 1986). Sua

eficácia ocorre por causa da interação entre a carga positiva da molécula e os grupos fosfato negativos da parede celular microbiana (Hennessey, 1973; Gomes, Sato *et al.*, 2003; Gomes, Souza *et al.*, 2003). Esta interação altera o equilíbrio osmótico, aumentando a permeabilidade, e facilita a saída de elementos de baixo peso molecular da célula (efeito bacteriostático gerado por concentrações menores da clorexidina). Quando em altas concentrações (2%), a molécula é capaz de penetrar no interior da célula bacteriana, causando a morte celular pela precipitação dos componentes do citoplasma (Steinberg *et al.*, 1999; Gomes, Souza *et al.*, 2003).

Esta substância é uma base anti-séptica forte, mais estável na forma de sal (gluconato, acetato ou hidrocloreto). A preparação mais comum para o uso oral é o digluconato de clorexidina. Essa solução é solúvel em água e, em pH fisiológico, se dissocia rapidamente liberando os cátions de CHX (Greenstein, Berman e Jaffin, 1986). A concentração de 2% é a que tem sido indicada para o uso em endodontia e ela pode ser preparada tanto na forma de gel quanto na forma líquida (Athanasiadis, Abbott e Walsh, 2007; Gomes *et al.*, 2004; Siqueira, 1998; Ferraz *et al.*, 2001; Sena *et al.*, 2006; Zamany, Safavi e Spångberg, 2003; Zehnder, 2006). Além disso, ela apresenta baixa toxicidade mesmo em concentrações maiores (Yesilsoy *et al.*, 1995; Siqueira *et al.*, 1998).

Quando se compara a ação antimicrobiana da CHX e do NaOCl, os resultados dos estudos têm sido conflitantes (Jeansonne e White, 1994; Gomes *et al.*, 2004; Menezes *et al.*, 2004; Ercan *et al.*, 2004; Vianna *et al.*, 2004; Dametto *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2006; Rôças e Siqueira, 2011). Enquanto que a CHX parece inibir a aderência inicial de microrganismos, prevenindo o seu acúmulo e evitando a formação de biofilme, o NaOCl é o único irrigante capaz de romper o biofilme já formado (Mohammadi e Abbott, 2009b).

Ela tem se mostrado mais efetiva em eliminar microrganismos como o *E. faecalis* que resistem ao hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) dentro dos túbulos dentinários (Sharifian *et al.*, 2008; Mohammadi e Shalavi, 2012; Sinha *et al.*, 2013). Os resultados superiores da CHX podem ser explicados por estudos que demonstram que a ação alcalina antimicrobiana do  $\text{Ca(OH)}_2$  não é suficiente para a eliminação de biofilmes (Distel, Hatton e Gillespie, 2002;

Nakajo *et al.*, 2004; Chávez De Paz *et al.*, 2007; Van Der Waal *et al.*, 2011). Nesse sentido, é fundamental a desorganização do biofilme previamente à aplicação da medicação a base de  $\text{Ca(OH)}_2$ . Já o fato de a CHX apresentar um efeito antimicrobiano prolongado superior ao  $\text{Ca(OH)}_2$ , pode ser explicada pela propriedade de substantividade apresentada pela CHX (Baker *et al.*, 1983; Baker *et al.*, 1985; Lenet *et al.*, 2000).

Quanto à ação do gel de CHX 2%, como medicação durante 7 dias em biofilme oral desenvolvido sobre dentina bovina, o efeito sobre a viabilidade bacteriana foi semelhante ao do  $\text{Ca(OH)}_2$  para a avaliação imediata. Passadas 24 horas da primeira avaliação, os espécimes em que havia sido aplicado o gel de CHX apresentaram uma quantidade significativamente menor de células viáveis em relação àqueles em que o  $\text{Ca(OH)}_2$  foi utilizado. Porém, quando as duas medicações foram comparadas à ação da pasta tri-antibiótica (metronidazol, ciprofloxacina e minociclina), esta última, se mostrou mais eficaz nas duas avaliações (imediata e 24 horas) (Ordinola-Zapata *et al.*, 2013).

O efeito favorável da pasta tri-antibiótica e do gel de CHX 2% em comparação ao  $\text{Ca(OH)}_2$  contra *E. faecalis* também é relatado no estudo de Mozayeni *et al.* (2014). A CHX também tem ação contra *Candida albicans*, outro microrganismo frequentemente isolado nos casos de insucesso do tratamento endodôntico (Eldeniz, Guneser e Akbulut, 2013). Nesse sentido, inclusive, foi demonstrado que o efeito da CHX gel 2% pode ser superior ao do  $\text{Ca(OH)}_2$ , usado exclusivamente, para a eliminação da *C. albicans* (Delgado *et al.*, 2013).

Outro aspecto positivo em relação ao uso da CHX é que ela não interfere na composição do colágeno dentinário (Moreira *et al.*, 2009), favorecendo a adesão dos materiais restauradores do tipo resinosos (Santos *et al.*, 2006; Nassar *et al.*, 2011). Estudos demonstram que ela melhora a longevidade das restaurações por inibir a ação das metaloproteinases (enzimas que degradam o colágeno) (Gendron *et al.*, 1999; Cecchin *et al.*, 2011a; b).

Como nenhuma solução irrigadora cumpre, por si só, todas as características desejáveis (dissolução tecidual, remoção de debris e do *smear layer*) é necessária a combinação de agentes. O regime de irrigação

final é um passo importante no sentido de atingir uma melhor desinfecção e assegurar o efeito antimicrobiano residual após o preparo do canal radicular (Bailón-Sánchez *et al.*, 2014). O protocolo clínico sugerido por Zehnder (2006) para o tratamento da dentina antes da obturação do canal radicular consiste no uso do NaOCl para dissolver os componentes orgânicos, do EDTA para eliminar a *smear layer* e irrigação final com CHX para aumentar o espectro da atividade antimicrobiana e pela substantividade.

Embora essa combinação de irrigantes amplie o efeito antimicrobiano, a possível interação química entre eles deve ser considerada (Basrani *et al.*, 2007; Mohammadi e Abbott, 2009b; Do Prado, Simão e Gomes, 2013). Alguns estudos demonstram a ocorrência de alteração de cor e formação de precipitado marrom-alaranjado quando o NaOCl e a CHX são combinados (Vivacqua- Gomes *et al.*, 2002; Zehnder, 2006; Basrani *et al.*, 2007). A formação desse precipitado é explicada pela reação ácido-base que ocorre quando as duas soluções são misturadas: a CHX tem a habilidade de doar ions de hidrogênio enquanto que o NaOCl pode recebê-los. Esta troca iônica resulta na formação de uma substância neutra e insolúvel (Basrani *et al.*, 2007). Ao avaliar a natureza química do precipitado marrom-alaranjado, os autores reportam que o componente principal é paracloroanilina, um produto citotóxico e potencialmente carcinogênico (Basrani *et al.*, 2007; Chhabra *et al.*, 1991; Pereira *et al.*, 2012). Quanto maior a concentração de NaOCl utilizada, maior a quantidade de paracloroanilina formada.

Um estudo avaliou a resposta tecidual frente a presença do precipitado marrom-alaranjado formado pela associação de NaOCl e CHX (Cintra *et al.*, 2014). Ele se mostrou mais tóxico em comparação ao contato isolado do NaOCl e da CHX no dorso de ratos a curto prazo. Sendo estatisticamente diferente da CHX no período de 30 dias e do controle (tubo vazio). Porém, aos 90 dias, não foram observadas diferenças entre os grupos.

A fim de prevenir sua formação, foi testado o uso de álcool isopropílico, solução salina e água destilada entre a aplicação do NaOCl e a CHX durante o preparo do canal radicular. Porém, nenhuma das soluções foi capaz de prevenir a formação de resíduos após a associação de NaOCl e CHX (Magro *et al.*, 2014). Enquanto isso, o uso de álcool etílico absoluto previniu a sua formação (Krishnamurthy e Sudhakaran, 2010).

Nos estudos de Siqueira e Sen (2004) e de Waltimo *et al.* (2004) os canais que receberam a irrigação final de CHX a 2% estavam livres de microrganismos cultiváveis em relação aos controles em que foi utilizado somente o NaOCl como irrigante. Possivelmente, os íons carregados positivamente, que são liberados a partir da dissociação da molécula de CHX, são adsorvidos pela dentina, o que previne a colonização de microrganismos por um período além do tempo de aplicação da substância (Athanasiadis, Abbott e Walsh, 2007).

#### *Efeito antimicrobiano residual da clorexidina*

Um protocolo de tratamento que leva em consideração a prevenção da reinfecção do canal radicular, garantido assim, um prognóstico favorável para o tratamento endodôntico, deveria incluir o uso de irrigantes e/ou medicamentos que possuam substantividade. Esta propriedade é caracterizada pela associação prolongada entre um material e um substrato (Greenstein, Berman e Jaffin, 1986). Como resultado da presença dessa associação, é obtido o efeito residual.

Com relação ao tempo de ação residual, os estudos falam em períodos variáveis. O estudo *in vitro* de White, Hays e Janer (1997) avaliou a atividade antimicrobiana através da medida do halo de inibição formado em placas de agar colonizadas com *S. mutans* de amostras coletadas após o uso de CHX 0,12 e 2% em canais radiculares de dentes humanos extraídos. Os autores demonstraram que o efeito antimicrobiano da CHX a 2% utilizada como irrigante durou por 72 horas.

No estudo de Leonardo *et al.* (1999), que avaliou a substantividade da CHX a 2% em 22 dentes de 12 pacientes, com necrose pulpar e lesão periapical, o efeito antimicrobiano perdurou por até 48 horas após o seu uso como irrigante. Os autores concluíram que a clorexidina previne, *in vivo*, o crescimento microbiano devido aos seus efeitos residuais até 48 horas após sua utilização.

Com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana residual da CHX, Komorowski *et al.* (2000) utilizaram solução de clorexidina a 0,2% durante 5 minutos e 7 dias em canais radiculares bovinos. Passado o período de uso da solução, os canais foram contaminados com *E. faecalis* durante 21 dias. A

seguir, foram removidas raspas de dentina que foram colocadas em *Brain Heart Infusion* (BHI) a fim de avaliar o crescimento bacteriano. Os dentes tratados com CHX durante 7 dias apresentaram menor colonização da dentina por *E. faecalis* que as demais amostras. Dessa forma, os autores concluem que a CHX tem potencial para uso como medicação intracanal desde que possa ser utilizada por um período mínimo de 7 dias.

Em 2004, Ercan *et al.* compararam, *in vivo*, a ação de diferentes soluções irrigadoras em 30 dentes de 20 pacientes. Amostras bacteriológicas foram coletadas antes, imediatamente após e 48 horas após o preparo do canal radicular. Foi feita a contagem de UFC e as soluções de NaOCl 5,25% e CHX 2% foram as mais eficazes, por isso, os autores sugerem que as duas soluções poderiam ser utilizadas como irrigantes.

Em 2005, Dametto *et al.* avaliaram e compararam a atividade antimicrobiana do gel de CHX 2% em relação a solução de CHX 2% e ao NaOCl 5,25% contra *E. faecalis*. Para tanto, foram utilizadas raízes de pré-molares inferiores humanos contaminadas com monoculturas de *E. faecalis* durante 7 dias. Após a divisão dos espécimes em 5 grupos, conforme cada solução química auxiliar, foi realizado o PQM. Para a avaliação da atividade antimicrobiana, foram feitas coletas bacteriológicas (pré-tratamento, imediatamente após o tratamento e passados 7 dias do tratamento). As amostras foram cultivadas para determinar a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). A clorexidina a 2%, nas duas apresentações, promoveu redução significativa nas coletas imediata e 7 dias após. Enquanto isso, o NaOCl 5,25% reduziu UFC apenas na coleta imediatamente após o tratamento. Foi constatado crescimento bacteriano na coleta após 7 dias. Os autores concluem que a CHX gel e líquida foi mais efetiva que o NaOCl para a manutenção da redução microbiana do *E. faecalis* após 7 dias do preparo do canal radicular.

Mais estudos demonstram o efeito antimicrobiano prolongado: Khademi, Mohammadi e Havaee (2006) compararam a ação residual da CHX a 2%, da doxiciclina e do NaOCl a 2,6% sobre a dentina bovina contaminada com *E. faecalis*. A avaliação foi feita a partir da contagem das UFC de cultura obtida a partir de raspas de dentina coletadas das amostras. Os autores demonstraram que, após 5 minutos de aplicação da CHX a 2%, o efeito da

substantividade permaneceu durante 4 semanas e foi significativamente maior em comparação ao NaOCl e à doxiciclina.

No estudo recente de Ferrer-Luque *et al.* (2014), foi avaliado o efeito antimicrobiano residual da CHX a 0,2 e 2% em comparação a cetramida na concentração de 0,2% como irrigantes finais em dentes contaminados com *E. faecalis*. Passados 50 dias do uso das soluções, foram feitas coletas para avaliar a ocorrência de crescimento bacteriano. Os autores realizaram análise de sobrevivência e o grupo que apresentou os maiores valores foi a CHX 2%, com diferença estatística em relação aos outros dois grupos. Frente a esse resultado, os autores concluíram que a irrigação final com CHX 2% promove maior atividade antimicrobiana residual que a CHX 0,2% e a cetramida 0,2%.

Enquanto isso, alguns estudos avaliaram a substantividade da CHX através da sua quantificação e, não apenas, pelo seu efeito antimicrobiano residual. Rosenthal, Spånberg e Safavi (2004) avaliaram a substantividade da CHX a 2% em dentes bovinos extraídos após 10 minutos de uso da solução seguido de obturação do canal radicular. A quantificação da CHX, avaliada através de espectrofotometria, variou de 0,0048% no dia 1 até 0,0010% após 12 semanas. O efeito antimicrobiano da CHX reduziu progressivamente, passando de 1 UFC no dia 1 a 577,33 UFC após 12 semanas. Os resultados mostram que o efeito antimicrobiano da CHX permaneceu durante 12 semanas.

Souza *et al.* (2012) em estudo *in vitro*, avaliaram a substantividade da solução e do gel de CHX a 2% em dentes humanos durante 24 horas, 30 e 90 dias. A manutenção da CHX na dentina foi avaliada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A partir da análise, foi constatada a manutenção da substantividade da CHX pelo período de 90 dias após o seu uso. No entanto, a quantidade de solução de CHX detectada foi significativamente maior nas avaliações de 24 horas e 30 dias em comparação à CHX gel. Além disso, com o passar do tempo, a quantidade detectada reduziu em ambos os grupos comprovando que a substantividade é tempo-dependente.

Lin *et al.* (2003) atribuem a substantividade da CHX a sua capacidade de adsorção à dentina durante a primeira hora. Eles afirmam que, somente após alcançar o ponto de saturação é que a capacidade antimicrobiana da



CHX passa a aumentar com o tempo. Relembrando que Komorowski *et al.* (2000) concluíram que a aplicação durante 5 minutos da CHX não é capaz de induzir substantividade e que a mesma deveria permanecer pelo período de 7 dias para atingir tal efeito.

Baseado nos dados relatados anteriormente, ainda não se sabe se a presença de *E. faecalis* no interior do canal radicular pode interferir no efeito da substantividade da solução de CHX a 2%. Para isso, é necessária a avaliação da variação da quantidade de microrganismos presentes no canal radicular após o seu uso como irrigante. A partir desse conhecimento, será possível indicar com mais subsídios o seu uso como irrigante nos casos de insucesso do tratamento endodôntico, condição na qual o *E. faecalis* tem se mostrado um microrganismo frequente.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Correlacionar, em dentina humana de dentes extraídos e contaminada com *E. faecalis*, o efeito antimicrobiano residual e a substantividade da solução de clorexidina a 2%.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a viabilidade bacteriana através de microscopia confocal a laser nos períodos de 48 horas, 7 e 30 dias após o uso da solução;
- Quantificar a clorexidina através de cromatografia líquida de alta eficiência nos períodos de 48 horas, 7 e 30 dias após o uso da solução.

### **3. ARTIGO CIENTÍFICO**

Böttcher DE, Sehnem NT, Montagner F, Parollo CCF, Grecca FS. Correlation between residual antimicrobial activity and the presence of 2% Chlorhexidine solution on infected dentin.

(O artigo foi formatado para publicação no Journal of Endodontics)

Correlation between residual antimicrobial activity and the presence of 2% Chlorhexidine solution on infected dentin.

## **Abstract**

**INTRODUCTION:** The aim of this study was to correlate the bacterial viability and the presence of 2% chlorhexidine (CHX) on dentin by means of confocal laser scanning microscope (CLSM) and high-performance liquid chromatography (HPLC) for 48 hours, 7 and 30 days.

**METHODS:** One hundred twenty three extracted human teeth were used. Samples were divided into 4 groups according to the solution (CHX or saline) and the presence of *Enterococcus faecalis* biofilm. Samples were kept in contact with 5mL of the solution for 5 minutes. Each group was divided into 3 subgroups according to the evaluation period (n = 10). Statistical analysis was performed by using the Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U tests ( $P < .05$ ) and Spearman's Rank Correlation Coefficient ( $P < .01$ ).

**RESULTS:** There was a negative correlation between the percentage of live cells and the amount of remaining CHX ( $P = .000$ ). CHX significantly reduced the percentage of viable cells compared to saline after 48 hours ( $P = .007$ ). Differences were maintained in the 7-day evaluation ( $P = .001$ ). After 30 days, CHX group presented an increase of viable cells, thereby becoming similar to saline ( $P = .623$ ). Simultaneously, remaining CHX significantly reduced in the 30-day specimens ( $P = .000$ ).

**CONCLUSION:** The results of this study indicate that 2% CHX solution was detected for 48 hours and 7 days, keeping a low percentage of viable cells. The presence of microorganisms on human dentin did not affect 2% chlorhexidine maintenance.

**Keywords:** Chlorhexidine, *Enterococcus faecalis*, substantivity

## Introduction

Endodontic infection is characterized by the presence of microorganisms in the root canal system and is the major cause of apical periodontitis (1). Species' interaction and nutrient supply are essential for the persistence of endodontic infection. Besides, the root canal represents a special environment, which allows the survival of a restricted microbiota (2).

During endodontic treatment, anaerobiosis is disrupted when the pulp chamber is assessed. Furthermore, chemomechanical preparation eliminates microorganisms by interfering with microbial interaction and by limiting the nutrient sources. However, even after root canal filling, penetration of periapical and dentinal fluids provides a favorable environment for recontamination when sealing fails (3). *Enterococcus faecalis*, a Gram-positive and facultative microorganism, is commonly related to endodontic treatment failure (4-7). It has become resistant to endodontic disinfection protocols (7-10).

Different antimicrobial agents can be used for root canal system disinfection. Irrigants act for a short period and its use is restricted to root canal preparation time; while intracanal medication can remain between appointments. If irrigants and/or intracanal medication have residual antimicrobial activity, prevention of recontamination may be achieved (11).

Studies have shown that chlorhexidine (CHX) is able to adsorb onto the dentin walls (substantivity), providing long-lasting antimicrobial effects (12-20). In this regard, different evaluation periods are considered. Moreover, the assessment of CHX residual effect is mostly based on microbiological techniques. Although some studies quantify CHX, none precisely correlates substantivity and bacterial viability. A summary of the various study designs, methods and evaluation periods of these previous studies are found in table 1.

Based on these reasons, the aim of the present study was to correlate the bacterial viability and the presence of 2% chlorhexidine (CHX) on dentin for 48 hours, 7 and 30 days after disinfection protocol.

Table 1. Summary of studies evaluating the residual antimicrobial effect of chlorhexidine (CHX).

Authors (year)	Sample (n)	Experimental groups	CHX contact time	Evaluation Periods	Evaluation Methodology	Conclusions
White et al. (1997)	Extracted human teeth (44)	2% CHX solution; 0.12% CHX solution; Sterile deionized water	During preparation	6, 12, 24, 48 e 72 hours after preparation	Inhibition zone	CHX Substantivity is maintained for 72 hours.
Leonardo et al. (1999)	Human teeth with pulp necrosis and periapical lesion (22)	2% CHX solution	During preparation	Before and 48 hours after preparation	CFU counting and inhibition zone	CHX antimicrobial residual effect for 48 hours.
Komorowski et al. (2000)	Bovine dentin (60)	Saline; 0.2% CHX; 5.25% NaOCl	5 minutes; 7 days	21 days	Optical density	Authors recommend the use of 0.2% CHX as an intracanal medication for 7 days.
Ercan et al. (2004)	Necrotic human teeth (30)	2% CHX solution; 5.25% NaOCl	During preparation	Before, immediately after and 48 hours after preparation	CFU counting	CHX is an alternative for the use of NaOCl.
Rosenthal et al. (2004)	Bovine teeth (60)	2% CHX solution; Saline	10 minutes	1 day, 3, 6 and 12 weeks	Spectrophotometry and CFU counting	The use of CHX presents advantages.
Dannetto et al. (2005)	Extracted human teeth (80)	2% CHX solution; 2% CHX gel; 5.25% NaOCl; distilled water; matrosol gel	During preparation	Before, immediately after and 7 days after preparation	CFU counting	CHX solution and gel can be recommended as auxiliary substances during root canal preparation.
Khademi et al. (2006)	Infected bovin dentin (80)	2% CHX solution; 2.6% NaOCl; doxycycline	5 minutes	Immediately after, 7, 14, 21 and 28 days after disinfection	CFU counting	CHX presented higher substantivity than doxycycline and remained for 28 days.
Souza et al. (2012)	Extracted human teeth (45)	2% CHX solution; 2% CHX gel; distilled water	During preparation	24 hours, 30 and 90 days	HPLC	CHX remained in root canal for 90 days.
Ferrer-Luque et al. (2014)	Extracted and infected human teeth (86)	2% CHX solution; 0.2% CHX solution; 0.2% cetrimide	1 minute	Immediately after and daily for 50 days after disinfection	Turbidity evaluation	2% CHX solution presented the highest residual effect in teeth infected with <i>E. Faecalis</i> .

## Materials and methods

### *Specimen preparation*

This study was approved by the Ethics Committee in Research (Federal University of Rio Grande do Sul – UFRGS; protocol #770038). One hundred twenty three extracted human teeth with a single root canal were selected. Roots with fracture lines or anatomical irregularities, previous endodontic treatment, calcifications or curvatures were excluded from the study. The roots were irrigated with 2.5% NaOCl (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda, Ibiporã, Brazil) and pulp remnants were removed by using a #15 K-file (Maillefer, Ballaigues, Switzerland).

Samples preparation was carried out in a modified version recommended by Ma *et al.* (21). The root canals (N=123) were enlarged up to a #6 Gates-Glidden drills (Dentsply Tulsa, Tulsa, USA) with a low speed hand piece. On the external surface, two grooves were produced following the root long axis with a round small-diameter drill (KG Sorensen, Cotia, Brazil). Each root was sectioned into two halves with the use of a chisel (2 specimens per root; N = 246). Standardized dentin blocks (4 mm of length) were obtained from the cervical portion of the root. Sections were made by using a double-face diamond disc (Extec, Enfield, USA) with 0.3 mm thickness and 120 mm diameter at a speed of 350 rpm under refrigeration in a precision cutting machine (Isomet 2000, Buehler LTD, Lake Bluff, USA). The inner and outer surfaces of the hemi-cylinders were flattened using 600 grain sandpaper (3M Brazil, Sumare, Brazil) to obtain 2 mm-thick specimens (final sample size: 4x4x2 mm). Smear layer was removed by immersing the samples in 2.5% NaOCl solution followed by 17% EDTA (Biodinâmica, Ibiporã, Brazil), during 5 minutes in each solution, using an ultrasonic cleaner (Cristófoli Equipment Biosafety, Campo Mourão, Brazil). A final wash with distilled water was carried out for 1 minute.

Specimens were suspended with orthodontic wires ( $\varnothing$ 0.20 mm / .008”) (Dental Morelli Ltda, Sorocaba, Brazil) in 120 falcon tubes – two specimens in each tube (Figure 1). Six specimens were individually suspended and used as

methodological controls. The sets were autoclaved at 121°C and 1 atm for 15 minutes.

The 120 sets were randomly divided into two groups according to the auxiliary chemical substance: group 1 (G1) - 2% Chlorhexidine Solution (Maquira, Maringá, Brazil) (n = 60), group 2 (G2) - Saline (ADV Farma, Nova Odessa, Brazil) (n = 60). Sixty sets of each experimental group were infected with *E. faecalis* as described below. The other sixty sets were not infected (Figure 2).

#### *Bacterial strains and culture conditions*

*E. faecalis* (ATCC 29212) was subcultured overnight at 37°C in Brain Heart Infusion Agar (KASVI, Curitiba, Brazil). The colonies were diluted into fresh Brain Heart Infusion (BHI) and incubated to match the turbidity similar to 0.5 McFarland standard, corresponding to an optical density of 0.036 absorbance, at 550nm in a spectrophotometer (Biomate 3, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

Sixty sets and 3 controls were inoculated with 7mL of the suspension under laminar flow. Tubes were closed and kept under 37°C during 21 days to allow the biofilm formation. Three milliliters of the culture media was replaced every two days in order to avoid saturation. Cultures were checked for purity by Gram stain and colony morphology throughout the experimental time.

#### *Disinfection protocols*

Disinfection procedure was made for the 120 sets. Solutions were not used in the six methodological controls.

Saline solution was used to eliminate the culture medium and nonadherent cells. Each set was placed in contact with 5mL of the tested solution and kept for 5 minutes. The pieces were washed in saline for 1 minute, replaced on another tube containing 7mL of sterile BHI and maintained at 37°C during the evaluation period.

The culture media was replaced weekly. The whole process of media



replacement was performed under laminar flow and aseptic conditions to avoid samples contamination.

After disinfection, the experimental groups (divided into infected and not infected) were subdivided into three other sub-groups (n = 10), according to the evaluation period (48 hours, 7 days and 30 days).

Methodological controls (n = 6) were evaluated in each period to assess bacterial viability maintenance (n = 3) and to control the sterilization process (n = 3) (Figure 2). All the controls were maintained immersed in BHI and replaced once a week.

#### *Confocal laser scanning analysis (CLSM)*

After each evaluation period (48h, 7 or 30 days), one specimen was randomly removed from the set and placed over a glass coverslip (0.17 mm thick) (Precision Glass Line, CRAL Artigos para Laboratórios Ltda, Cotia, Brazil). For determination of bacterial viability, "Live/Dead" BacLight™ Bacterial Viability kit L-13152 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, USA) was used. As previously described (22), the SYTO9 probe (excitation at 488nm and emission at 525nm) labels all bacteria in a population, while the propidium iodide probe (excitation at 488 nm and emission at 560 nm) penetrates only bacteria with damaged plasmatic membrane. Thus, bacteria incubated in the presence of the two markers simultaneously fluoresces green in color, if live, and red, if dead (23). Dye was applied over the dentin specimen for 5 min at a 1:1 ratio (total volume 20µL). After this, a topographical analysis of the sample was performed.

Fluorescence from the stained cell was viewed by using CLSM (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Germany). Simultaneous dual-channel imaging was used to display green and red fluorescence. One confocal "stack", with a 1-µm step size and a format of 512 x 512 pixels, from a random area was obtained from each sample using a 60x oil lens. Images were acquired through the software Olympus FluorView Version 1.7 (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Germany). At least 10 µm of the scanning included the subsurface level of the dentin.

For the viability evaluation, quantitative analysis was performed with the software bio Image\_L (The MathWorks Inc., Natick, USA) (24). Briefly, the software produces information of the total biofilm population as well as the independent subpopulations represented by red and green fluorescent colors. The biofilm analysis tool was used to calculate the survival of biofilm cells. It was evaluated by calculating the biovolume of the green subpopulation as a percentage (%) of the total biovolume of the biofilm. In order to remove the green background, the Noise Reducing Factor was adjusted to 0.9.

The absence of normal distribution was confirmed in the preliminary analysis using the Kolmogorov-Smirnov test. Data was analyzed using the SPSS 11.0 software (IBM SPSS Statistics 20; SPSS, Chicago, IL, USA).

Statistical analysis of the percentage of live cells in the samples evaluated after 48h, 7 and 30 days was performed using the nonparametric Kruskal-Wallis test ( $P < .05$ ). Comparison between the solutions in each period was performed using the Mann-Whitney U test ( $P < .05$ ).

#### *Quantification of CHX with High Performance Liquid Chromatography system (HPLC)*

The methodology for quantification of chlorhexidine was adapted from Souza *et al.* (17). The specimen of each set that was not used for CLSM was placed in 1.5mL microtubes and 1mL of a extraction solution (acetonitrile : 1% formic acid in water, 20:80) was added. The microtubes were heated in a water bath at 80°C for 20 minutes and sonicated (ultrasonic agitation) for 10 minutes. Next, the microtubes were centrifuged at 6.000 rpm for 15 minutes. Supernatants were diluted twice with the extraction solution and filtered in PTFE filters (0.45µm pore size). Then, 20µL were injected into the HPLC system (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) and analyzed with the ChemStation software (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA). CHX was assayed by isocratic elution (methanol: water, 63:37 - v / v). Then, 4% triethylamine was added to the mobile phase, and pH adjusted to 3.7 with hydrochloric acid. The flow rate was maintained at 0.5-mL/min through the diode array calibrated at 260nm, producing a total run time of 18 minutes.

Chromatographic separations were performed using a reversed phase column (Atlantis T3 Column, 100Å, 5µm, 4.6mm X 250mm, Waters, Milford, USA), maintained at 40°C. The CHX concentration in the 2% solution (external control) was determined by a standard curve that was analyzed with weighted least-squares linear regression.

Statistical analysis of the amount of CHX retained in the samples evaluated after 48h, 7 and 30 days was performed using the nonparametric Kruskal-Wallis test ( $P < .05$ ). Comparison between the solutions in each period was performed using the Mann-Whitney U test ( $P < .05$ ).

Correlation between the percentage of live cells and the amount of remaining CHX was performed using the Spearman's Rank Correlation Coefficient ( $P < .01$ ).

## Results

For CLSM evaluation, the median and percentiles of live cells (%) in the evaluated groups and periods are shown in Table 2. After 48 hours, the CHX solution was able to significantly reduce the percentage of viable cells compared to the saline group ( $P = .007$ ). This difference remained in the 7-days evaluation ( $P = .001$ ). Overall, saline was ineffective to kill microorganisms during the tested periods. After 30 days, CHX group presented an increase of viable cells, thereby becoming similar to saline ( $P = .623$ ). There was no significant difference when periods were compared within the same group. Representative images of the evaluated samples are shown in Figure 3.

Table 3 shows the median and range values for the CHX substantivity as observed through HPLC. CHX solution remained in dentin independently of the presence of microorganisms ( $P > .05$ ). Remaining CHX significantly reduced in the 30-day specimens ( $P = .000$ ). Control group (saline) had no remaining CHX (data not shown).

There was a negative correlation ( $\rho -0.435$ ) between the percentage of live cells and the amount of remaining CHX ( $P = .000$ ).

**Table 2.** Median and percentiles (25 - 75) of the percentage of live cells (green) after contact with the experimental solutions.

	Green 48h (%)	Green 7days (%)	Green 30days (%)	P
<b>Saline</b>	69.75 (50.96 – 75.60) <sup>Aa</sup>	90.46 (48.71 – 95.18) <sup>Ac</sup>	36.87 (19.32 – 83.64) <sup>Ae</sup>	0.064
<b>2% CHX</b>	0.93 (0.14 – 50.32) <sup>Bb</sup>	3.94 (0 – 31.67) <sup>Bd</sup>	36.07 (6.64 – 69.32) <sup>Be</sup>	0.162
<b>P</b>	0.007	0.001	0.623	

Median values followed by different capital letters in the same row shows statistical significant differences. Median values followed by different small letters in the same row shows statistical significant differences. P < .05

**Table 3.** Median and range values of the amount of CHX remaining (substantivity) in the sterile and infected dentin over time.

	48h (mg/mL)	7days (mg/mL)	30days (mg/mL)	P
<b>Sterile</b>	0.049 (0.18 – 0.84) <sup>a</sup>	0.039 (0.007 – 0.110) <sup>a</sup>	0.001 (0.001 – 0.005) <sup>b</sup>	0.000
<b>Infected</b>	0.051 (0.028 – 0.065) <sup>a</sup>	0.066 (0.036 – 0.600) <sup>a</sup>	0.001 (0.001 – 0.002) <sup>b</sup>	0.000
<b>P</b>	0.880	0.059	0.300	

Different letters indicate a statistically significant difference. P < .05

## Discussion

Substantivity is an additional property of CHX that is not observed for sodium hypochlorite solutions (14, 15, 18, 19). Several methodologies (12, 16-18, 20) were implemented to assess the maintenance of residual antimicrobial effect, although there are few studies showing that CHX would maintain this residual effect on infected human dentin for periods longer than 72 hours. Furthermore, there are no previous studies that correlate the CHX concentration, retained in dentin, and the bacterial cell viability for a 30-day period.

The present *in vitro* study demonstrated that residual microorganisms did not affect the amount of 2% chlorhexidine solution retained on human dentin. Moreover, CHX substantivity detected by the presence of CHX through HPLC agrees with the behavior on bacterial cells viability.

Five minutes CHX exposure was able to keep a low percentage of viable microorganisms at 7-day period. Nevertheless, it remains unclear whether a longer application period would keep this reduction within 30 days. At day 30, the CHX effect over the microbial cells was equivalent to control.

Furthermore, the CHX amount detected through HPLC was inferior to the standard curve and may be considered absent.

Previous studies (17, 20) have reported periods of substantivity that are longer than those observed in the present study (up to 90 days). However, they did not associate the amount of CHX present in the final evaluation period to the efficient microbial control.

Rosenthal, Spångberg and Safavi (16) evaluated 2% CHX substantivity and its residual antimicrobial effect after 1-minute contact over bovine dentin for 12 weeks. Differently from the present study, CHX quantification was performed by spectrophotometry. Nevertheless, this technique does not separate the components of the mixture, generating a bias if any of those absorb the same radiation as CHX. Finally, authors do not present a statistical correlation between quantification and residual antimicrobial effect of CHX. However, the concentration of CHX also reduced over time as well as the residual antimicrobial effect.

HPLC is a physical-chemical method for separating components of a mixture. This evaluation methodology was applied to quantify CHX by Souza et al. (17) and Gamal et al. (25). It was reported to be a sensitive method with excellent selectivity and reproducibility (25).

The current knowledge in endodontic microbiology is based on the application of several methods, such as conventional histology, correlative light and electron microscopy, CLSM, microbial culturing, and biochemical and molecular techniques. All these methods have different degrees of limitations with respect to sensitivity, specificity, and etiologic relevance (26). CLSM has been widely used to assess bacterial viability after different disinfection protocols used in Endodontics (27-29).

This method was recently used to evaluate the residual effect of 2% CHX gel as an intracanal medication (29). The authors attest that an advantage of CLSM is that it can evaluate, by direct observation, *in situ* viability of microorganisms on the infected dentin by assessing the membrane permeability without disturbing attached cells. This evaluation procedure in which the cell viability is measured directly on the infected surface is similar to

clinical conditions in which no inactivation of antimicrobial substances is performed during the endodontic treatment (29).

Therefore, unlike the present study, other authors evaluated CHX residual antimicrobial effect through CFU counting (14, 15, 19) or inhibition zones evaluation (12, 13). In addition, the culture method commonly used to evaluate the residual antimicrobial effect may fail to detect all viable microorganisms (30).

Substantivity is the prolonged association between a material (e.g. CHX) and a substrate (e.g. dentin). This association can be greater and more extended than expected from a simple deposition mechanism (31). In addition, exposure of dentinal tubules, intertubular dentin, and dentin-associated collagen increases the amount of root surface areas onto which CHX can attach (32). Antimicrobial substantivity depends on the number of CHX molecules available to interact with the substrate. Additional efforts must be employed to understand the mechanisms that are responsible for CHX binding to mineralized and demineralized dentin in order to optimize the clinical use of CHX and to maximize its retention and effectiveness (33).

Though rarely predominant, *E. faecalis* is commonly associated with failures of endodontic treatment and has been shown resistant to different endodontic disinfection protocols (4-10). In this regard, *E. faecalis* has been widely used to evaluate the efficacy of different disinfection protocols consolidating the experimental model (34). However, it is important to emphasize that the aim of this study was not to evaluate the effectiveness of CHX solution against *E. faecalis*. The present study assessed the influence of a biofilm on the CHX residual effect.

CHX solution was chosen because it has a faster action (35) than CHX gel. Therefore a 5-minute application can be clinically accepted as a final flushing. Ferrer-Luque *et al.* (20) showed that 2% CHX solution possesses antimicrobial residual effect during a 50-day period after 1-minute contact. With a longer contact time (during root canal preparation), Souza *et al.* (17) observed the presence of CHX solution after 90 days.

Despite BHI renewal, a reduction in the percentage of viable cells for the control group in the 30-day period was observed. It can be caused by a possible saturation of biofilm growth. In this respect, the study of Ferrer-Luque *et al.* (20) does not quantify CHX substantivity, their conclusions were based on bacterial regrowth by turbidity of samples. Thus, it is doubtful whether turbidity absence represents antimicrobial residual effect or biofilm saturation by preventing bacterial growth. Furthermore, the authors did not report the existence of a control for maintenance of viability.

Longer evaluation periods are also susceptible to external contamination. However, it is important to emphasize that the non-infected dentin specimens showed no biofilm formation, as verified by confocal microscopy.

It is noteworthy that the amount of CHX detected by HPLC produced the maintenance of residual antimicrobial action over *E. faecalis*, as determined by CLSM. Accordingly, the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of CHX, in which 90% of the organisms are inhibited, range from 0.032 to 0.040 mg/mL for Gram-positive e Gram-negative, respectively (25). After all, the concentrations of 0.049 and 0.051 mg/mL (48 hours; sterile and infected, respectively) and 0.039 and 0.066 mg/mL (7 days; sterile and infected, respectively) are greater than the MIC of CHX. Accordingly, as long as the number and growth of bacteria were controlled, CHX would be retained and effective.

## **Conclusion**

The results of this study indicate that 2% CHX solution was detected for 48 hours and 7 days, keeping a low percentage of viable cells. The presence of microorganisms on human dentin did not affect 2% chlorhexidine maintenance.

## **Acknowledgments**

Supported by grants from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and a seed grant from Federal University of Rio

Grande do Sul (PROPESq – UFRGS; protocol # 2014 - 11746).

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

## References

1. Kakehashi S, Stanley Hr, Fitzgerald Rj. The Effects Of Surgical Exposures Of Dental Pulp In Germ-Free And Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-349.
2. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992;18(9): 427-430.
3. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85(1): 86-93.
4. Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod* 2006;32(2):104-109.
5. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30(5): 315-320.
6. Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription- PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod* 2006;32(8):715-721.
7. Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J* 1996;29(4):235-241.
8. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001;34(6):429-434.
9. Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Sundqvist G, Happonen RP. Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains.



Eur J Oral Sci 2004;112(3):207-215.

10. Chávez De Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J* 2003;36(7):500-508.

11. Mohammadi Z, Abbott PV. Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: a review. *Aust Endod J* 2009;35(3):131-139.

12. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod* 1997;23(4):229-231.

13. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod* 1999;25(3):167-171.

14. Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de 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(6): 768-772.

15. Khademi AA, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Aust Endod J* 2006;32(3):112-115.

16. Rosenthal S, Spångberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98(4): 488-492.

17. Souza M, Cecchin D, Farina AP, Leite CE, Cruz FF, Pereira CAC, et al. Evaluation of chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. *J Endod* 2012;38(9):1249-1252.

18. Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *J Endod* 2000;26(6):315-317.

19. Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gül K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal:

in vivo study. J Endod 2004;30(2):84-87.

20. Ferrer-Luque MC, Arias-Moliz TM, Ruíz-Linares M, García EMM, Baca P. Residual activity of cetrimide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. Int J Oral Sci 2014;6(1):46-49.

21. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. J Endod 2011;37(10):1380-1385.

22. Vitkov L, Hannig M, Krautgartner WD, Herrmann M, Fuchs K, Klappacher M, et al. Ex vivo gingival-biofilm consortia. Lett Appl Microbiol 2005;41(5):404-411.

23. Hohscheidt GL, Böttcher DE, Parolo CCF, Montagner F, Grecca FS. Response of *E. faecalis* biofilms to different associations of auxiliary substances during root canal preparation: A confocal laser microscopy analysis. Microsc Res Tech 2013;76(6):658-62.

24. Chávez de Paz LE. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. Appl Environ Microbiol 2009;75(6):1734-1739.

25. Gamal AY, Kumper RM, Sadek HS, El Destawy MT. Chlorhexidine controlled-release profile after EDTA root surface etching: an in vivo study. J Periodontol 2011;82(5):751-757.

26. Nair PN. Abusing technology? Culture-difficult microbes and microbial remnants. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007;104(4):569-570.

27. Del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MA, Cavenago BC, Villas-Boas MH, Graeff MS, et al. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. J Endod 2011;37(8):1134-1138.

28. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MS, Gomes de

Moraes I, Marciano M, et al. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J* 2012;45(2):162-168.

29. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Minotti PG, Cavenago BC, Garcia RB, Bernardineli N, et al. Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral-infected dentin biofilm model. *J Endod* 2013;39(1):115-118.

30. Siqueira JF. On the issue of uncultivated bacteria and dead cell detection by molecular methods: Reply to Dr. Nair's commentary. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105(1):5-8; author reply 8-10.

31. Greenstein G, Polson A. The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: a comprehensive review. *J Periodontol* 1998;69(5):507-520.

32. Gamal AY, Mailhot JM. Effects of EDTA gel preconditioning of periodontally affected human root surfaces on chlorhexidine substantivity - an SEM study. *J Periodontol* 2007;78(9):1759-1766.

33. Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A, et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater* 2010;26(8):779-785.

34. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod* 2012;38(10):1376-1379.

35. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001;34(6):424-428.

## Figure Captions

Figure 1. Sample set: (A) Falcon tube with suspended specimens inside, (B) Specimens suspended by orthodontic wire, (C) Dentin specimen (2x2x4mm).

Figure 2. Flowchart

Figure 3. (A) Saline solution - 48 hours, (B) Saline solution - 7 days, (C) Saline solution - 30 days, (D) 2% CHX solution - 48 hours, (E) 2% CHX solution - 7 days, (F) 2% CHX solution - 30 days, (G) Methodological control – infected dentin 48 hours, (H) Methodological control – not infected 48 hours. Bar represents 9930 $\mu$ m.

## Figures

Figure 1:

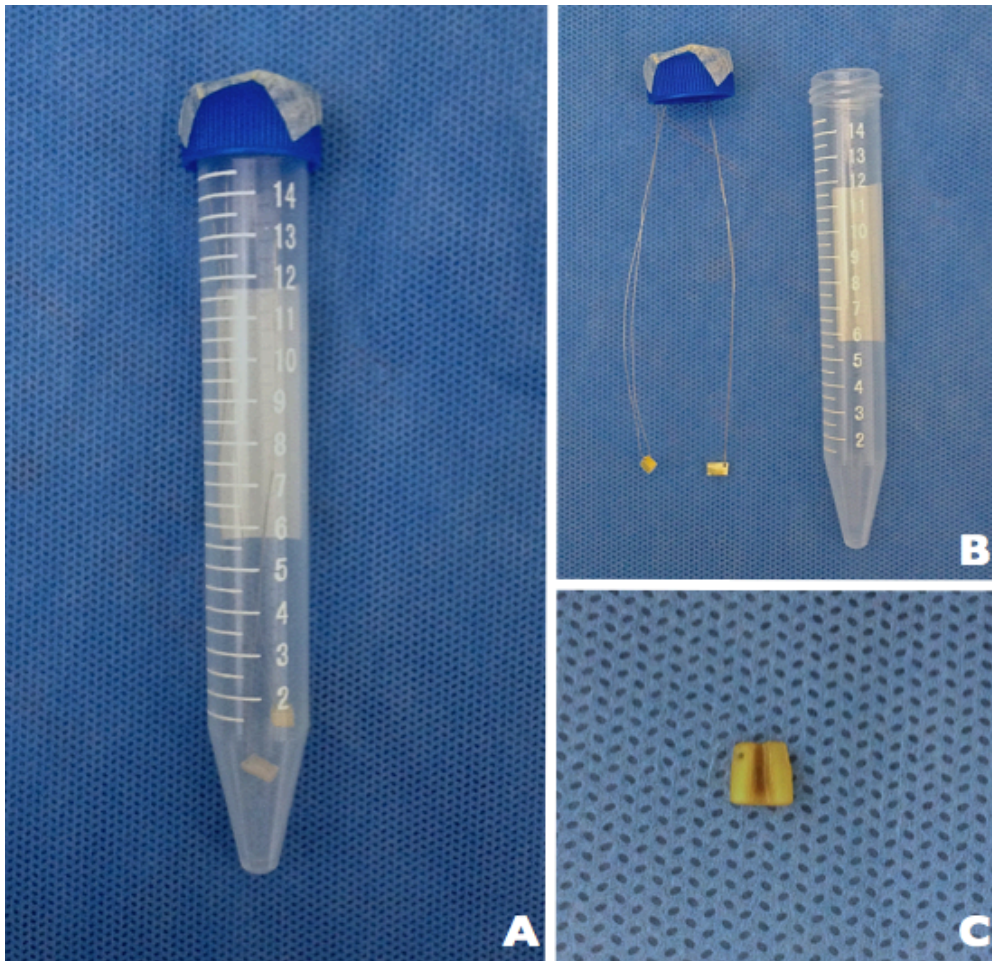


Figure 2:

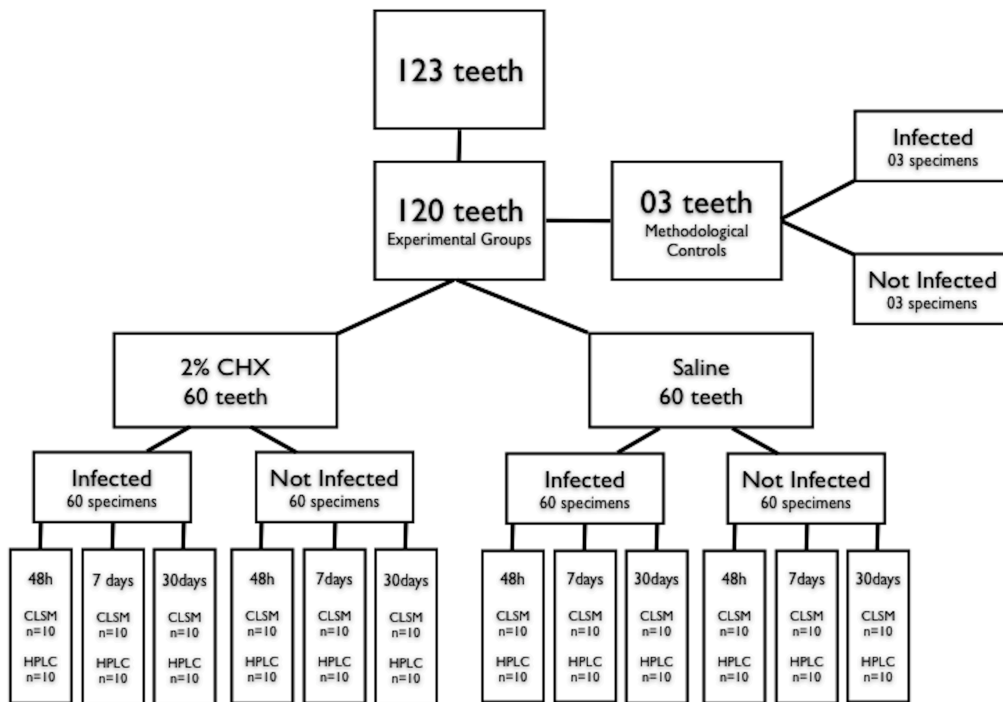
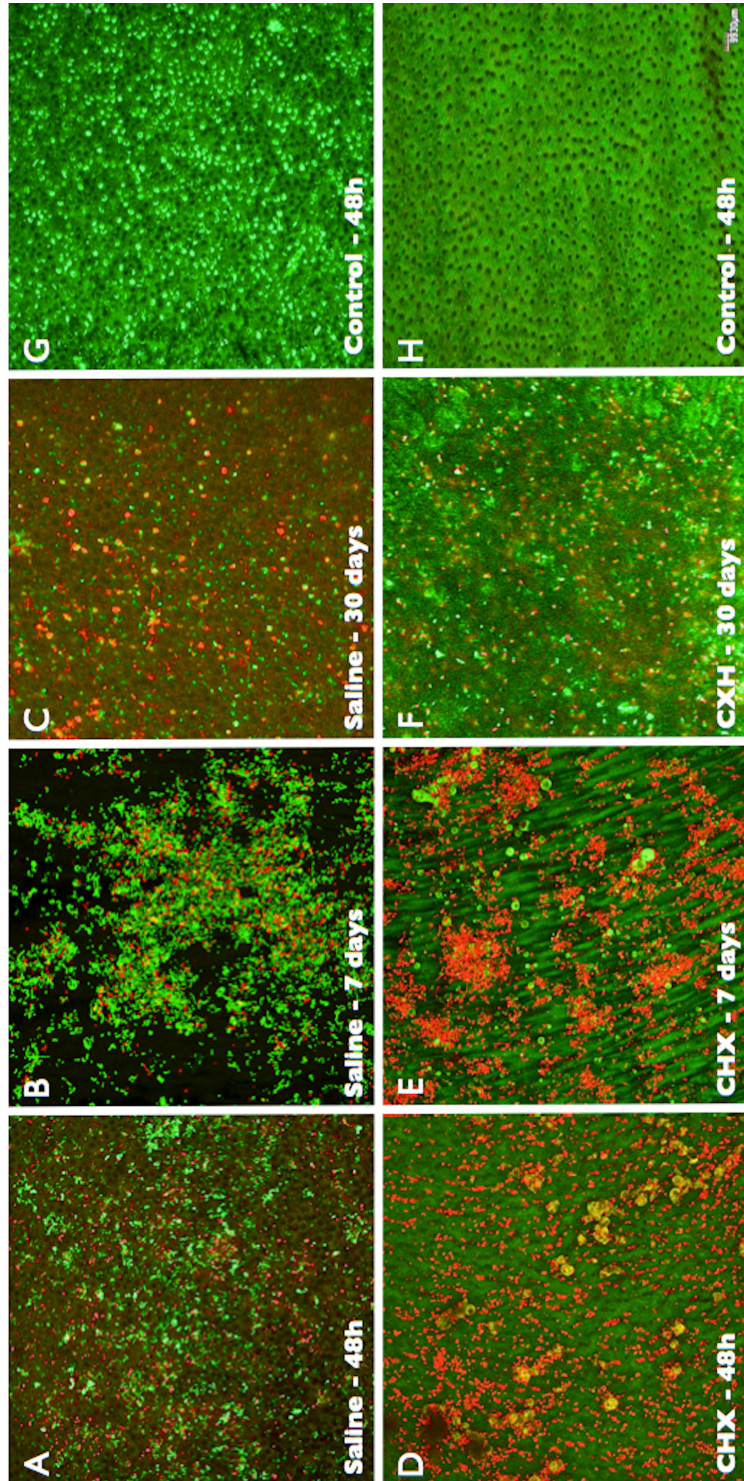


Figure 3:



#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prática clínica odontológica deve estar baseada em evidências científicas a fim de proporcionar tratamentos seguros para a saúde do paciente, com resultados positivos e longevos. Nesse sentido, a ciência deve traduzir as necessidades da clínica aperfeiçoando técnicas e, com isso, mantendo a evolução da Odontologia.

No contexto da Endodontia, há a busca constante pelo aprimoramento da desinfecção do sistema de canais radiculares. Com o avanço das técnicas de cultivo e de avaliação microbiológica, associadas ao avanço dos exames de imagem, que permitiram desvendar a complexa anatomia do canal radicular, foi tomada a consciência de que ainda não é possível atingir a completa desinfecção durante o tratamento endodôntico. Situação essa, que pode levar ao insucesso.

O insucesso do tratamento é um fato relevante, pois, cria a necessidade de uma nova intervenção. Há, ainda, o risco da presença de microrganismos persistentes, como *E. faecalis*, o que torna o prognóstico duvidoso. Essa situação tem colocado em cheque a eficiência dos protocolos clínicos atualmente preconizados e disponíveis para a prática endodôntica.

Além disso, quando a possibilidade de melhoria dos protocolos de desinfecção gira em torno do uso de substâncias com maior efeito antimicrobiano, é evidente que se corre o risco de potencializar os efeitos adversos relacionados ao uso desses agentes mais eficientes. A relação de dose/efeito já está comprovada na literatura através de estudos que avaliaram o efeito antimicrobiano do NaOCl, atual padrão-ouro para o preparo químico-mecânico do canal radicular (Vianna *et al.*, 2004; Vianna *et al.* 2006).

Assim, surge um contraponto: ao mesmo tempo em que é necessária uma maior eficiência da solução irrigadora, também é desejável a diminuição dos efeitos adversos gerados pelo seu uso, de forma a tornar o tratamento seguro e favorecer o reparo necessário.



Nessa busca, a clorexidina surge como uma alternativa ao NaOCl em função de apresentar efeito antimicrobiano semelhante, maior biocompatibilidade e a característica exclusiva da substantividade (Mohammadi e Abott, 2009a). No entanto, apesar de possuir potencial clínico, o uso exclusivo da mesma ainda não está consolidado. Uma das reflexões a ser conduzida nesse sentido é que, apesar de algumas escolas já preconizarem o uso dessa substância durante o PQM, a dificuldade para a quebra de paradigmas ainda pesa quando da possibilidade de modificar um protocolo clínico adotado há muitos anos, caso do uso do hipoclorito de sódio.

De qualquer forma, a CHX peca pela ausência da capacidade de dissolução da matéria orgânica (Mohammadi e Abott, 2009a). Nesse sentido, remanescentes celulares e restos necróticos servirão de fonte nutricional para aqueles microrganismos persistentes. Por isso, seria importante que a solução irrigadora possuísse essa propriedade.

Como uma tentativa de ampliar o espaço da CHX na endodontia, embasando as condutas que têm sido adotadas por seus defensores, a presente tese comprovou que a ocorrência do efeito antimicrobiano residual está relacionada com a presença da CHX na dentina humana. Estudos prévios, avaliando a substantividade da CHX, não contemplam de forma conjunta a avaliação da viabilidade bacteriana associada à quantificação da CHX.

A partir das análises realizadas, foi possível constatar que a CHX permaneceu retida na dentina durante 7 dias, independente da presença do biofilme de *E. faecalis*. Passados 30 dias, ocorreu o aumento do percentual de células bacterianas viáveis que estava associado à diminuição da concentração de CHX. No entanto, se houver a manutenção do adequado selamento do canal radicular, não acontecerá o aumento da viabilidade bacteriana no contexto clínico.

Uma hipótese ainda a ser testada é: será necessário um aumento do tempo de contato da CHX para que ela atinja uma maior concentração

sobre a dentina e, com isso, a ampliação da manutenção do efeito antimicrobiano residual da mesma?

O aspecto limitante do presente estudo foi a necessidade de se manter um ambiente favorável para o crescimento bacteriano, durante todo o período experimental, a fim de que se pudesse relacionar a ausência e/ou presença de microrganismos viáveis com uma maior ou menor ação da CHX. Essa limitação pode interferir na confiabilidade de resultados futuros, em estudos com maior tempo de avaliação, pelo risco de contaminação das amostras por outros microrganismos. Até o momento, apenas um estudo (Ferrer-Luque, 2014) avaliou o efeito residual sobre a dentina contaminada por um período maior (50 dias) que o do presente, no entanto, não foi utilizada metodologia para a quantificação da CHX.

Caso não se encontre justificativa para um maior tempo de contato da CHX sobre a dentina, o seu exclusivo efeito residual passaria a ter um papel importante na desinfecção do canal radicular. Como se sabe, já foi proposta a associação do NaOCl com a CHX a fim de complementar as propriedades de ambas as substâncias (Zhender, 2006). No entanto, a formação do precipitado marrom-alaranjado pela interação dos seus componentes é motivo de preocupação por causa dos efeitos tóxicos e pelo comprometimento da qualidade da obturação do canal radicular (Basrani *et al.*, 2007).

Portanto, os resultados da presente tese são importantes para comprovar a existência da correlação entre a presença da CHX e a manutenção do efeito antimicrobiano residual. A avaliação desse efeito sobre dentes contaminados com *E. faecalis* também comprovou a eficácia antimicrobiana da CHX, afinal, houve a ação da solução sobre o espécime previamente contaminado e a manutenção do percentual reduzido de células viáveis. Fica como perspectiva a definição de um protocolo capaz de compensar sua incapacidade de dissolução de matéria orgânica.

## 5. CONCLUSÕES

- A presença do biofilme de *Enterococcus faecalis* sobre a dentina não interferiu na retenção da solução de clorexidina a 2%.
- A quantificação através de cromatografia líquida de alta eficiência permitiu avaliar a presença da clorexidina na dentina humana contaminada nos períodos de 48 horas e 7 dias.
- A solução de clorexidina a 2% foi capaz de manter reduzido o percentual de microrganismos viáveis pelo período de 48 horas e de 7 dias.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAS, J. A. et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 11, p. 5721-32, Nov 2005. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16272510> >.

ATHANASSIADIS, B.; ABBOTT, P. V.; WALSH, L. J. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. **Aust Dent J**, v. 52, n. 1 Suppl, p. S64-82, Mar 2007. ISSN 0045-0421. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17546863> >.

BAILÓN-SÁNCHEZ, M. E. et al. Antibacterial and anti-biofilm activity of AH plus with chlorhexidine and cetrimide. **J Endod**, v. 40, n. 7, p. 977-81, Jul 2014. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24935547> >.

BAKER, P. J. et al. Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form. **J Periodontol**, v. 54, n. 10, p. 580-5, Oct 1983. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6580410> >.

\_\_\_\_\_. Susceptibility of human oral anaerobic bacteria to antibiotics suitable for topical use. **J Clin Periodontol**, v. 12, n. 3, p. 201-8, Mar 1985. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3856575> >.

BASRANI, B. R. et al. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. **J Endod**, v. 33, n. 8, p. 966-9, Aug 2007. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17878084> >.

BAUMGARTNER, J. C.; FALKLER, W. A. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. **J Endod**, v. 17, n. 8, p. 380-3, Aug 1991. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1809801> >.

BECKING, A. G. Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. Report of three cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 71, n. 3, p. 346-8, Mar 1991. ISSN 0030-4220. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2011360> >.

BELTZ, R. E.; TORABINEJAD, M.; POURESMAIL, M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. **J Endod**, v. 29, n. 5, p. 334-7, May 2003. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12775005> >.

BERBER, V. B. et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. **Int Endod J**, v. 39, n. 1, p. 10-7, Jan 2006. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16409323> >.

BYSTROM, A.; CLAEISSON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endod Dent Traumatol**, v. 1, n. 5, p. 170-5, Oct 1985. ISSN 0109-2502. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3865763> >.

BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 55, n. 3, p. 307-12, Mar 1983. ISSN 0030-4220. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6572884> >.

CARSON, K. R.; GOODELL, G. G.; MCCLANAHAN, S. B. Comparison of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. **J Endod**, v. 31, n. 6, p. 471-3, Jun 2005. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15917691> >.

CECCHIN, D. et al. Effect of chlorhexidine and ethanol on the durability of the adhesion of the fiber post relined with resin composite to the root canal. **J Endod**, v. 37, n. 5, p. 678-83, May 2011a. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21496670> >.

\_\_\_\_\_. Influence of chlorhexidine and ethanol on the bond strength and durability of the adhesion of the fiber posts to root dentin using a total etching adhesive system. **J Endod**, v. 37, n. 9, p. 1310-5, Sep 2011b. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21846556> >.

CHHABRA, R. S. et al. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. **Food Chem Toxicol**, v. 29, n. 2, p. 119-24, Feb 1991. ISSN 0278-6915.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2010141> >.

CHÁVEZ DE PAZ, L. E. et al. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. **Int Endod J**, v. 40, n. 5, p. 344-55, May 2007. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17326786> >.

\_\_\_\_\_. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. **Int Endod J**, v. 36, n. 7, p. 500-8, Jul 2003. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12823706> >.

CHONG, B. S.; PITT FORD, T. R. The role of intracanal medication in root canal treatment. **Int Endod J**, v. 25, n. 2, p. 97-106, Mar 1992. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1399059> >.

CIARDI, J. E. et al. Adsorption of *Streptococcus mutans* lipoteichoic acid to hydroxyapatite. **Scand J Dent Res**, v. 85, n. 6, p. 387-91, Sep 1977. ISSN 0029-845X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/271337> >.

CINTRA, L. T. et al. The use of NaOCl in combination with CHX produces cytotoxic product. **Clin Oral Investig**, v. 18, n. 3, p. 935-40, Apr 2014. ISSN 1436-3771. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23892500> >.

DAMETTO, F. R. et al. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 99, n. 6, p. 768-72, Jun 2005. ISSN 1528-395X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15897866> >.

DELGADO, R. J. et al. Antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on intratubular *Candida albicans*. **Int J Oral Sci**, v. 5, n. 1, p. 32-6, Mar 2013. ISSN 1674-2818. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23538639> >.

DISTEL, J. W.; HATTON, J. F.; GILLESPIE, M. J. Biofilm formation in medicated root canals. **J Endod**, v. 28, n. 10, p. 689-93, Oct 2002. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12398165> >.

>.

DO PRADO, M.; SIMÃO, R. A.; GOMES, B. P. Evaluation of different irrigation protocols concerning the formation of chemical smear layer. **Microsc Res Tech**, v. 76, n. 2, p. 196-200, Feb 2013. ISSN 1097-0029. Disponível em: < [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23225234](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23225234) >.

ELDENIZ, A. U.; GUNESER, M. B.; AKBULUT, M. B. Comparative antifungal efficacy of light-activated disinfection and octenidine hydrochloride with contemporary endodontic irrigants. **Lasers Med Sci**, Jul 2013. ISSN 1435-604X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23884903> >.

ERCAN, E. et al. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. **J Endod**, v. 30, n. 2, p. 84-7, Feb 2004. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14977302> >.

ESTRELA, C. et al. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. **Int Endod J**, v. 40, n. 2, p. 85-93, Feb 2007. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17229112> >.

FARDAL, O.; TURNBULL, R. S. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. **J Am Dent Assoc**, v. 112, n. 6, p. 863-9, Jun 1986. ISSN 0002-8177. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2940282> >.

FERRAZ, C. C. et al. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **J Endod**, v. 27, n. 7, p. 452-5, Jul 2001. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11503994> >.

FERRER-LUQUE, M. C. et al. Residual activity of cetrimide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. **Int J Oral Sci**, v. 6, n. 1, p. 46-9, Mar 2014. ISSN 1674-2818. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24357857> >.

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. ISSN 0902-0055. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12823799> >.

FOLEY, D. B. et al. Effectiveness of selected irrigants in the elimination of *Bacteroides melaninogenicus* from the root canal system: an in vitro study. **J Endod**, v. 9, n. 6, p. 236-41, Jun 1983. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6138387> >.

GARCIA, F. et al. Effect of Aquatine Endodontic Cleanser on smear layer removal in the root canals of ex vivo human teeth. **J Appl Oral Sci**, v. 18, n. 4, p. 403-8, 2010 Jul-Aug 2010. ISSN 1678-7765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20835577> >.

GENDRON, R. et al. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 6, n. 3, p. 437-9, May 1999. ISSN 1071-412X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10225852> >.

GOMES, B. P. et al. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **Int Endod J**, v. 34, n. 6, p. 424-8, Sep 2001. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11556507> >.

GOMES, B. P.; LILLEY, J. D.; DRUCKER, D. B. Clinical significance of dental root canal microflora. **J Dent**, v. 24, n. 1-2, p. 47-55, 1996 Jan-Mar 1996a. ISSN 0300-5712. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8636492> >.

\_\_\_\_\_. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. **Int Endod J**, v. 29, n. 4, p. 235-41, Jul 1996b. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9206439> >.

GOMES, B. P. et al. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, n. 2, p. 71-6, Apr 2004. ISSN 0902-0055. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14871344> >.

\_\_\_\_\_. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed



canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. **Int Endod J**, v. 36, n. 9, p. 604-9, Sep 2003. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12950574> >.

\_\_\_\_\_. 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. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12702121> >.

GREENSTEIN, G.; BERMAN, C.; JAFFIN, R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. **J Periodontol**, v. 57, n. 6, p. 370-7, Jun 1986. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3522851> >.

HAAPASALO, M. et al. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. **Endodontic Topics**, v. 10, p. 31, 2005.

HAAPASALO, M. et al. Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. **Infect Immun**, v. 53, n. 1, p. 149-53, Jul 1986. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3721577> >.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 2, p. 95-108, Feb 2004. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040259> >.

HAUMAN, C. H.; LOVE, R. M. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. **Int Endod J**, v. 36, n. 2, p. 75-85, Feb 2003. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12657150> >.

HELING, I. et al. Efficacy of a sustained-release device containing chlorhexidine and Ca(OH)<sub>2</sub> in preventing secondary infection of dentinal tubules. **Int Endod J**, v. 25, n. 1, p. 20-4, Jan 1992. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1399050> >.

HENNESSEY, T. S. Some antibacterial properties of chlorhexidine. **J Periodontal Res Suppl**, v. 12, p. 61-7, 1973. ISSN 0075-4331. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4269602> >.

HONG, B. Y. et al. Microbial analysis in primary and persistent endodontic infections by using pyrosequencing. **J Endod**, v. 39, n. 9, p. 1136-40, Sep 2013. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23953286> >.

HÜLSMANN, M.; HAHN, W. Complications during root canal irrigation--literature review and case reports. **Int Endod J**, v. 33, n. 3, p. 186-93, May 2000. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11307434> >.

HUYCKE, M. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. S. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerg Infect Dis**, v. 4, n. 2, p. 239-49, 1998 Apr-Jun 1998. ISSN 1080-6040. Disponível em: < [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9621194](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9621194) >.

JEANSONNE, M. J.; WHITE, R. R. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. **J Endod**, v. 20, n. 6, p. 276-8, Jun 1994. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7931023> >.

JENKINSON, H. F.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Biofilms adhere to stay. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 1, p. 9-10, Jan 2001. ISSN 0966-842X. Disponível em: < [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11252255](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11252255) >.

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. ISSN 0030-4220. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 14342926](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14342926) >.

KANTZ, W. E.; HENRY, C. A. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. **Arch Oral Biol**, v. 19, n. 1, p. 91-6, Jan 1974. ISSN 0003-9969. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ pubmed/4522935](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4522935) >.

KEENAN, A. V. No evidence favouring one irrigant versus another in root canal treatments. **Evid Based Dent**, v. 13, n. 4, p. 107, 2012. ISSN 1476-5446. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23258174> >.

KHADEMI, A. A.; MOHAMMADI, Z.; HAVAEE, A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. **Aust Endod J**, v. 32, n. 3, p. 112-5, Dec 2006. ISSN 1329-1947. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17201752> >.

KOMOROWSKI, R. et al. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. **J Endod**, v. 26, n. 6, p. 315-7, Jun 2000. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11199744> >.

KRISHNAMURTHY, S.; SUDHAKARAN, S. Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. **J Endod**, v. 36, n. 7, p. 1154-7, Jul 2010. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20630289> >.

KRISTICH, C. J. et al. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **J Bacteriol**, v. 186, n. 1, p. 154-63, Jan 2004. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679235> >.

LENET, B. J. et al. Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. **J Endod**, v. 26, n. 11, p. 652-5, Nov 2000. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11469294> >.

LEONARDO, M. R. et al. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. **J Endod**, v. 25, n. 3, p. 167-71, Mar 1999. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10321180> >.

LIN, S. et al. Antibacterial efficacy of a new chlorhexidine slow release device to disinfect dentinal tubules. **J Endod**, v. 29, n. 6, p. 416-8, Jun 2003. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12814228> >.

LLEÒ, M. M. et al. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. **J Appl Microbiol**, v. 91, n. 6, p. 1095-102, Dec 2001. ISSN 1364-5072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11851818> >.

LOVE, R. M. The effect of tissue molecules on bacterial invasion of dentine.

**Oral Microbiol Immunol**, v. 17, n. 1, p. 32-7, Feb 2002. ISSN 0902-0055. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860553> >.

MAGRO, M. G. et al. Effectiveness of several solutions to prevent the formation of precipitate due to the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine and its effect on bond strength of an epoxy-based sealer. **Int Endod J**, Jun 2014. ISSN 1365-2591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24962548> >.

MENEZES, M. M. et al. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. **Int Endod J**, v. 37, n. 5, p. 311-9, May 2004. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15086752> >.

MERCADE, M. et al. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 107, n. 2, p. 295-8, Feb 2009. ISSN 1528-395X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19071035> >.

MOHAMED, J. A. et al. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on bio,ilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infect Immun**, v. 72, n. 6, p. 3658-63, Jun 2004. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155680> >.

MOHAMMADI, Z.; ABBOTT, P. V. Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: a review. **Aust Endod J**, v. 35, n. 3, p. 131-9, Dec 2009a. ISSN 1747-4477. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19961451> >.

\_\_\_\_\_. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. **Int Endod J**, v. 42, n. 4, p. 288-302, Apr 2009b. ISSN 1365-2591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19220510> >.

MOHAMMADI, Z.; SHALAVI, S. Is chlorhexidine an ideal vehicle for calcium hydroxide? A microbiologic review. **Iran Endod J**, v. 7, n. 3, p. 115-22, 2012. ISSN 2008-2746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23056129> >.

MOLANDER, A. et al. Clinical and radiographic evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of asymptomatic necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized clinical trial. **J Endod**, v. 33, n. 10, p. 1145-8, Oct 2007. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17889679> >.

MÖLLER, A. J. et al. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scand J Dent Res**, v. 89, n. 6, p. 475-84, Dec 1981. ISSN 0029-845X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6951246> >.

MOREIRA, D. M. et al. Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. **J Endod**, v. 35, n. 7, p. 1023-7, Jul 2009. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19567327> >.

MOZAYENI, M. A. et al. Antimicrobial effects of four intracanal medicaments on enterococcus faecalis: an in vitro study. **Iran Endod J**, v. 9, n. 3, p. 195-8, 2014. ISSN 1735-7497. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25031593> >.

MUNSON, M. A. et al. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. **J Dent Res**, v. 81, n. 11, p. 761-6, Nov 2002. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407091> >.

MURAD, C. F. et al. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. **J Endod**, v. 40, n. 7, p. 899-906, Jul 2014. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24935532> >.

NAENNI, N.; THOMA, K.; ZEHNDER, M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. **J Endod**, v. 30, n. 11, p. 785-7, Nov 2004. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15505511> >.

NAKAJO, K. et al. Alkali-resistant bacteria in root canal systems. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, n. 6, p. 390-4, Dec 2004. ISSN 0902-0055. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15491465> >.

NASSAR, M. et al. Adhesion of Epiphany self-etch sealer to dentin treated with intracanal irrigating solutions. **J Endod**, v. 37, n. 2, p. 228-30, Feb 2011. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21238807> >.

OLIVEIRA, D. P. et al. In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 103, n. 5, p. 702-6, May 2007. ISSN 1528-395X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368057> >.

ORDINOLA-ZAPATA, R. et al. Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral-infected dentin bio,ilm model. **J Endod**, v. 39, n. 1, p. 115-8, Jan 2013. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23228269> >.

PAIVA, S. S. et al. Supplementing the antimicrobial effects of chemomechanical debridement with either passive ultrasonic irrigation or a final rinse with chlorhexidine: a clinical study. **J Endod**, v. 38, n. 9, p. 1202-6, Sep 2012. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22892736> >.

PECIULIENE, V. et al. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. **Int Endod J**, v. 34, n. 6, p. 429-34, Sep 2001. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11556508> >.

PENAS, P. P. et al. Analysis of genetic lineages and their correlation with virulence genes in *Enterococcus faecalis* clinical isolates from root canal and systemic infections. **J Endod**, v. 39, n. 7, p. 858-64, Jul 2013. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23791252> >.

PEREIRA, M. S. et al. Response of mice connective tissue to intracanal dressings containing chlorhexidine. **Microsc Res Tech**, v. 75, n. 12, p. 1653-8, Dec 2012. ISSN 1097-0029. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22887775> >.

PINHEIRO, E. T. et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Int Endod J**, v. 36, n. 1, p. 1-11, Jan 2003. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12656508> >.

RAMACHANDRAN NAIR, P. N. Light and electron microscopic studies of root canal ,lora and periapical lesions. **J Endod**, v. 13, n. 1, p. 29-39, Jan 1987. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3469299> >.

RINCÉ, A. et al. Physiological and molecular aspects of bile salt response in *Enterococcus faecalis*. **Int J Food Microbiol**, v. 88, n. 2-3, p. 207-13, Dec 2003. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14596992> >.

RÔÇAS, I. N. et al. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-,illed teeth in a South Korean population. **J Endod**, v. 30, n. 7, p. 504-8, Jul 2004. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15220647> >.

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA, J. F. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. **J Endod**, v. 37, n. 2, p. 143-50, Feb 2011. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21238793> >.

\_\_\_\_\_. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with post treatment disease. *J Clin Microbiol*, v. 50, n. 5, p. 1721-4, May 2012. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22403423> >.

RÔÇAS, I. N. et al. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 98, n. 6, p. 741-9, Dec 2004. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15583550> >.

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA, J. F.; SANTOS, K. R. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J Endod**, v. 30, n. 5, p. 315-20, May 2004. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15107642> >.

ROSENTHAL, S.; SPÅNGBERG, L.; SAFAVI, K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.

98, n. 4, p. 488-92, Oct 2004. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15472666> >.

SAFAVI, K. E.; NICHOLS, F. C. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. **J Endod**, v. 19, n. 2, p. 76-8, Feb 1993. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8509740> >.

SAKAMOTO, M. et al. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. **Oral Microbiol Immunol**, v. 21, n. 2, p. 112-22, Apr 2006. ISSN 0902-0055. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476021> >.

\_\_\_\_\_. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. **Oral Microbiol Immunol**, v. 23, n. 4, p. 275-81, Aug 2008. ISSN 1399-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18582326> >.

SANTOS, J. N. et al. Effect of chemical irrigants on the bond strength of a self-etching adhesive to pulp chamber dentin. **J Endod**, v. 32, n. 11, p. 1088-90, Nov 2006. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055913> >.

SEDGLEY, C.; BUCK, G.; APPELBE, O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. **J Endod**, v. 32, n. 2, p. 104-9, Feb 2006. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16427455> >.

SEDGLEY, C. et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. **J Endod**, v. 32, n. 3, p. 173-7, Mar 2006. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16500220> >.

SEET, A. N. et al. Qualitative comparison of sonic or laser energisation of 4% sodium hypochlorite on an *Enterococcus faecalis* biofilm grown in vitro. **Aust Endod J**, v. 38, n. 3, p. 100-6, Dec 2012. ISSN 1747-4477. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211068> >.

SENA, N. T. et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. **Int Endod J**, v. 39, n.



11, p. 878-85, Nov 2006. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17014526> >.

SEOL, J. H. et al. Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. **J Endod**, v. 32, n. 2, p. 110-4, Feb 2006. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16427456> >.

SHAHRIARI, S. et al. Effect of hydrogen peroxide on the antibacterial substantivity of chlorhexidine. **Int J Dent**, v. 2010, p. 946384, 2010. ISSN 1687-8736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21318180> >.

SHARIFIAN, M. R. et al. In vitro comparison of the effectiveness of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations on enterococcus faecalis. **Iran Endod J**, v. 3, n. 3, p. 50-6, 2008. ISSN 1735-7497. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24146671> >.

SINHA, N. et al. Evaluation of antimicrobial efficacy of calcium hydroxide paste, chlorhexidine gel, and a combination of both as intracanal medicament: An in vivo comparative study. **J Conserv Dent**, v. 16, n. 1, p. 65-70, Jan 2013. ISSN 0972-0707. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23349580> >.

SIQUEIRA, J. F. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 94, n. 3, p. 281-93, Sep 2002. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12324780> >.

SIQUEIRA, J. F. et al. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. **J Endod**, v. 24, n. 6, p. 414-6, Jun 1998. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9693585> >.

SIQUEIRA, J. F.; RÔÇAS, I. N. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 97, n. 1, p. 85-94, Jan 2004a. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14716262> >.

\_\_\_\_\_. Treponema species associated with abscesses of endodontic origin. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, n. 5, p. 336-9, Oct 2004b. ISSN 0902-0055. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15327648> >.

\_\_\_\_\_. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2-- Redefining the endodontic microbiota. **J Endod**, v. 31, n. 7, p. 488-98, Jul 2005. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980706> >.

SIQUEIRA, J. F. et al. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. **J Endod**, v. 27, n. 9, p. 563-6, Sep 2001. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11556558> >.

SIQUEIRA, J. F.; SEN, B. H. Fungi in endodontic infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 97, n. 5, p. 632-41, May 2004. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15153878>>.

SIQUEIRA, J. F.; RÔÇAS, I. N. Diversity of endodontic microbiota revisited. **J Dent Res**, v. 88, n. 11, p. 969-81, Nov 2009. ISSN 1544-0591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19828883> >.

SIRTES, G. et al. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. **J Endod**, v. 31, n. 9, p. 669-71, Sep 2005. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16123703> >.

SJÖGREN, U. et al. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. **Int Endod J**, v. 24, n. 3, p. 119-25, May 1991. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1778624> >.

SOUZA, M. et al. Evaluation of chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. **J Endod**, v. 38, n. 9, p. 1249-52, Sep 2012. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22892744> >.

STEINBERG, D. et al. Antibacterial synergistic effect of chlorhexidine and hydrogen peroxide against Streptococcus sobrinus, Streptococcus faecalis and Staphylococcus aureus. **J Oral Rehabil**, v. 26, n. 2, p. 151-6, Feb 1999. ISSN 0305-182X. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10080313> >.

STUART, C. H. et al. Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **J Endod**, v. 32, n. 2, p. 93-8, Feb 2006. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16427453> >.

SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **J Endod**, v. 18, n. 9, p. 427-30, Sep 1992. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9796509> >.

\_\_\_\_\_. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 78, n. 4, p. 522-30, Oct 1994. ISSN 0030-4220. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7800383> >.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 85, n. 1, p. 86-93, Jan 1998. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9474621> >.

SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, E.; SJÖGREN, U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. **J Endod**, v. 15, n. 1, p. 13-9, Jan 1989. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2607261> >.

TANOMARU FILHO, M. et al. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. **Int Endod J**, v. 35, n. 9, p. 735-9, Sep 2002. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12449023> >.

VAN DER WAAL, S. V. et al. The effects of hyperosmosis or high pH on a dual-species biofilm of Enterococcus faecalis and Pseudomonas aeruginosa: an in vitro study. **Int Endod J**, v. 44, n. 12, p. 1110-7, Dec 2011. ISSN 1365-2591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21859433> >.

VAN WINKELHOFF, A. J.; CARLEE, A. W.; DE GRAAFF, J. Bacteroides endodontalis and other black-pigmented Bacteroides species in odontogenic abscesses. **Infect Immun**, v. 49, n. 3, p. 494-7, Sep 1985. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4030089> >.

VIANNA, M. E. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of

chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 97, n. 1, p. 79-84, Jan 2004. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14716261> >.

\_\_\_\_\_. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J*, v. 39, n. 6, p. 484-92, Jun 2006. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16674744> >.

VIDANA, R. et al. Enterococcus faecalis infection in root canals - host-derived or exogenous source? **Lett Appl Microbiol**, v. 52, n. 2, p. 109-15, Feb 2011. ISSN 1472-765X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21155997> >.

VIVACQUA-GOMES, N. et al. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. **Int Endod J**, v. 35, n. 9, p. 791-5, Sep 2002. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12449031> >.

WAAR, K. et al. Enterococcus faecalis surface proteins determine its adhesion mechanism to bile drain materials. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 6, p. 1863-70, Jun 2002. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055306> >.

WALTIMO, T. M. et al. In vitro susceptibility of Candida albicans to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J*, v. 32, n. 6, p. 421-9, Nov 1999. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10709489> >.

WANG, L. et al. Relationship of biofilm formation and gelE gene expression in Enterococcus faecalis recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. **J Endod**, v. 37, n. 5, p. 631-6, May 2011. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21496662> >.

WANG, Z.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old Enterococcus faecalis biofilms in dentin canals. **J Endod**, v. 38, n. 10, p. 1376-9, Oct 2012. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22980181> >.

WATERS, C. M. et al. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. **J Bacteriol**, v. 185, n. 12, p. 3613-23, Jun 2003. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12775699> >.

WEBER, C. D. et al. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. **J Endod**, v. 29, n. 9, p. 562-4, Sep 2003. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14503827> >.

WHITE, R. R.; HAYS, G. L.; JANER, L. R. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. **J Endod**, v. 23, n. 4, p. 229-31, Apr 1997. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9594771> >.

WILLIAMS, J. M. et al. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. **J Endod**, v. 32, n. 8, p. 715-21, Aug 2006. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16861068> >.

WITTGOW, W. C.; SABISTON, C. B. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. **J Endod**, v. 1, n. 5, p. 168-71, May 1975. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1061795> >.

YESILSOY, C. et al. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. **J Endod**, v. 21, n. 10, p. 513-5, Oct 1995. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8596073> >.

ZAMANY, A.; SAFAVI, K.; SPÅNGBERG, L. S. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 96, n. 5, p. 578-81, Nov 2003. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14600693> >.

ZEHNDER, M. Root canal irrigants. **J Endod**, v. 32, n. 5, p. 389-98, May 2006. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16631834> >.

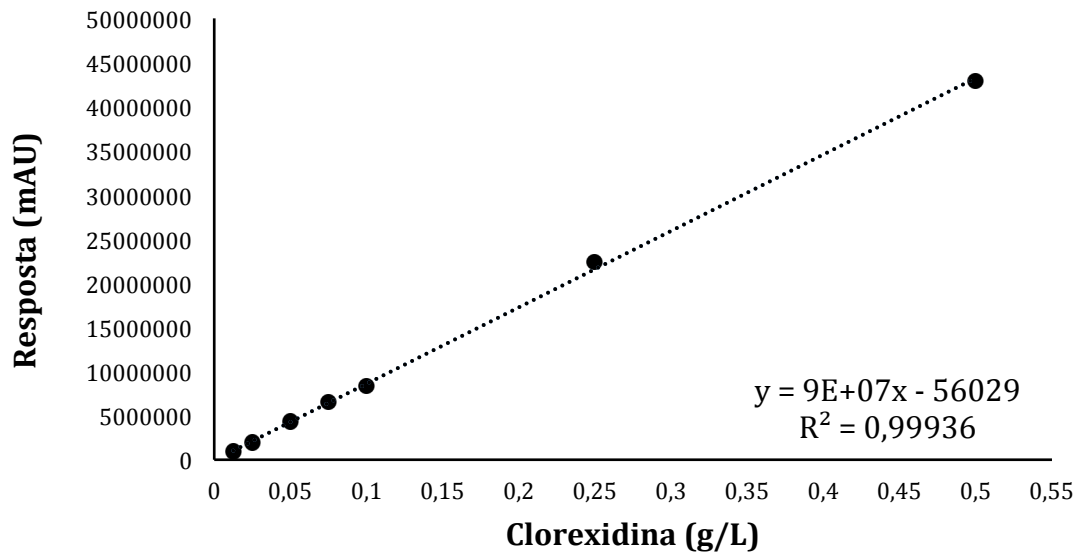
ZEHNDER, M.; GUGGENHEIM, B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. **Int Endod J**, v. 42, n. 4, p. 277-87, Apr 2009. ISSN 1365-2591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19220511> >.

ZOLETTI, G. O.; SIQUEIRA, J. F.; SANTOS, K. R. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture- dependent and-independent approaches. **J Endod**, v. 32, n. 8, p. 722-6, Aug 2006. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16861069> >.

## 7. APÊNDICE

### Resumo dos estudos que avaliam o efeito antimicrobiano residual da clorexidina (CHX).

Autores (ano)	Amostra (n)	Grupos Experimentais	Tempo de aplicação da substância	Períodos de avaliação	Metodologia de Avaliação	Conclusão
White et al. (1997)	Dentes humanos extraídos (44)	Solução de CHX a 2%; Solução de CHX a 0,12%; Água deionizada esterilizada	Durante o PQM	6, 12, 24, 48 e 72 horas após o PQM	Halo de inibição	Os resultados demonstram que a substância da CHX é mantida após 72 horas.
Leonardo et al. (1999)	Dentes humanos com necrose pulpar e lesão periapical (22)	Solução de CHX a 2%	Durante o PQM	Antes do PQM e 48 horas após	Contagem de UFC e avaliação do halo de inibição	A CHX apresentou efeito residual após 48 horas do seu uso.
Komorowski et al. (2000)	Dentina bovina (60)	Soro; CHX 0,2%; NaOCl 5,25%	5 minutos; 7 dias	21 dias	Avaliação do crescimento bacteriano através da densidade óptica	Autores recomendam o uso da CHX 0,2% como medicação intracanal pelo período de 7 dias.
Ercan et al. (2004)	Dentes humanos com necrose pulpar (30)	Solução de CHX a 2%; NaOCl 5,25%	Durante o PQM	Antes, imediatamente após e 48 horas após o PQM	Contagem de UFC	Autores concluem a CHX é uma alternativa ao uso do NaOCl.
Rosenthal et al. (2004)	Dentes bovinos (60)	Solução de CHX a 2%; Solução salina.	10 minutos	1 dia, 3, 6 e 12 semanas	Espectrometria e contagem de UFC	O uso da CHX é considerado vantajoso.
Dametto et al. (2005)	Dentes humanos extraídos (80)	Solução de CHX a 2%; Gel de CHX a 2%; NaOCl 5,25%; Água destilada; Gel de naitrosol	Durante o PQM	Antes do PQM, imediatamente após o PQM e 7 dias após o PQM	Contagem de UFC	A solução e o gel de CHX podem ser usados como auxiliares químicos durante o preparo do canal radicular.
Khademi et al. (2006)	Dentina bovina contaminada (80)	Solução de CHX a 2%; NaOCl 2,6%; Doxiciclina	5 minutos	Imediatamente, 7, 14, 21 e 28 dias após o contato com a solução	Contagem de UFC	A substância da CHX apresentada pela CHX foi maior que a da Doxiciclina e se manteve pelos 28 dias.
Souza et al. (2012)	Dentes humanos extraídos (45)	Solução de CHX a 2%; Gel de CHX a 2%; Água destilada	Durante o PQM	24 horas, 30 e 90 dias	HPLC	A CHX se manteve retida no canal radicular após 90 dias da sua aplicação.
Ferrer-Luque et al. (2014)	Dentes humanos extraídos contaminados (86)	Solução de CHX a 2%; Solução de CHX a 0,2%; Cetrimida a 0,2%	1 minuto	Imediatamente e diariamente durante 50 dias após o contato com a solução	Avaliação da turbidez do meio após 24 horas da coleta	A CHX a 2% apresentou maior efeito residual em dentes contaminados por <i>E. Faecalis</i> .



Curva de calibração da CHX para análise no HPLC.



ANEXOS:

Anexo 1

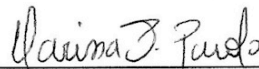
Porto Alegre, novembro de 2013.

### AUTORIZAÇÃO DO USO DE DEPENDÊNCIAS DE LABORATÓRIO

À Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia-UFRGS

Autorizo, pelo presente, que as dependências do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS por mim coordenadas sejam utilizadas pela pesquisadora Daiana Elisabeth Böttcher com a finalidade de conduzir experimentos necessários ao projeto intitulado "Avaliação do efeito da presença do biofilme de *Enterococcus faecalis* no canal radicular sobre a manutenção da substantividade da clorexidina a 2%: estudo *in vitro*".

Atenciosamente,



Profa. Dra. Clarissa Fatturi Parolo

Clarissa Parolo  
Professora - UFRGS  
CRO-RS 11384

## Anexo 2

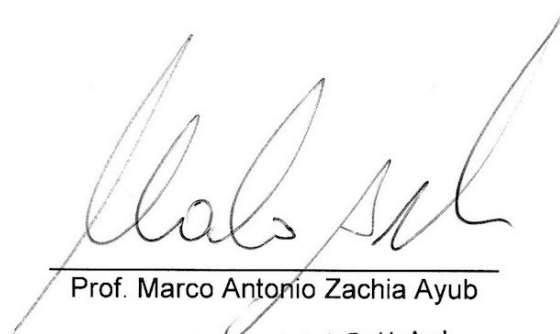
Porto Alegre, 30 de abril de 2014.

### AUTORIZAÇÃO DO USO DE DEPENDÊNCIAS DE LABORATÓRIO

À Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia-UFRGS

Autorizo, pelo presente, que as dependências do Laboratório Analítico Multiusuário do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS por mim coordenadas sejam utilizadas pela pesquisadora Daiana Elisabeth Böttcher com a finalidade de conduzir experimentos necessários ao projeto intitulado "Avaliação do efeito da presença do biofilme de *Enterococcus faecalis* no canal radicular sobre a manutenção da substantividade da clorexidina a 2%: estudo *in vitro*".

Atenciosamente,



Prof. Marco Antonio Zachia Ayub

Prof. Dr. Marco Antonio Zachia Ayub

Coordenador do PPGCTA- UFRGS  
Matricula SIAPE : 0358875

## Anexo 3




Porto Alegre, 06 de maio de 2014.

### AUTORIZAÇÃO

O projeto intitulado "Avaliação do efeito da presença do biofilme de *Enterococcus faecalis* no canal radicular sobre a manutenção da substantividade da clorexidina a 2%: estudo *in vitro*", coordenado por Fabiana Soares Grecca e Daiana Elisabeth Böttcher, da Faculdade de Odontologia da UFRGS, está aprovado para uso do microscópio eletrônico de varredura e do microscópio confocal do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Atenciosamente,

Centro de Microscopia Eletrônica  
CME/UFRGS  
  
Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma  
-Diretora

Anexo 4

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Sr.(a),

Como é de seu conhecimento, existe a indicação terapêutica para a extração do(s) seu(s) dente(s) \_\_\_\_\_, com o propósito de melhorar sua saúde, conforme registro no prontuário.

Estamos realizando uma pesquisa intitulada: “Avaliação do efeito da presença do biofilme de *Enterococcus faecalis* no canal radicular sobre a manutenção da substantividade da clorexidina a 2%: estudo *in vitro*”, que tem como objetivo avaliar, em dentes humanos extraídos e contaminados com *Enterococcus faecalis*, a manutenção do efeito antimicrobiano da substantividade da clorexidina gel e líquida a 2% após o tratamento endodôntico. Com a realização deste trabalho, espera-se justificar o uso da clorexidina como irrigante no tratamento dos canais radiculares.

Este estudo será realizado em um laboratório com dentes humanos já extraídos. Para que seja possível este experimento, necessitamos da doação de dentes com extração indicada. Serão selecionados para a pesquisa dentes com um canal radicular de pacientes na faixa etária entre 20 e 35 anos. Serão excluídos os dentes que apresentarem tratamento endodôntico, presença de calcificações ou curvaturas radiculares. Além disso, após a extração, as superfícies radiculares serão avaliadas quanto à presença de linhas de fratura ou irregularidades anatômicas, sendo excluídas do estudo, caso apresentem alguma destas características.

Estando o dente enquadrado nos critérios de inclusão, pretendemos utilizá-lo para a pesquisa citada acima. Desta forma, esta pesquisa não causará danos ou desconforto a você, paciente, além daqueles provocados pelo procedimento cirúrgico a que foi indicado.

Pelo presente termo, que atende às exigências legais, o(a) Sr.(a)

---

está ciente da indicação da extração do seu dente, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado. Firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em doar o referido dente à pesquisa informada. Esses dentes serão utilizados na pesquisa somente após certificação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro; Fone: 51 33083738). Salienta-se também que a identidade do doador do dente será mantida sob sigilo.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo e/ou sobre o órgão doado, poderá solicitar informações ao Comitê de Ética da UFRGS (51 33083738) ou com o pesquisador responsável por esta pesquisa Prof. Dra. Fabiana Soares Grecca (51 33085191 – fabiana.grecca@ufrgs.br).

Finalmente, ressaltamos que caso o(a) Sr.(a) não concorde em doar o dente para a pesquisa, não haverá qualquer interferência em seu atendimento odontológico.

Desde já agradecemos a atenção.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

---

Assinatura do doador ou responsável

---

Assinatura e número do CRO do CD responsável pelo atendimento

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES HUMANOS**

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG \_\_\_\_\_, residente à \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
número/complemento \_\_\_\_\_, aceito doar o meu dente \_\_\_\_\_ e concordo em doá-lo à pesquisa intitulada “Avaliação do efeito da presença do biofilme de *Enterococcus faecalis* no canal radicular sobre a manutenção da substantividade da clorexidina a 2%: estudo *in vitro*”. Estou ciente de que o(s) dente foi extraído por indicação terapêutica para a melhoria da minha saúde, como documentado no prontuário da Faculdade. A pesquisa citada anteriormente deverá ter sido previamente aprovada pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia e, a seguir, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, sendo preservada a identidade do doador na divulgação dos resultados.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável

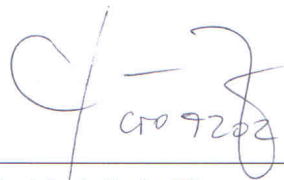
\_\_\_\_\_  
Testemunha

\_\_\_\_\_  
Testemunha

## Anexo 6

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ORTOPEDIA

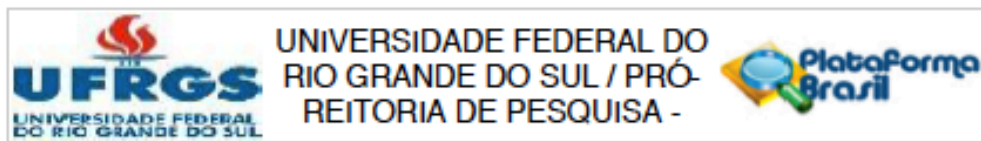
Declaro para os devidos fins que a pesquisadora Profa. Fabiana Soares Grecca e a estudante de doutorado, cirurgiã-dentista, Daiana Elisabeth Böttcher estão autorizadas a utilizar o Bloco de Cirurgia da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais I para a coleta de dentes humanos de pacientes com indicação de exodontia, depois de aceito e assinado o Termo de Doação de Material Biológico pelo paciente. Esse material biológico será utilizado na pesquisa intitulada "Avaliação do efeito da presença do biofilme de *Enterococcus faecalis* no canal radicular sobre a manutenção da substantividade da clorexidina a 2%: estudo *in vitro*".



Handwritten signature of Prof. João Julio da Cunha Filho, with the number 9202 written below it.

Prof. João Julio da Cunha Filho  
Regente da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais I

Porto Alegre, agosto de 2014.



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PRESENÇA DO BIOFILME DE ENTEROCOCCUS FAECALIS NO CANAL RADICULAR SOBRE A MANUTENÇÃO DA SUBSTANTIVIDADE DA CLOREXIDINA A 2%: ESTUDO IN VITRO.

**Pesquisador:** Fabiana Soares Grecca

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 33877414.0.0000.5347

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL/COMITÊ DE ÉTICA EM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 770.038

**Data da Relatoria:** 28/08/2014

**Apresentação do Projeto:**

Em atendimento à solicitação, os pesquisadores informaram que a pesquisa, que resultará em uma tese de doutorado, será desenvolvida em um período de até 18 meses, porém a elaboração do projeto teve início em julho/2013.

**Objetivo da Pesquisa:**

A pesquisa propõe avaliar, em dentes humanos extraídos e contaminados com Enterococcus faecalis, o efeito antimicrobiano residual da solução de clorexidina a 2%.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Na versão atual da redação dos riscos da pesquisa, os pesquisadores informam "a pesquisa não causará danos ou desconforto ao paciente além daqueles provocados pelo procedimento cirúrgico a que foi indicado".

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Na nova versão do projeto de pesquisa, é informado que as 187 raízes de dentes humanos com um canal radicular, ápices completos e anatomia semelhante serão obtidas de pacientes com idade entre 20 e 35 anos, os quais tiveram como indicação terapêutica a exodontia de seu elemento

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
**Bairro:** Farrowpilha **CEP:** 90.040-060  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 770.038

dental. Essas amostras serão coletadas pelo pesquisador, após a concordância do paciente, no Bloco de Cirurgia da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais da Faculdade de Odontologia da UFRGS, cujo termo de concordância devidamente assinado foi anexado.

Em atendimento à solicitação, os pesquisadores informaram que de cada um dos 60 dentes que pertencerão aos dois grupos experimentais serão obtidos dois espécimes que, junto com os seis dentes que serão utilizados como controle, totalizam os 126 espécimes necessários para a primeira etapa da pesquisa. Assim, foi justificado o número amostral da pesquisa, que é de 187 dentes, considerando os 124 da segunda etapa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Em atendimento às solicitações, foram anexados Termos de Concordância devidamente assinados dos seguintes locais: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, e Centro de Microscopia Eletrônica, ambos da UFRGS; Laboratório de Bioquímica e Microbiologia, e Bloco de Cirurgia da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais, ambos da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

O TCLE foi adequado. A nova versão apresenta os riscos da pesquisa, com texto conforme mostrado no item "Avaliação dos riscos e benefícios"; os critérios de inclusão e exclusão; a informação de que o projeto foi aprovado pelo CEP da UFRGS, acompanhado do endereço e número de telefone desse CEP; o nome do pesquisador responsável pela pesquisa, juntamente com número de telefone e e-mail do mesmo para contato; excluída a informação referente a autorização para coleta, depósito, armazenamento e utilização do dente extraído; e excluída a solicitação de número de CPF do doador.

**Recomendações:**

Como os pesquisadores atenderam as solicitações, recomenda-se aprovação do projeto de pesquisa.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto de pesquisa está adequado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
Bairro: Farróupilha CEP: 90.040-060  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propeq.ufrgs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-  
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 770.038

PORTO ALEGRE, 28 de Agosto de 2014

---

Assinado por:

**MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA**  
(Coordenador)