

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

**OTÁVIO DA SILVA SPOSITO**

**ANÁLISE DE PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE PASTA  
OBTURADORA COMPOSTA POR HIDRÓXIDO DE CÁLCIO, ÓXIDO DE ZINCO E  
GEL DE CLOREXIDINA 2%.**

**PORTO ALEGRE  
2017**

**OTÁVIO DA SILVA SPOSITO**

**ANÁLISE DE PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE PASTA  
OBTURADORA COMPOSTA POR HIDRÓXIDO DE CÁLCIO, ÓXIDO DE ZINCO E  
GEL DE CLOREXIDINA 2%.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Odontologia da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção  
do Título de Doutor em Odontologia, área de  
concentração em Clínica Odontológica/Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Montagner

PORTO ALEGRE

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Sposito, Otávio da Silva  
Análise de propriedades físico-químicas e biológicas  
de pasta obturadora composta por hidróxido de cálcio,  
óxido de zinco e gel de clorexidina 2%. / Otávio da  
Silva Sposito. -- 2017.

70 f.

Orientador: Francisco Montagner.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,  
2017.

1. obturação do canal radicular. 2. trauma dental.  
3. hidróxido de cálcio. 4. óxido de zinco. 5.  
clorexidina. I. Montagner, Francisco, orient. II.  
Título.

*Dedico este trabalho...*

*Aos meus amados pais Ataliba e Rosana,  
minha irmã Manuela,  
com todo amor e gratidão.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço a Deus por me proteger e me ajudar a seguir o meu caminho nunca perdendo a esperança.*

*Agradeço aos meus pais Ataliba e Rosana, por todos os ensinamentos e incentivos que me deram ao longo da vida. Obrigado por sempre estarem ao meu lado, me apoiando nas decisões a serem escolhidas me indicando o caminho certo a ser seguido. A vocês todo o amor, respeito e admiração.*

*Agradeço a minha irmã Manuela, pelo carinho, amizade e respeito em todos os momentos de minha vida, espero estar sempre presente na tua vida também.*

*Agradeço a todos meus familiares, em especial minhas avós Marli e Santa Terezinha e ao meu avô Elmo, um grande companheiro durante toda a minha vida.*

*Agradeço ao meu amigo e orientador, Professor Francisco Montagner, por todos os ensinamentos transmitidos, por toda a confiança depositada em mim, compreensão e dedicação, durante minha passagem na UFRGS você foi fundamental e pode ter certeza que és um exemplo a ser seguido de profissional e de ser humano, você tem toda minha admiração.*

*Agradeço as Professoras do Instituto de Química: Morgana Bazzan Dessuy e Maria Goreti Rodrigues Vale, por acreditarem e aceitarem meu convite para trabalharmos juntos neste projeto, obrigado pela ajuda e principalmente pela confiança deposita em mim.*

*Agradeço a minha colega de pós-graduação Letícia Mestieri que foi uma orientadora em parte deste trabalho, obrigado por todos os ensinamentos e paciência, este trabalho não seria possível sem a sua participação.*

*Agradeço a Professora Fabiana Grecca, por ter se disponibilizado a ajudar na realização deste trabalho, com certeza foi muito importante, obrigado pelos ensinamentos.*

*Agradeço a minha colega de pós-graduação Karen Barea de Paula, por ter participado na realização de parte deste trabalho.*

*Agradeço as minhas colegas de doutorado: Paula Silva, Naelka Sarmento, Carolina Hoppe, Daiana Boijink e Débora Delai. Obrigado por ter tido a possibilidade*

*de conhecer vocês e por terem participado junto comigo desta etapa de minha vida, criamos uma amizade ao longo destes anos que com certeza irei levar junto comigo.*

*Agradeço aos demais colegas de pós-graduação tanto de mestrado quanto de doutorado, obrigado por esses anos de parceria e aprendizado.*

*Agradeço ao grupo de Professores de Endodontia da UFRGS: João Ferlini Filho, Régis Burmeister dos Santos, Fabiana Grecca, Marcos Vinícius Reis Só, Patricia Kopper, Roberta Scarparo, Renata Grazziotin e Simone Luisi, por toda dedicação e transmissão de seus conhecimentos.*

*Agradeço ao Professor Rogério de Castilho Jacinto, que foi meu orientador na graduação e no mestrado, tornou-se um grande amigo, obrigado por todos os ensinamentos que me despertaram o gosto e a admiração pela Endodontia.*

*Agradeço meus amigos de longa data: Kauê Collares, Eduardo Neves, Thiago Faedo, Raul Real, Tiago Santos, Eduardo Gonçalves, Jean Machado, Murilo Luz, Rafael Souza, Daniel Costa e especialmente ao amigo Marcos Lamas que durante todos estes anos que estive em Porto Alegre sempre me recebeu da melhor forma possível. Obrigado por estarem sempre ao meu lado, que esta nossa amizade e convívio durem por toda nossa vida.*

*Agradeço a Faculdade de Odontologia da UFRGS por ser o local onde realizei minha especialização em Endodontia e agora estou realizando o sonho de ser Doutor em Odontologia.*

*Enfim, agradeço a todos os colegas e profissionais que contribuíram, torceram e acreditaram em mim. O meu Muito Obrigado.*

*“Sem sonhos, a vida não tem brilho.  
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.  
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.  
Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus  
sonhos.  
Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir!”*

**Augusto Cury**

## RESUMO

O trauma dental é uma das principais causas da reabsorção radicular. A reabsorção radicular é uma perda patológica progressiva da dentina e do cimento em um dente permanente, que pode ocorrer dentro do dente, ou na superfície externa do dente. Uma proposta de pasta obturadora densa, composta por  $\text{Ca(OH)}_2$ , gel de clorexidina 2% (CHX) e óxido de zinco (ZnO) vem sendo utilizada como protocolo para dentes com reabsorção radicular. Apesar das propriedades do  $\text{Ca(OH)}_2$ , CHX e ZnO serem amplamente estudadas de forma individual, há pouca informação na literatura sobre o mecanismo de ação da associação entre  $\text{Ca(OH)}_2$ , CHX e ZnO. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar propriedades biológicas e físico-químicas desta associação. Neste estudo foram analisadas as propriedades de: atividade antimicrobiana, radiopacidade, escoamento, liberação de íons cálcio, avaliação de pH, citotoxicidade, bioatividade e proliferação celular a partir de pastas intracanais, como segue: Natrosol; Natrosol + ZnO; Natrosol +  $\text{Ca(OH)}_2$ ; Natrosol + ZnO +  $\text{Ca(OH)}_2$ ; 2% CHX; 2% CHX + ZnO; 2% CHX +  $\text{Ca(OH)}_2$ ; 2% CHX + ZnO +  $\text{Ca(OH)}_2$ . Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Foi realizada uma análise estatística descritiva e inferencial. Os dados foram analisados estatisticamente, seguindo o teste de normalidade (teste de Shapiro-Wilk). A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA), com um nível de significância de 5%. O efeito antimicrobiano das pastas contra *E. faecalis* dependia da presença de CHX. Os halos de inibição mais elevados para *C. albicans* foram associados com  $\text{Ca(OH)}_2$  + CHX. Apenas as pastas com ZnO demonstraram uma radiopacidade superior a 3 mm Al, o  $\text{Ca(OH)}_2$  reduziu a radiopacidade das pastas contendo ZnO. As pastas que não continham  $\text{Ca(OH)}_2$  não liberaram íons de cálcio. Existe uma tendência para aumentar o pH até 14 dias. Os grupos com CHX apresentaram maior escoamento do que o natrosol quando misturados apenas com  $\text{Ca(OH)}_2$  ou ZnO. O teste de proliferação celular mostrou o fechamento contínuo da ferida de acordo com o tempo em todos os grupos avaliados, com exceção da CHX. Todos os grupos que continham  $\text{Ca(OH)}_2$  apresentaram maior formação de nódulos mineralizados de acordo com o tempo e uma atividade enzimática aumentada, exceto para o grupo CHX. Todos os grupos que continham Natrosol na sua composição apresentaram resultados acima ou próximos da linha de controle para a citotoxicidade. O grupo CHX apresentou uma taxa de viabilidade inferior a 50%, mas quando acompanhado de  $\text{Ca(OH)}_2$  ou ZnO mostrou taxas de viabilidade semelhantes às da linha de controle. Concluiu-se que a pasta obturadora composta por CHX + ZnO +  $\text{Ca(OH)}_2$  demonstrou efeitos biológicos favoráveis, como bioatividade, citotoxicidade e proliferação celular e mostrou a liberação de  $\text{Ca}^+$ , alto pH, atividade antimicrobiana principalmente devido à presença de CHX e  $\text{Ca(OH)}_2$ .

**Palavras-Chave:** Endodontia, obturação do canal radicular, hidróxido de cálcio, óxido de zinco, clorexidina, trauma dental.



## ABSTRACT

Dental trauma is a major cause of root resorption. Root resorption is a pathological progressive loss of dentine and cementum in a permanent tooth, that can occur inside/internal the tooth, or on the external surface of the tooth. A proposal of dense filling paste, composed of Ca (OH)<sub>2</sub>, chlorhexidine gel 2% (CHX) and zinc oxide (ZnO) has been used as a protocol for teeth with root resorption. Despite the properties of Ca(OH)<sub>2</sub>, CHX and ZnO have been extensively studied, there is little information on the literature regarding the mechanism of action on the association among Ca(OH)<sub>2</sub>, 2% CHX and ZnO. Therefore, the aim of the study was to test biological and physicochemical properties by this filling paste. In this study the properties of antimicrobial activity, radiopacity, flow, calcium ions release, pH evaluation, cytotoxicity, bioactivity and cell proliferation from intracanal pastes were analyzed as follows: Natrosol; Natrosol + ZnO; Natrosol + Ca(OH)<sub>2</sub>; Natrosol + ZnO + Ca(OH)<sub>2</sub>; 2% CHX; 2% CHX + ZnO; 2% CHX + Ca(OH)<sub>2</sub>; 2% CHX + ZnO + Ca(OH)<sub>2</sub>. All assays were performed in triplicate. A descriptive and inferential statistical analysis was performed. The data were statistical analyzed, following the normality test (Shapiro-Wilk test). Statistical analysis was carried out with the software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), at a 5% level of significance. Antimicrobial effect of the pastes against *E. faecalis* depended on the presence of CHX. The highest inhibition haloes for *Candida albicans* were associated with Ca(OH)<sub>2</sub> + CHX. Only pastes with ZnO demonstrated radiopacity higher than 3 mm Al, Ca(OH)<sub>2</sub> reduced the radiopacity of the pastes containing ZnO. Pastes that did not contain Ca(OH)<sub>2</sub> had no calcium ion release. There is a tendency to increase the pH up to 14 days. The groups with CHX had greater fluidity than natrosol when mixed only with Ca(OH)<sub>2</sub> or ZnO. Cell proliferation showed continuous closure of the wound according to time in all evaluated groups, except for 2% CHX. All groups containing Ca(OH)<sub>2</sub> showed increased mineralized nodules formation according to the time and an increased enzyme activity except for group 2% CHX. All groups containing Natrosol in their composition showed results above or near the control line to cytotoxicity. CHX group exhibited a viability rate lower than 50% but when containing Ca(OH)<sub>2</sub> or ZnO showed viability rates similar to the control line. It was concluded that the filling paste formed by CHX + ZnO + Ca(OH)<sub>2</sub> demonstrated favorable biological effects such as bioactivity, cytotoxicity and cellular proliferation and showed release of Ca, high pH, antimicrobial activity mainly due to the presence of CHX and Ca(OH)<sub>2</sub>.

**Keywords:** Endodontics, root canal obturation, calcium hydroxide, zinc oxide, chlorhexidine, dental trauma.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca(OH)<sub>2</sub> - Hidróxido de cálcio

ZnO – Óxido de zinco

CHX – Clorexidina

LPS – Lipopolissacarídeo

ATPase - Adenosina trifosfatase

MMP - Metaloproteinase da matriz

PMCC – Paramonoclorofenol canforado

Prof. – Professor

COMPESQ - Comissão de Pesquisa

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

mg – Miligrama

μl – Microlitro

Ca<sup>+2</sup> – Cálcio

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução.....</b>	<b>11</b>
<b>2 Revisão de Literatura.....</b>	<b>13</b>
<b>3 Objetivos.....</b>	<b>24</b>
3.1 Objetivos Específicos.....	24
Artigo 1.....	25
Artigo 2.....	44
<b>4 Considerações finais.....</b>	<b>61</b>
<b>Referências.....</b>	<b>64</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os traumatismos dentários são eventos indesejados, dolorosos e estressantes, e que podem gerar diversas consequências no desenvolvimento dos tecidos dentais e de suporte, ao longo da vida do paciente. Os traumatismos acometem principalmente crianças e jovens entre 7 e 14 anos e, conforme a intensidade e o tipo de trauma, o prognóstico pode ser duvidoso e os danos irreversíveis (ANDREASEN & ANDREASEN, 2001).

As principais consequências dos traumatismos dentários são a necrose pulpar e as reabsorções radiculares, que podem ser aceleradas pela presença da infecção microbiana no interior dos canais radiculares. Reabsorção dentária é toda a situação em que os tecidos dentários mineralizados são eliminados por células clásticas em algum ponto da superfície externa ou interna do elemento dentário. O trauma dental pode resultar no desenvolvimento de lesões nos tecidos dentários e nos tecidos de sustentação, de forma concomitante ou isolada (SILVEIRA et al., 2013).

De acordo com a severidade do trauma dentário podem ocorrer com frequência complicações pulpares e periapicais como as reabsorções radiculares externas inflamatórias ou por substituição. As reabsorções externas são caracterizadas pela perda progressiva de estrutura dental que ocorrendo em área que houve uma exposição da porção mineralizada da superfície dentária ficando sujeita à ação de células clásticas e dos mediadores liberados pelos osteoblastos (ASGARY et al., 2011).

A reabsorção radicular externa por substituição pode ser identificada como sendo uma troca contínua da substância radicular por osso. O primeiro sinal dessa alteração é detectado normalmente entre três e quatro meses após o reimplante dentário e geralmente no terço apical da raiz dando origem à anquilose. (ANDREASEN & HJØRTING-HANSEN, 1966).

A reabsorção radicular externa inflamatória é um processo que normalmente se inicia a partir de lesões menores do ligamento periodontal ou cemento, em virtude de traumatismo ou contaminação com bactérias que irão induzir pequenas cavidades de reabsorções na superfície radicular. Quando essas cavidades expõem os túbulos dentinários e se o canal estiver tecido necrótico, toxinas penetrarão provocando uma resposta inflamatória, intensificando o processo reabsortivo que irá avançar ao canal radicular (ANDREASEN & ANDREASEN, 2001).

O uso de uma medicação intracanal entre as sessões do tratamento endodôntico tem sido proposto nos casos de traumatismo de maneira a reduzir o número de microrganismos, aumentar o pH, induzir a neoformação dentinária e estimular o reparo dos tecidos periapicais (BARBOSA, 1999).

A pasta de hidróxido de cálcio  $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$  é frequentemente utilizada na Endodontia em função da sua capacidade de atuar como barreira física, prevenindo a reinfecção do canal, interrompendo o suprimento de nutrientes para as bactérias remanescentes (LOPES & SIQUEIRA JR, 2011). O óxido de zinco (ZnO) é um pó branco amarelado, inodoro, amorfo, insolúvel na água e no álcool, radiopaco e pode ser considerado também antisséptico (SIQUEIRA JR et al., 2004). O gel de clorexidina 2% (CHX) tem sido bastante utilizado na área da Endodontia tanto como substância química auxiliar na instrumentação dos canais radiculares quanto como medicação intracanal (GOMES et al., 2003; SIQUEIRA JR et al., 2003; ERCAN et al., 2004).

A utilização de uma pasta obturadora composta por  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , ZnO e CHX, sem trocas e com selamento coronal, através de estudos têm demonstrado sucesso clínico e radiográfico em dentes imaturos traumatizados devido a formação de uma barreira apical. Embora as propriedades do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , ZnO e CHX quando empregados como medicação intracanal já tenham sido avaliados em estudos prévios descritos na literatura, poucos são os estudos que avaliam a associação de todos estes componentes e a avaliação de suas propriedades biológicas, físicas e químicas, o papel que eles desempenham no reparo tecidual, vantagens e desvantagens.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O hidróxido de cálcio apresenta-se como um pó branco, com pH em torno de 12,8 por isso classificado como alcalino e também é pouco solúvel em água (solubilidade de 1,2 g/litro de água, à temperatura de 25° C). Trata-se de uma base forte obtida a partir da calcinação (aquecimento) do carbonato de cálcio, até sua transformação em óxido de cálcio (cal viva). Com a hidratação do óxido de cálcio chega-se ao hidróxido de cálcio e a reação entre este e o gás carbônico leva à formação do carbonato de cálcio (LOPES & SIQUEIRA JR, 2011).

O  $\text{Ca(OH)}_2$  é frequentemente utilizado como na odontologia, especialmente na endodontia, devido a sua capacidade de atuar como barreira física, prevenindo a reinfecção do canal, interrompendo o suprimento de nutrientes para as bactérias remanescentes (LOPES & SIQUEIRA JR, 2011). O  $\text{Ca(OH)}_2$  apresenta ótima ação biológica, ação antisséptica pelo pH elevado e inibição enzimática microbiana, neutralizador de LPS bacteriano e promove a reparação tecidual por meio da ativação enzimática do hospedeiro. No entanto, não é eficiente à distância e apresenta rendimento razoável contra *Enterococcus faecalis*. (ESTRELA et al., 1994).

As propriedades  $\text{Ca(OH)}_2$  derivam de sua dissociação iônica em íons cálcio e íons hidroxila, esses íons que explicam as propriedades biológicas e antimicrobianas desta substância, pois irão agir sobre os tecidos e as bactérias. A variação do pH pode modular o crescimento bacteriano, uma vez que exerce ação sobre a atividade enzimática. Da mesma forma, pode afetar o metabolismo das células, alterando o crescimento e a proliferação celular. Quando o  $\text{Ca(OH)}_2$  é colocado dentro do canal radicular, 45,89% e 54,11% se dissociam respectivamente em íons hidroxila e íons cálcio. (ESTRELA & PESCE, 1996; ESTRELA et al., 1997).

Diversos trabalhos têm sugerido que o mecanismo de estimulação do reparo pela deposição de tecido mineralizado depende do pH e da capacidade de liberação de íons cálcio. A liberação de íons cálcio é capaz de reduzir a permeabilidade de novos capilares em tecido granulomatoso de dentes despolpados, diminuindo a quantidade de líquido intercelular. Além disso, uma alta concentração de íons cálcio pode ativar a pirofosfatase, uma enzima importante no processo de mineralização, formando barreiras de dentina, osteocementárias, selamento apical, selamento de

túbulos dentinários etc. (DUARTE et al., 2003; OKABE et al., 2006; GANDOLFI et al., 2011).

Sabe-se que depois da instrumentação, irrigação e medicação com  $\text{Ca(OH)}_2$ , um percentual maior de canais radiculares não apresentam crescimento bacteriano quando comparados àqueles desprovidos de um curativo (CHU et al., 2006). Uma das razões relacionados à eficácia do  $\text{Ca(OH)}_2$  é a produção de um meio alcalino criado pela sua aplicação que restringe o crescimento bacteriano. Além da atividade antimicrobiana, o  $\text{Ca(OH)}_2$  apresenta propriedades como: dissolução de remanescentes orgânicos, ação anti-inflamatória, inibição de reabsorções inflamatórias e a função de barreira física e ainda pode reduzir a dor existente e prevenir os sintomas pós-operatórios (LOPES & SIQUEIRA JR, 2011).

Devido ao elevado pH do  $\text{Ca(OH)}_2$ , obtém-se liberação intensa de íons hidroxila e íons cálcio e a inibição de enzimas bacterianas, a partir da ação em nível de membrana citoplasmática, conduzindo ao efeito antimicrobiano. Da mesma forma, o elevado pH do  $\text{Ca(OH)}_2$  promove ativação enzimática tecidual, observada por sua ação sobre a fosfatase alcalina, promovendo um efeito mineralizador (ESTRELA et al., 1994).

Estrela et al. (1995) realizou um estudo onde pode observar que o cimento apical de dentes medicados com  $\text{Ca(OH)}_2$ , em veículo de solução salina ou anestésica, necessitou 30 dias para atingir um pH de 7-8, e este permaneceu inalterado por 60 dias. No grupo em que o polietilenoglicol foi utilizado, 45 dias foram necessários para que o mesmo pH fosse atingido, e permaneceu inalterado por 60 dias. As pastas intracanal mantiveram um pH de 12 durante 60 dias. Concluíram com este estudo que uma liberação mais lenta de íons  $\text{OH}^-$  é observada com a utilização de um veículo viscoso.

A difusão de íons hidroxila do  $\text{Ca(OH)}_2$  através dos túbulos dentinários e o possível aumento do pH nos tecidos também foi analisada por Tronstad et al. (1981). Em relação aos resultados obtidos, os autores concluíram que a colocação de hidróxido de cálcio no canal radicular pode influenciar as áreas de reabsorção, impossibilitando a atividade osteoclástica e estimulando o processo de reparo. A presença de íons cálcio mostrou-se eficaz para a ativação do sistema complemento na reação imunológica e a abundância destes íons cálcio ativou a ATPase (Adenosina trifosfatase) cálcio dependente, à qual esta associada na formação de tecido duro.

Através da difusão de íons hidroxila pela dentina em uma concentração iônica suficiente para exercer ação antimicrobiana, o hidróxido de cálcio consegue ser eficaz contra bactérias localizadas no interior dos túbulos dentinários. A permeabilidade dentinária e a sua capacidade tampão podem afetar a difusibilidade dos íons no maciço radicular. Nerwich et al. (1993) estudaram as mudanças de pH na dentina radicular de dentes humanos extraídos durante um período de 4 semanas com medicação intracanal de hidróxido de cálcio como curativo de demora. Neste estudo eles concluíram que os íons hidroxila demoram de 1 a 7 dias para alcançar a dentina radicular externa, e no terço cervical obtiveram os valores mais altos de pH quando comparados ao terço apical.

Por possuir uma baixa solubilidade e difusão, o  $\text{Ca(OH)}_2$  necessita de um longo tempo de ação para que exerça sua atividade antimicrobiana nos túbulos dentinários infectados. Embora o tempo ideal necessário para ele descontaminar o sistema de canais radiculares seja ainda desconhecido e bastante discutido, sua ação antibacteriana pode ser confirmada clinicamente pela ausência de exsudato nos canais radiculares ou pela presença de micro-organismos resistentes (LOPES & SIQUEIRA JR, 2011).

A baixa solubilidade do  $\text{Ca(OH)}_2$  é responsável por um efeito favorável de liberação lenta no interior dos canais radiculares. A liberação de íons hidroxilas pode inativar ou levar a morte bactérias, bloquear o acúmulo de exsudato promover um preenchimento físico do espaço do canal o que reduz os nutrientes e elimina o espaço para a multiplicação bacteriana (BYSTROM et al., 1985).

Normalmente a maioria das espécies bacterianas que coloniza os canais radiculares consegue manter sua viabilidade até um pH 9. No entanto, alguns micro-organismos, tais como *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, são resistentes ao  $\text{Ca(OH)}_2$ . Estudos questionam a eficácia deste medicamento na redução do número de bactérias nos canais radiculares, mesmo depois de um tempo prolongado do medicamento entre as sessões (HELING et al., 1992; WALTIMO et al., 1999; PETERS et al., 2002).

Além dos veículos, algumas substâncias químicas podem ser adicionadas ao  $\text{Ca(OH)}_2$ , no intuito de melhorar as suas propriedades físico-químicas para utilização clínica. Dentre elas, podem ser citados o óxido de zinco em pó e o gel de clorexidina 2%.



O óxido de zinco é um produto sintético, de constituição inorgânica quimicamente inerte e é obtido a partir da fundição do zinco, quando de sua reação com o oxigênio. O óxido de zinco é um pó branco amarelado, inodoro, amorfo, insolúvel na água e no álcool, radiopaco e pode ser considerado também antisséptico (SIQUEIRA JR et al., 2004). Ele pode estar presente na composição de cimentos endodônticos para obturação dos canais radiculares (PIZZO et al., 2006) e em cones de guta-percha (SPANGBERG et al., 1998).

Leonardo et al. (2000) verificaram que o óxido de zinco associado à água destilada inibiu crescimento de *Enterococcus faecalis* após 24 horas, no entanto, os halos de inibição foram inferiores aos demais medicamentos.

Moorer & Genet (1982), ao avaliarem a contribuição do óxido de zinco nas propriedades antimicrobianas de cones de guta-percha, constataram que este composto apresenta propriedades biológicas que necessitam estudos adicionais, desconsiderando a hipótese que este seja um composto inerte.

O Zinco é um elemento essencial para o corpo humano, é um importante componente para a manutenção da saúde. O Zinco atua como co-fator de inúmeros fatores de transcrição e sistemas enzimáticos incluindo metaloproteinases de matriz dependentes de zinco que aumentam o autodesbridamento e migração de queratinócitos durante o reparo de feridas (LANSDOWN et al., 2007).

A aplicação tópica de óxido de zinco demonstrou realizar a cicatrização de feridas crônicas e agudas. O ZnO pode reduzir a reação inflamatória no tecido de granulação e também aumentar significativamente a re-epitelização de feridas. Porém pouco se sabe sobre o mecanismos molecular e celular pelo qual o ZnO tópico é capaz de promover a cicatrização de feridas (AGREN et al. 1991). Também foi demonstrado que o índice mitótico das células basais epidérmicas é estimulado pela aplicação tópica de óxido de zinco (JIN et al., 1994).

O ZnO é bastante insolúvel, na medida em que é dissolvido devagar mas continuamente quando aplicado em feridas abertas. As metaloproteinases de matriz estão relacionadas com vários tipos de processos orais patológicos, tais como: destruição do tecido periodontal, cáries radiculares, invasão tumoral e distúrbios da articulação temporomandibular. Foi demonstrado por Souza et al. (2000) que a metaloproteinase da matriz (MMP-2) e (MMP-9) são inibidos *in vitro* por uma solução de sulfato de zinco. MMP-2 e MMP-9, também conhecidos como gelatinases, são ativos na degradação de fibrilares colágenos desnaturados, elastina, colágeno IV e

vários outros componentes da matriz extracelular. Santos et al. (2001), demonstrou que o ZnO pode exercer um efeito prolongado e constante no tecido em cicatrização e que a inibição das atividades MMP-2 e MMP-9 pode ser um mecanismo pelo qual o óxido de zinco tópico melhora a cicatrização das feridas.

O hidróxido de cálcio pode ser associado a diferentes veículos, estes veículos podem ser hidrossolúveis (aquosos e viscosos) ou oleosos. Dentre os aquosos, destacam-se a água destilada ou estéril, o soro, a solução anestésica e a solução de metilcelulose. Porém, os veículos hidrossolúveis aquosos possibilitam uma dissociação iônica bastante rápida e efetiva, conferindo assim uma ação bactericida mais rápida do medicamento. Quando o hidróxido de cálcio é associado a esses veículos, a medicação deve ser renovada com frequência (LOPES & SIQUEIRA JR, 2011).

Tem sido demonstrado em alguns estudos *in vitro* que o tipo de veículo associado ao hidróxido de cálcio está diretamente relacionado com a concentração e a velocidade de liberação dos íons  $\text{OH}^-$ , conseqüentemente com a ação antibacteriana desta medicação (FAVA & SAUNDERS, 1999). Os veículos hidrossolúveis viscosos mais usados são: glicerina (ÇALINSKAN & TURKUN, 1997), cresatina (STEINER et al., 1968), polietilenoglicol e propilenoglicol (LEONARDO et al., 1993). Estes tipos de veículos retardam a dissociação iônica do hidróxido de cálcio, provavelmente em razão de seus elevados pesos moleculares. Os veículos oleosos são pouco solúveis em água, isso reduz a velocidade da liberação iônica e a sua difusão junto aos tecidos. Os mais empregados são o paramonoclorofenol canforado e o óleo de oliva (LOPES et al., 1986).

A influência de veículos não aquosos sobre a dissociação do hidróxido de cálcio por meio da mensuração da condutibilidade das soluções foi analisada *in vitro* por Safavi & Nakayama (2000). As medidas para o hidróxido de cálcio veiculado em água foi  $7,3 \pm 3$  mS/cm. Para o hidróxido de cálcio veiculado em glicerina ou propilenoglicol foi zero, isso sugere que não ocorreu dissociação dos íons  $\text{OH}^-$  e  $\text{Ca}^{+2}$ , o que impede sua eficácia antimicrobiana como medicação intracanal.

A clorexidina foi desenvolvida na década de 40, como resultado de uma pesquisa para a obtenção de um agente antiviral, no entanto observou-se um notável efeito antibacteriano. Caracterizada como uma base forte, comumente é preparada na forma de um sal de digluconato o que lhe confere uma maior estabilidade e hidrossolubilidade.

O gel de clorexidina 2% tem sido bastante utilizado na área da Endodontia tanto como substância química auxiliar na instrumentação dos canais radiculares quanto como medicação intracanal (GOMES et al., 2003; SIQUEIRA et al., 2003; ERCAN et al., 2004). A clorexidina é uma molécula com carga positiva que se liga à superfície bacteriana carregada negativamente por ação eletrostática. Em baixas concentrações, a clorexidina é capaz de interferir na síntese de ATP das bactérias. Por outro lado, quando em altas concentrações, provoca a ruptura da membrana bacteriana. Apresenta, portanto, uma ação antibacteriana de amplo espectro. Outra propriedade da clorexidina é a substantividade ou efeito residual, o que permite que esta solução mantenha uma concentração mínima no meio em que está presente por um período de até 7 dias (DAMETTO et al., 2002).

A ação da clorexidina gel em incisivos reimplantados de macacos com reabsorções radiculares inflamatórias durante o período de um mês foi analisada por Lindskog et al. (1998). Demonstraram que o uso da clorexidina como medicação intracanal reduziu o processo de reabsorção, provavelmente devido à sua ação antibacteriana nos túbulos dentinários e sobre as células do ligamento periodontal.

Devido às propriedades antimicrobianas da clorexidina ela pode ser considerada uma substância importante para a associação com o hidróxido de cálcio, tendo assim como objetivo aumentar as propriedades antimicrobianas do hidróxido de cálcio e manter as suas características biológicas e mecânicas (GOMES et al., 2006).

Souza-Filho et al. (2008) avaliaram a efetividade da clorexidina gel 2%, do hidróxido de cálcio e suas associações com óxido de zinco e iodofórmio, sobre alguns microrganismos, variações de pH do meio em diferentes períodos de tempo. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em ágar. O pH das pastas foi medido logo após a preparação, após 24h e uma semana mais tarde. Obtiveram como resultados que a CHX gel 2% apresentou a maior zona de inibição, seguido de  $\text{Ca(OH)}_2$  + CHX gel 2% + iodofórmio,  $\text{Ca(OH)}_2$  + CHX gel 2%,  $\text{Ca(OH)}_2$  + CHX gel 2% + óxido de zinco, e  $\text{Ca(OH)}_2$  + água. O pH médio de todos os medicamentos manteve-se acima de 12,0 durante todo o experimento, exceto CHX gel 2% (pH = 7,0). Os resultados deste estudo mostraram que todos os medicamentos tinham atividade antimicrobiana, mas os mais eficazes contra os microrganismos testados foram clorexidina gel 2%, seguido por sua combinação com hidróxido de cálcio e Iodofórmio.

Silveira et al. (2011), avaliaram *in vitro* a atividade antibacteriana de quatro formulações de pastas:  $\text{Ca(OH)}_2$  + 2% CHX,  $\text{Ca(OH)}_2$  + PMCC,  $\text{Ca(OH)}_2$  + propilenoglicol,  $\text{Ca(OH)}_2$  + soro fisiológico, contra *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus mutans*. Observaram que todos os medicamentos intracanaís mostraram atividade antibacteriana. No entanto, a associação de  $\text{Ca(OH)}_2$  + PMCC e  $\text{Ca(OH)}_2$  + propilenoglicol apresentaram melhor resultado pois precisaram de menos tempo para promover a eliminação do *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

Neelakantan et al. (2007) avaliou o efeito da atividade antimicrobiana de um medicamento à base de hidróxido de cálcio (Apex Cal) e gel de clorexidina 2% contra patógenos endodônticos selecionados (*Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*). Observaram que o 2% CHX demonstrou as maiores zonas inibitórias, porém ambos os medicamentos diminuíram seu efeito inibitório com o passar do tempo e o  $\text{Ca(OH)}_2$  não demonstrou ação antimicrobiana após 72 horas.

Silva et al. (2009) avaliou a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos isogênicos frente a pastas à base de hidróxido de cálcio associadas ao digluconato de clorexidina. A pasta Calen<sup>®</sup> foi associada a CHX a 0,4% e o UltraCal<sup>™</sup> associado a CHX 2%. Os resultados demonstraram biocompatibilidade da pasta Calen associada à CHX a 0,4% com o tecido adjacente, demonstrando fibrosamento discreto, assim como tecido conjuntivo normal. Por outro lado a pasta UltraCal<sup>™</sup> observou-se infiltrado inflamatório e exsudato severo, sugerindo uma agressão residual persistente do material testado. Concluíram que o uso de uma determinada droga não só depende da sua compatibilidade biológica, mas também do seu adequado uso e concentração.

Almyroud et al. (2002), realizou um estudo *in vitro* utilizando dentes humanos que contaminados com *Enterococcus faecalis*. Foram comparadas quatro tipos de medicações intracanal (hidróxido de cálcio, gel de clorexidina e clorexidina sob a forma de um sistema de liberação controlada (PerioChip<sup>®</sup>), e a combinação de gel de clorexidina com hidróxido de cálcio) em diferentes períodos de tempo, 3, 8 e 14 dias. Foi observado que o hidróxido de cálcio mostrou mais eficiência no terceiro e oitavo dia, porém, no décimo quarto dia não foi tão eficaz, acredita-se que isso pode ter sido causado pela diminuição do pH como resultado da desidratação da medicação intracanal.

Basrani et al. (2004), avaliaram propriedades físico-químicas de medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio e clorexidina. As medicações testadas foram clorexidina 0,2% e 2%, hidróxido de cálcio associado à água e hidróxido de cálcio associado a clorexidina 0,2%. Observaram que a clorexidina não alterou o pH do hidróxido de cálcio, mantendo assim a ação antimicrobiana associada à liberação de íons hidroxila.

Gomes et al. (2006) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio, do gel de clorexidina 2% e da associação das duas substâncias sobre bactérias e um tipo fungo. Observaram que a clorexidina apresentou os maiores halos de inibição, e de no máximo um minuto para eliminar todos os microorganismos. A pasta de hidróxido de cálcio teve ação apenas em contato direto, necessitando de 30 segundos a 24 horas para inibir o crescimento dos mesmos microorganismos. E quando associados apresentaram zonas de inibição variando entre 2,84 e 6,5mm, sendo necessários de 30 segundos a 6 horas para inibir o crescimento dos microorganismos testes. Com esta pesquisa concluíram que quando combinados os dois medicamentos, a ação antimicrobiana da clorexidina diminuiu, entretanto, aumentou a do hidróxido de cálcio.

Delgado et al. (2010), avaliou a eficácia do hidróxido de cálcio e do gel de clorexidina 2% na eliminação da *Enterococcus faecalis* intratubular. Dentes humanos unirradiculares contaminados com *Candida albicans* foram tratadas com hidróxido de cálcio, gel de clorexidina 2%, associação de hidróxido de cálcio mais gel de clorexidina 2%, ou solução salina (0,9% de cloreto de sódio) como controle positivo. A atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio e do gel de clorexidina 2% foi avaliada pela contagem do número de unidades formadoras de colônias em amostras obtidas com uma profundidade de 0-100 e 100-200 mm do sistema de canais radiculares. Foi observada uma diminuição significativa do número de unidades formadoras de colônias de *Enterococcus faecalis* após tratamento com qualquer um dos medicamentos, porém, o gel de clorexidina teve uma eficácia antimicrobiana significativamente maior e não foram observadas diferenças entre as propriedades antimicrobianas do gel de clorexidina com ou sem a adição do hidróxido de cálcio. O hidróxido de cálcio combinado com clorexidina mostrou atividade antimicrobiana semelhante à clorexidina quando usada sozinha.

Signoretto et al. (2011), realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a influência do gel de clorexidina 2% sobre o pH, liberação de cálcio, e a capacidade

do hidróxido de cálcio na redução de endotoxinas. Neste trabalho a libertação de cálcio foi verificada por espectrofotometria de absorção atômica e o pH foi medido com um pHmetro. Para quantificação de endotoxinas, dentes humanos extraídos previamente contaminados com endotoxina padrão foram preenchidos com: Grupo 1: solução salina; Grupo 2:  $\text{Ca(OH)}_2$  e Grupo 3: ge de clorexidina 2% durante 14 dias. Observaram nos resultados encontrados que o grupo 2 liberou mais cálcio que o grupo 1 após 15 dias. Concluíram que o gel de clorexidina 2% não interfere nas propriedades químicas mecânicas do hidróxido de cálcio.

Embora as propriedades do hidróxido de cálcio, do óxido de zinco e do gel de clorexidina 2% quando empregados como medicação intracanal já tenham sido avaliados em estudos prévios descritos na literatura, poucos são os estudos que avaliam a associação de todos estes componentes e a avaliação de suas propriedades físico-químicas e biológicas.

Gomes et al. (2009) avaliaram *in vitro* a ação antimicrobiana de medicamentos intracanal na superfície externa da raiz, com ou sem cimento. Neste estudo utilizaram a clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio + gel de clorexidina 2%, hidróxido de cálcio + gel de clorexidina 2% + óxido de zinco, e hidróxido de cálcio + solução salina contra o *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Actinomyces viscosus* e *Porphyromonas gingivalis*. Todos os medicamentos testados foram ativos contra os microrganismos, porém o gel de clorexidina 2% mostrou-se o mais eficaz, seguido do hidróxido de cálcio + gel de clorexidina 2%, hidróxido de cálcio + gel de clorexidina 2% + óxido de zinco, e hidróxido de cálcio + solução salina. A presença da camada de cimento pode afetar a difusão de substâncias com os tecidos periodontais. No entanto, neste estudo *in vitro*, zonas de inibição semelhantes foram apresentadas pelas raízes com ou sem cimento, nas amostras cheias contendo pasta de clorexidina.

Em 2007, Soares et. al., realizaram um estudo clínico onde o objetivo foi investigar uma proposta de pasta obturadora utilizando a associação do hidróxido de cálcio, gel de clorexidina 2% e do óxido de zinco para casos de dentes traumatizados. Introduziram este protocolo intracanal sem substituições periódicas em um total de 55 dentes unirradiculares, divididos em dois grupos: Grupo I – 15 dentes com ápices incompletos e Grupo II- 40 dentes com ápices completos, pertencentes a 33 pacientes atendidos no Serviço de Traumatismos Dentários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba. No Grupo I, o período médio de

permanência da pasta foi de 9,1 meses e no Grupo II, de 8,2 meses. Como resultados observaram que este protocolo pasta obturadora por um longo período de tempo pode ser proposto como alternativa para o tratamento de dentes traumatizados desvitalizados, em especial, nos casos de rizogênese incompleta e também nos casos de formação radicular completa.

As formulações de hidróxido de cálcio são usadas durante o tratamento de perfurações radiculares, fraturas de raiz e reabsorções radiculares, também desempenha um papel fundamental na traumatologia dentária, principalmente após avulsão dentária e lesões por luxação. Os efeitos letais do hidróxido de cálcio as células bacterianas provavelmente deve-se à desnaturação de proteínas e danos ao DNA e membranas citoplasmáticas. O  $\text{Ca(OH)}_2$  possui uma ampla gama de atividades antimicrobianas contra patógenos endodônticos comuns, mas é menos eficaz contra *Enterococcus faecalis* e *Candida Albicans*. A solubilidade aos fluidos ainda é um problema do  $\text{Ca(OH)}_2$ . No entanto, combinações de  $\text{Ca(OH)}_2$  com paramonoclorofenol canforado ou CHX tem um potencial medicamentoso intracanal mais efetivo (MOHAMMADI & DUMMER, 2011).

De acordo com trabalhos encontrados na literatura (HERRERA et al., 2014; SOARES et al., 2012; SOARES & SOUZA-FILHO, 2011) a utilização de uma pasta de obturação composta por hidróxido de cálcio, óxido de zinco e gel de clorexidina 2%, sem trocas e com selamento coronal, através de estudos tem demonstrado sucesso clínico e radiográfico em dentes imaturos traumatizados pela formação de uma barreira apical. A utilização deste protocolo em um estudo clínico com dentes imaturos traumatizados mostrou fechamento apical após nove meses e redução de todos os sinais e sintomas após a realização deste tratamento (SOARES et al., 2011). Uma das vantagens da utilização desta pasta obturadora é a não necessidade de ser alterada durante o período que a apicificação está ocorrendo se a dissolução não é observada radiograficamente durante o controle das visitas, isso ajuda a prevenir a infecção durante a substituição da pasta e a redução do tempo necessário para a formação de barreira apical. Além disso, radiografias mostraram que o material não sofre dissolução. É provável que, após nove meses, apenas óxido de zinco esteja presente, uma vez que o  $\text{Ca(OH)}_2$  deveria ter sido submetido a completa dissolução (SOARES et al., 2012).

Evidências demonstram as propriedades antimicrobianas, biológicas e físicas de pastas de hidróxido de cálcio e clorexidina. Porém, pouco se sabe da influência

de cada um dos componentes da pasta obturadora que é composta pela associação do hidróxido de cálcio, gel de clorexidina 2% e óxido de zinco. Assim, neste trabalho foram investigadas as propriedades físico-químicas e biológicas desta associação que tem sido sugerida como parte do protocolo terapêutico para o tratamento de dentes traumatizados, especialmente em casos de reabsorções radiculares.



### 3 OBJETIVO

Investigar *in vitro* as propriedades físico-químicas e biológicas de uma pasta obturadora composta pela associação do hidróxido de cálcio, gel de clorexidina 2% e óxido de zinco.

#### 3.1 Objetivos Específicos

- a) Determinar o pH, a liberação de íons cálcio, a radiopacidade e o escoamento de pastas contendo associações de gel de clorexidina 2%, hidróxido de cálcio e/ou óxido de zinco.
- b) Determinar os halos de inibição de crescimento de, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* promovido de pastas contendo associações de gel de clorexidina 2%, hidróxido de cálcio e/ou óxido de zinco.
- c) Determinar a citotoxicidade e a bioatividade celular de pastas contendo associações de gel de clorexidina 2%, hidróxido de cálcio e/ou óxido de zinco.
- d) Determinar a capacidade de proliferação celular (*teste de scratch*), expondo as células às pastas contendo associações de gel de clorexidina 2%, hidróxido de cálcio e/ou óxido de zinco.

Os achados estão apresentados na forma de artigos. Os artigos 1 e 2 apresentados desta tese de doutorado seguem as normas exigidas pelo periódico *International Endodontic Journal* para o qual serão submetidos à publicação. As figuras serão excepcionalmente aqui mostradas junto ao manuscrito, para melhor entendimento do leitor.

**ARTIGO 1****Ca(OH)<sub>2</sub>-ZnO-chlorhexidine paste for filling teeth with dental trauma and root resorption: antimicrobial and physicochemical properties**

Otávio da Silva Sposito <sup>1</sup>

Karen Barea de Paula <sup>1</sup>

Letícia Boldrini Mestieri <sup>1</sup>

Morgana Bazzan Dessuy <sup>2</sup>

Maria Goreti Rodrigues Vale <sup>2</sup>

Fabiana Soares Grecca <sup>1</sup>

Francisco Montagner <sup>1</sup>

*1 Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2492, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.*

*2 Chemistry institute, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.*

**Running title:** Paste for filling teeth with dental trauma and root resorption

**Key words:** Calcium hydroxide, Zinc Oxide, Chlorhexidine, Root Resorption, Physical Properties, Chemical Properties

**Correspondent author:**

Dr Francisco Montagner  
Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Rua Ramiro Barcelos, 2492, Bairro Santana – Porto Alegre, RS, Brazil  
PO Box 90035-003, Phone: +55 51 3308 5430  
E-mail: [francisco.montagner@ufrgs.br](mailto:francisco.montagner@ufrgs.br)

## Abstract

**Aim** To test physicochemical and antimicrobial properties by a intracanal paste composed by  $\text{Ca(OH)}_2$ , 2% CHX and ZnO.

**Methodology** The study analyzed and compared antimicrobial activity, flow, radiopacity, calcium ion release and pH evaluation from intracanal pastes, as follow: a) Natrosol; b) Natrosol + ZnO; c) Natrosol +  $\text{Ca(OH)}_2$ ; d) Natrosol + ZnO +  $\text{Ca(OH)}_2$ ; e) CHX; f) CHX + ZnO; g) CHX +  $\text{Ca(OH)}_2$ ; h) CHX + ZnO +  $\text{Ca(OH)}_2$ . A descriptive and inferential statistical analysis considering: growth inhibition zones, radiopacity, pH, calcium release and flow. Normality test using the Shapiro-Wilk test with a significance level of 5%.

**Results** Antimicrobial effect of the pastes against *E. faecalis* depended on the presence of CHX, the highest inhibition haloes for *Candida albicans* were associated with  $\text{Ca(OH)}_2$  + CHX. Only pastes containing zinc showed radiopacity higher than 3 mm Al. Pastes that did not contain  $\text{Ca(OH)}_2$  had no calcium ion release. Considering the same paste, there is a tendency to increase the pH up to 14 days. The pastes with CHX had greater fluidity than natrosol when mixed only with  $\text{Ca(OH)}_2$  or ZnO.

**Conclusions**  $\text{Ca(OH)}_2$ -ZnO-chlorhexidine paste showed release of Ca, high pH, antimicrobial activity mainly due to the presence of CHX and  $\text{Ca(OH)}_2$ .

## Introduction

Root resorption is a pathological progressive loss of dentine and cementum in a permanent tooth, that can occur inside/internal the tooth, or on the external surface of the tooth (Ahangari *et al.* 2015). It has an inflammatory origin and can be initiated and maintained by many factors. Pulpal necrosis, dental trauma, periodontal treatment, orthodontic movement and tooth whitening agents are the most commonly described stimulant (Darcey and Qualtrough 2013).

Dental trauma is a major cause of resorption. Depending on the severity, it can cause damage to the periodontal ligament cells. It may initiate a severe inflammatory response over a diffuse area on the root surface. The inflammatory response can be exacerbated in the presence of microorganisms, leading to an inflammatory external root resorption (Asgary *et al.* 2011). The literature reported that the treatment for traumatized teeth with periradicular periodontitis and/or external inflammatory root resorption is based on long-term dressing of use of calcium hydroxide (Bystrom *et al.* 1985; Sjögren *et al.* 1997; Kinirons *et al.* 2001). This protocol has some disadvantages such as the need for repeated clinical sessions to replace the intracanal medication; the cooperation and motivation from the patient; the possibility of increasing the the brittleness of the root dentin, which may cause cervical root fractures (Cvek 1992; Andreasen *et al.* 2002).

The International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries report that after the placement of an intracanal medicament for up to 1 month, reimplanted teeth should be filled with an acceptable material. There is no consensus on the filling material to be inserted in tooth that were avulsed and reimplanted. Therefore, a biocompatible material should be placed to fill the root canal, especially if the resorptive process reaches the root canal. Herrera *et al.* (2014), reported that a new intracanal medicament protocol has been employed for teeth with apical root resorption using an obturation paste composed by  $\text{Ca(OH)}_2$ , 2% chlorhexidine gel (CHX) and zinc oxide (ZnO), which does not require repeated renewal. The combination of these materials results in a dense filling paste that can remain in the root canal for a long period of time without replacement and act as a root canal obturation (Marion, Jefferson J. C.; *et al.* 2014).

Soares *et al.* (2015), investigated the subcutaneous tissue reaction of Wistar rats (*Norvegicus albinus*) that received an intracanal medicament with  $\text{Ca(OH)}_2$ , 2% CHX and ZnO. They showed favorable results regarding biocompatibility and may be explained by the

presence of zinc oxide that presented low tissue irritation and induced favorable tissue repair. Gomes *et al.* (2009), assessed in vitro the antimicrobial action of intracanal medicaments in the external root surface. This study concluded that medicaments containing  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , CHX and ZnO demonstrated diffused into the dentin and reached the outer surface, exerting strongest antimicrobial action, mainly by the fact that contains 2%CHX in composition.

Despite the properties of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , CHX and ZnO have been extensively studied, there is little information on the literature regarding the mechanism of action on the association among  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , 2% CHX and ZnO (de Jesus Soares *et al.* 2012; Herrera *et al.* 2014; Soares *et al.* 2015). Therefore, the aim of the study was to test physicochemical and antimicrobial properties by this intracanal paste.

## **MATERIALS AND METHODS**

The present study was approved by the Research Board from the School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil, Protocol n. 31550).

The tested pastes were prepared according to group using: calcium hydroxide p.a. [ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ] (Sigma Aldrich Brazil LTDA, SP, Brazil), zinc oxide p.a. [ZnO] (Sigma Aldrich Brazil LTDA, SP, Brazil), 2% chlorhexidine gluconate gel [CHX] (Endogel, Itapetininga, SP, Brazil) or Natrosol gel [Natrosol] (Endogel, Itapetininga, SP, Brazil) (hydroxyethyl cellulose is a nonionic, highly inert and water-soluble agent).

This study analyzed and compared physicochemical and antimicrobial properties from intracanal pastes, as follow:

- a) Natrosol (75  $\mu\text{l}$ );
- b) Natrosol (75  $\mu\text{l}$ ) + ZnO (84 mg);
- c) Natrosol (75  $\mu\text{l}$ ) +  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (48 mg);
- d) Natrosol (75  $\mu\text{l}$ ) + ZnO (84 mg) +  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (48 mg);
- e) 2% CHX (CHX) (75  $\mu\text{l}$ );
- f) 2% CHX (75  $\mu\text{l}$ ) + ZnO (84 mg);
- g) 2% CHX (75  $\mu\text{l}$ ) +  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (48 mg);
- h) 2% CHX (75  $\mu\text{l}$ ) + ZnO (84 mg) +  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (48 mg);

### **Antimicrobial analysis**

The agar diffusion method was used to measure the antimicrobial activity. The test was performed in triplicate. The method was adapted from Athanassiadis *et al.* (2009). The strains used in the analysis were *Candida albicans* (ATCC 10231), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). The subcultures were incubated at 37°C for 48 hours prior to the testing of the medicaments and their base components. Purity of strains was checked by subculture of the inocula onto Brain Heart Infusion agar (Himedia Laboratories, Mumbai, India) supplemented with 5% defibrinated sheep blood for *E. faecalis* or in Sabouroud Agar for *C. albicans*. Agar well diffusion assays were performed in 90 mm diameter Petri dishes containing Mueller Hinton Agar for *E. faecalis* and Sabouraud Dextrose Agar for *C. albicans* to a depth of 4 mm. A direct colony suspension of each test isolate was prepared in 0.85% sterile saline, and the turbidity was adjusted to a 0.5 McFarland standard for *E. faecalis* and a 1.0 McFarland standard for *C. albicans*. The agar plates were flooded with the test suspension and the test medicament were manipulated and placed on wells (6 mm in diameter) into center of the agar. The plates were then incubated at 37°C for 24 hours for both *E. faecalis* and *C. albicans*. After incubation, the diameters of the growth inhibition zones were measured in millimetres to the nearest 0.1 mm using electronic calipers.

### **Radiopacity analysis**

To evaluate the radiopacity, standardized cylindrical samples were obtained into plastic rings measuring 4mm in diameter by 1.5mm in thickness. The pastes were poured into the rings. Six specimens were prepared from each paste. Each sample was then radiographed and images were captured using Digora® phosphor storage plates (Soredex; Orion Corporation, Helsinki, Finland), alongside an aluminium stepwedge that was used as a reference. The radiographs were obtained using a radiographic unit (Dabi Atlante Spectro 70X, São Paulo, Brazil) operating at 70 kV and 10mA, with a 0.3-s exposure time and a 30-cm focal distance was set. The digital images were analyzed in Adobe Photoshop® software v. 10.0 (Adobe Systems, San Jose, CA) (Malka *et al.* 2015).

### **Flow analysis**

The flow test was conducted according to ISO 6876:2001, as reported by Collares *et al* (2013). A total of 0.5 ml of each intracanal paste was placed over a glass plate (40x40x5

mm) using a graduated 1.5ml syringe. Another plate with a mass of  $20\pm 2$  g and a load of 100g was applied to the top of the material for  $180\pm 5$ s after mixing. Ten minutes after mixing, the load was removed, and the major and minor diameters of the compressed material were measured using a digital caliper. The results were recorded if both measurements were consistent to within 1 mm. If the major and minor diameter discs were not uniformly circular or did not agree within a range of 1mm, the experiment was repeated. For each experimental group, the test was conducted three times, and the mean value was recorded for the flow.

### **Calcium Ion Release and pH Evaluation**

The evaluation of the calcium ion release and pH was performed as reported previously by Linhares *et al.* (2013). The manipulated pastes were prepared and inserted in polyethylene tubes with a 1.0 mm internal diameter and a 10.0 mm length with only 1 open. After filling the tubes, they were weighed in order to standardize the mass of the pastes inside each tube. Nine specimens of each paste were prepared. Each specimen was immediately immersed in test tubes containing 10 mL deionized water (Permuton, Curitiba, PR, Brazil), which were then sealed with Parafilm (American National Can, Menasha, WI) and incubated at 37 °C (Farmen, São Paulo, SP, Brazil) throughout the study period. Evaluations of calcium concentration and pH were performed at periods of 24 hours, 7 and 14 days. This procedure was performed in triplicates.

Before the immersion of the specimens, the water pH was measured, attesting a pH of 7.0. In order to avoid contamination by calcium, plastic bottles and glassware were cleaned by soaking them in a 10% (v/v)  $\text{HNO}_3$  solution for at least 24 h and rinsed abundantly with ultrapure water before use. It was also analyzed a blank (pure water) for each period aiming to control calcium contamination. The measurement of pH was performed with a pHmeter (Q400A; Quimis, Diadema, São Paulo, Brazil). The release of calcium ions was measured using a high resolution continuum source atomic absorption spectrometer (ContrAA 700 analytic Jena AG, Jena, Germany) equipped with a nitrous oxide-acetylene flame and a 50 mm burner. The nitrous oxide (99.0% v/v, White Martins, Brazil) flow-rate was  $370 \text{ L h}^{-1}$  and acetylene (99.0% v/v, White Martins, Brazil) flow-rate was  $180 \text{ L h}^{-1}$ . The observation height was 5.0 mm and aspiration rate  $6.0 \text{ mL min}^{-1}$ . The absorbance signal was measured using the center pixels and the pixel  $\pm 1$  of the main calcium analytical line at

422.673 nm. The standard solution for calibration curve ( $0.05 - 1.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) were prepared daily by appropriate dilution of a stock standard solutions of  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  Calcium (Specsol, Brazil). The samples were analyzed in triplicate, and peak height was used to evaluate the absorbance. Calcium concentration was calculated using the linear equation regression, from the calibration curve (absorbance versus Ca concentration). When necessary, samples were diluted with ultrapure water, in order to fit at the concentration range of calibration curve.

### Statistical analysis

A descriptive and inferential statistical analysis was performed, considering the variables: growth inhibition zones, radiopacity, pH, calcium release and flow. The data were tabulated in Microsoft Excel 2010 Software. A normality test was performed to determine the distribution of the data, using the Shapiro-Wilk test. For statistical analysis, GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., California, USA) was used, with a significance level of 5%. The null hypotheses tested were:

- a) there is no difference among the inhibition zones produced by different pastes for each tested microorganism;
- b) there is no difference among the radiopacity of the tested materials;
- c) there is no difference among the pH values for the same pastes 24 hours, 7 days or 14 days after mixing;
- d) there is no difference among the calcium ion release values for the same pastes 24 hours, 7 days or 14 days after mixing;
- e) there is no difference among the pH values for different pastes, in the same period of evaluation (24h, 7 days, or 14 days);
- f) there is no difference among the calcium release values for different pastes, in the same period of evaluation (24h, 7 days, or 14 days);
- g) there is no difference between the flow values in different pastes.

### Results

**Figure 1** shows the antimicrobial effect of the pastes against *E. faecalis* and *C. albicans*. The antimicrobial effect of the pastes against *E. faecalis* depended on the presence of CHX. The addition of ZnO and  $\text{Ca(OH)}_2$  decreases the antimicrobial property of CHX

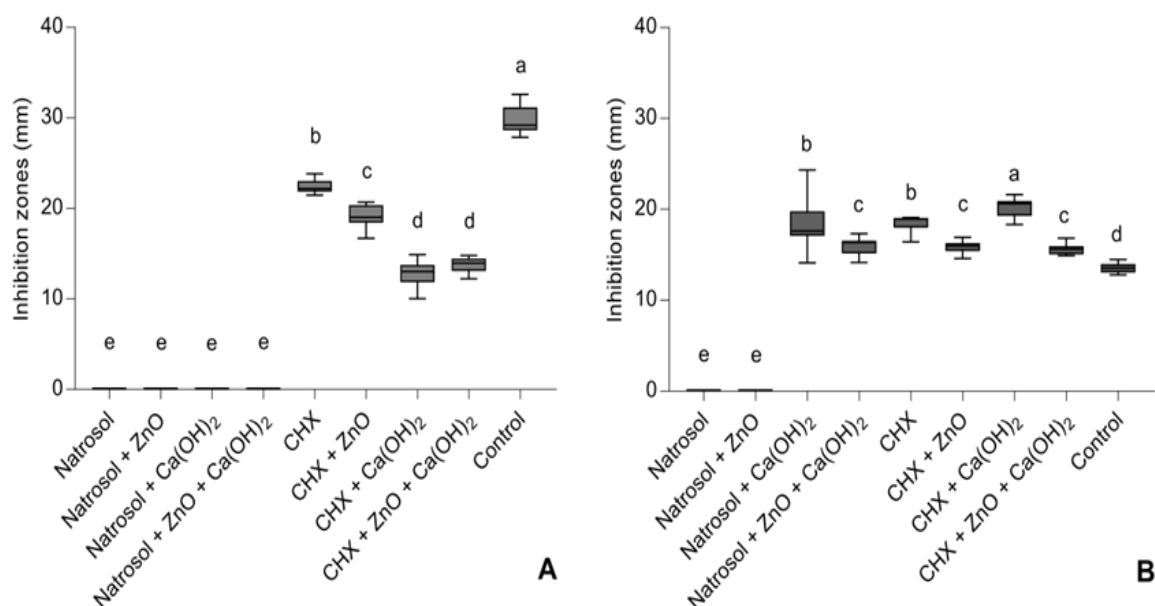


against *E. faecalis* (**Fig. 1-A**). The highest inhibition haloes for *Candida albicans* were associated with  $\text{Ca(OH)}_2$  + CHX. All the pastes demonstrated antimicrobial activity for *C. albicans*, except for the Natrosol + ZnO and Natrosol (**Fig. 1-B**).

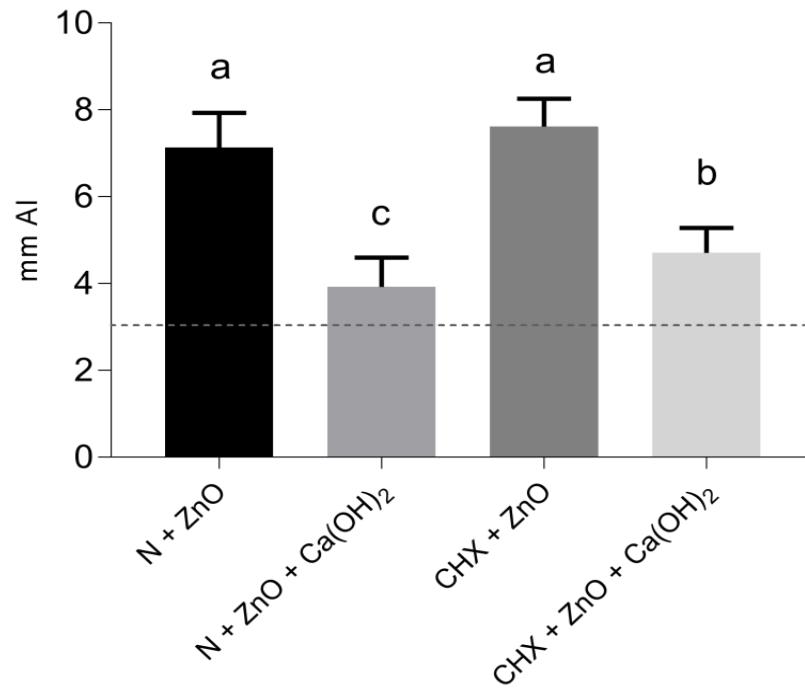
The groups Natrosol, Natrosol +  $\text{Ca(OH)}_2$ , CHX, CHX +  $\text{Ca(OH)}_2$  demonstrated radiopacity lower than 0.5 mm Al, therefore they were not considered in the figure 2. The addition of  $\text{Ca(OH)}_2$  reduced the radiopacity of the pastes containing ZnO. However, it remained higher than 3 mm Al (**Fig. 2**).

The pastes that did not contain  $\text{Ca(OH)}_2$  had no calcium ion release. Therefore, the calcium ion release for the groups Natrosol, Natrosol + ZnO, CHX and CHX + ZnO were near to zero in all experimental periods. The groups with  $\text{Ca(OH)}_2$  have a tendency to demonstrate higher calcium levels over the time. In 14 days, calcium values were the same for all groups that had  $\text{Ca(OH)}_2$  (**Fig. 3**). Considering the same paste, there is a tendency to increase the pH up to 14 days. Pastes containing  $\text{Ca(OH)}_2$  shows pH higher than 11 during the first 24 hours and pH higher than 12 at 7 and 14 days (**Fig. 4**).

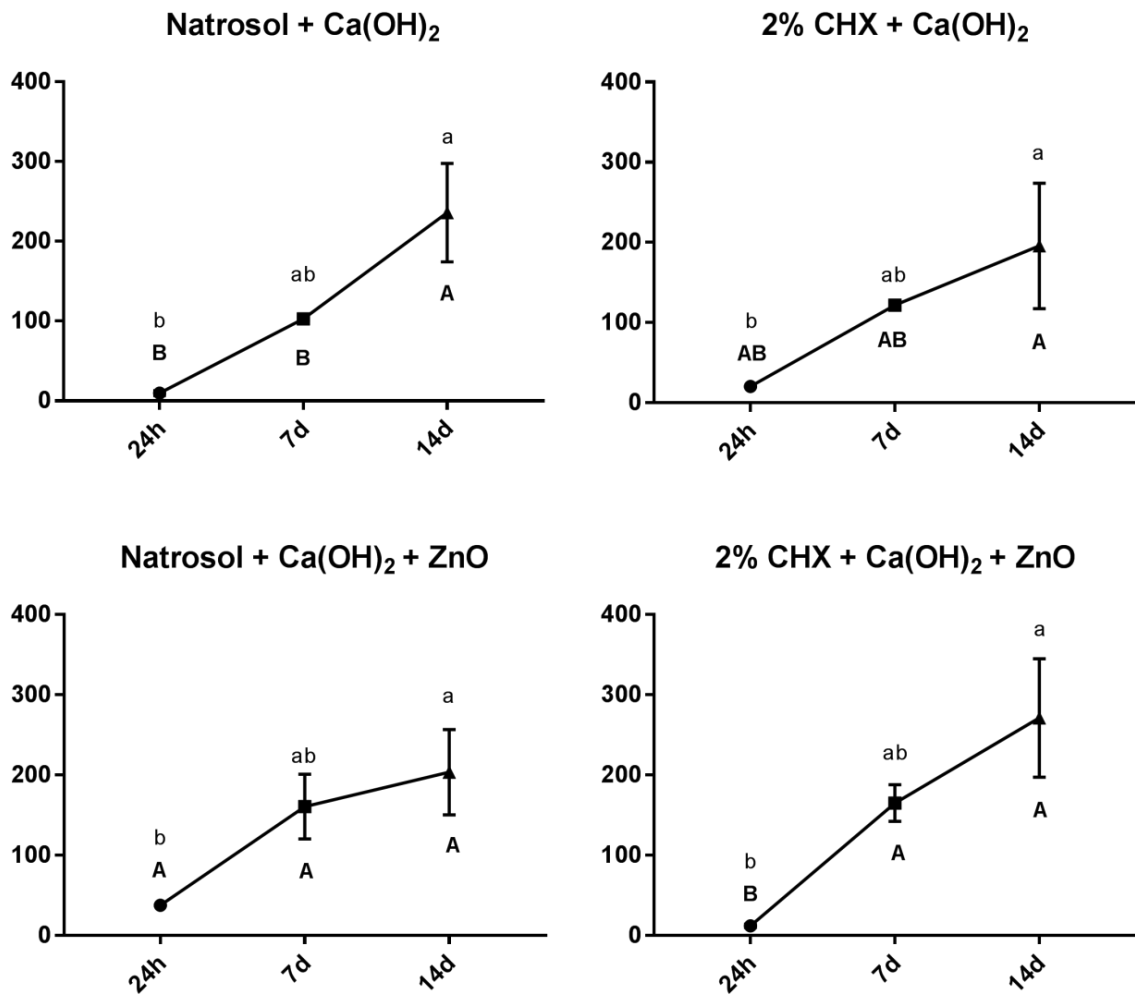
The flowability of the pastes was demonstrated in **Figure 5**. The groups with CHX had greater fluidity than natrosol when mixed only with  $\text{Ca(OH)}_2$  or ZnO. The groups Natrosol +  $\text{Ca(OH)}_2$ ; Natrosol +  $\text{Ca(OH)}_2$  + ZnO and CHX and CHX +  $\text{Ca(OH)}_2$  + ZnO showed no statistically significant differences in flow test.



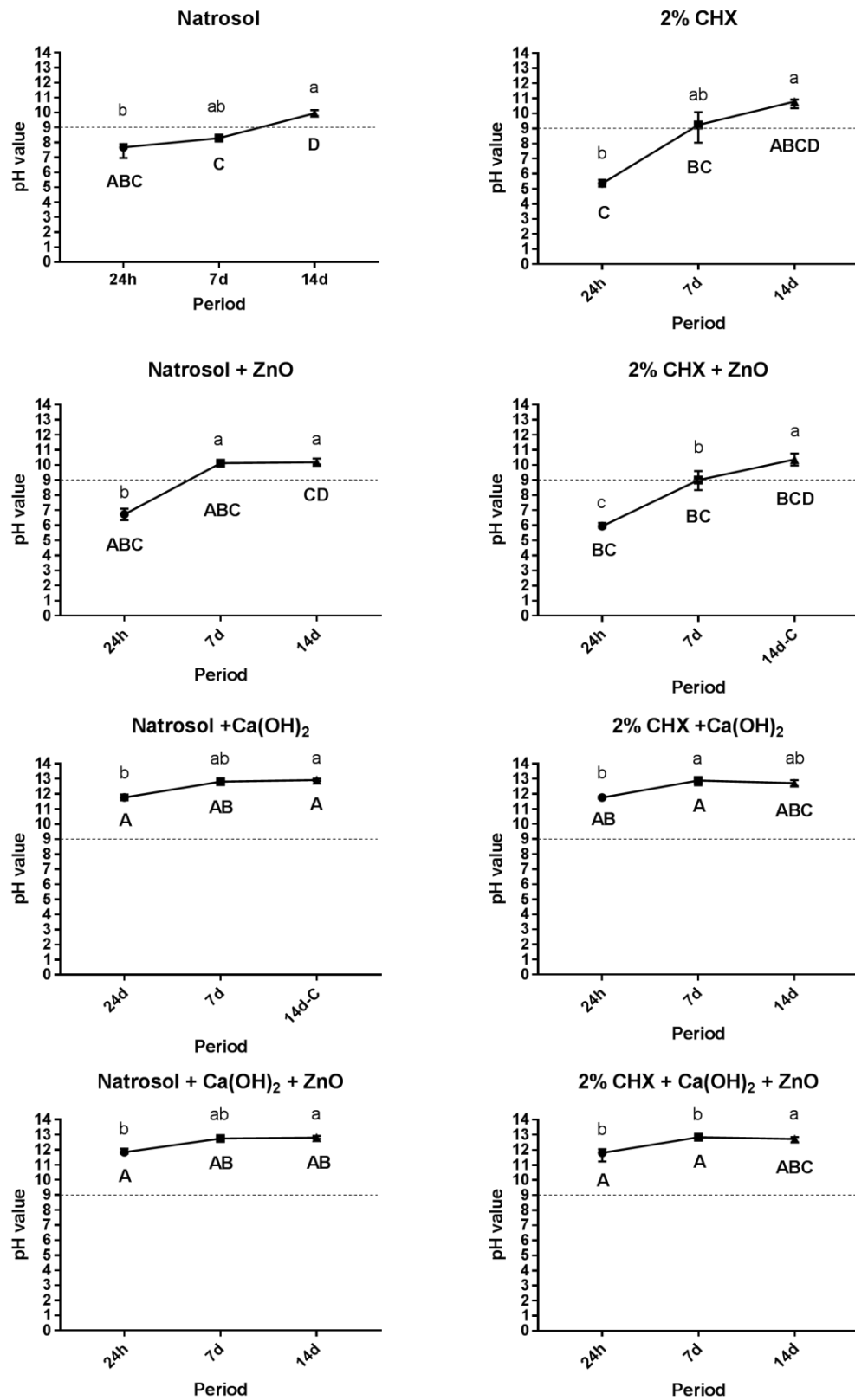
**Figure 1.** Growth inhibition zones produced by the tested pastes. A) *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); B) *Candida albicans* (ATCC 10231).



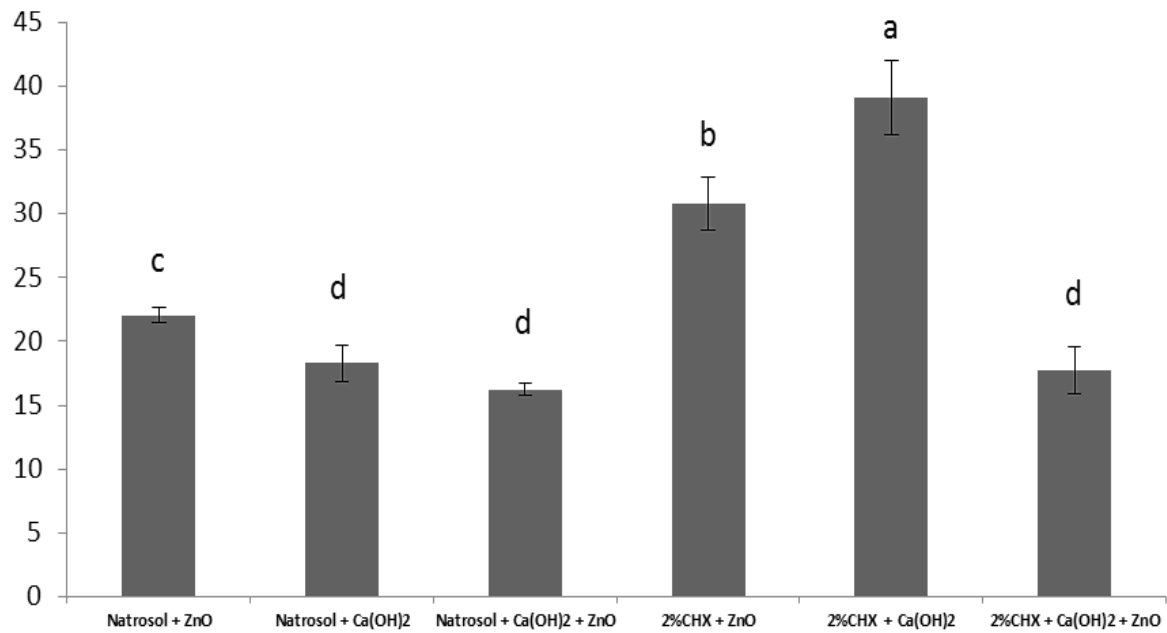
**Figure 2.** Radiopacity (mm Al) for different groups.



**Figure 3.** Calcium ion release for groups tested in the periods of 24 hours, 7 days and 14 days. The groups *Natrosol*, *Natrosol + ZnO*, *CHX* and *CHX + ZnO* were staying near to zero in all experimental periods. Different lowercase letters indicate statistically significant differences in the calcium ion release values of the same paste over the 3 periods (Friedmann test,  $P > .05$ ). Different uppercase letters indicate different calcium ion release values for different groups at the same time (24h, 7 or 14 days). (Kruskal-Wallis test, Dunn test,  $P > .05$ ).



**Figure 4.** pH values for groups tested in the periods of 24 hours, 7 days and 14 days. Different lowercase letters indicate statistically significant differences in the pH values of the same paste over the 3 periods (Friedmann test,  $P > .05$ ). Different uppercase letters indicate different pH values for different groups at the same time (24h, 7 or 14 days). (Kruskal-Wallis test, Dunn test,  $P > .05$ ). The dotted line indicates alkaline pH.



**Figure 5.** Flow values, in millimeters, for groups tested, different letters indicate statistically significant differences in the flowability among the pastes (Anova Tukey test,  $P > .05$ ).

## Discussion

Calcium hydroxide pastes exert a filling effect and function as a reservoir of calcium ions and hydroxyl. The hydroxyl ions must diffuse in the dentin in sufficient concentrations to reach the remaining microorganisms after the chemical-mechanical preparation and to alter the pH on the external root surface. If alkalization of dentin is not sufficient to eliminate microbial species that survive at high pH, an interesting alternative would be the addition of substances/vehicles that act on the microbial cells by other mechanisms. Siqueira *et al.* (2010), classify vehicles according to their antimicrobial property, in inert or biologically active. The biologically active vehicles confer additional antimicrobial effects to those provided by calcium hydroxide, in addition, the association of substances can improve physicochemical properties of calcium hydroxide such as radiopacity, flow ability, release of ions calcium.

Treatment plans for inflammatory external root resorption usually includes long-term calcium hydroxide therapy (Heithersay 2007). However, there is no consensus on the frequency for paste replacement and also on the need of paste replacement. An alternative to achieve the goal of apexification and to reduce the intensity of the inflammatory process

is the mixture of substances composed by  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , CHX and ZnO (de Jesus Soares *et al.* 2012; Soares *et al.* 2015).

In this study, to test the antimicrobial effect of the pastes, the agar diffusion method was used. The antimicrobial effect of the pastes to *E. faecalis* was observed only by the presence of CHX, its antimicrobial spectrum produced the largest mean inhibition zones. Accordingly to this study, it was observed that the antimicrobial action of CHX was reduced when combined to other substances. When CHX was associated with ZnO it showed an increase in the antimicrobial activity compared to pastes which contained  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . The effect of CHX on the bacteria occurs by adsorption to the surface, damaging the cell wall and to the cytoplasmic membrane, facilitating the entry into the cell, and by cytoplasmic precipitation, avoiding the repair of the membranes and the cell wall. Furthermore, CHX has a wide spectrum of antimicrobial activity with prolonged action (substantivity) (Davies 1973). Zinc oxide has a remarkable antimicrobial and anti-biofilm activity against oral bacteria (Tabrez Khan *et al.* 2013). *In vitro* studies have demonstrated that the associations with some substances, such as  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , urea and sulphate lauryl sodium, reduced the antimicrobial activity of CHX (Hauman and Love 2003; de Souza-Filho *et al.* 2008).

ZnO powder has been used for a long time as an active ingredient for dermatological applications in creams, lotions and ointments on account of its antibacterial properties (Sawai 2003). Jones *et al.* (2008), investigated *in vitro* the antibacterial activity and efficacy of regular zinc oxides, demonstrated that ZnO nanoparticles have a wide range of antibacterial effects on a number of other microorganisms. The synthesized of ZnO nanoparticles are able to slow down the bacterial growth as a result of disorganization for example the *E. coli* membranes, which increases the membrane permeability leading to the accumulation of nanoparticles in the bacterial membrane and cytoplasm regions of the cells (Brayner *et al.* 2006). A little is known about the antibacterial activity of nanoparticles of ZnO, possibilities of membrane damage caused by direct or electrostatic interaction between ZnO and cell surfaces, cellular internalization of ZnO nanoparticles, and the production of active oxygen species such as  $\text{H}_2\text{O}_2$  in cells due to metal oxides have been proposed (Fu *et al.* 2005). A plausible mechanism of ZnO inactivation of bacteria involves the direct interaction between ZnO nanoparticles and cell surfaces, which affects the permeability of membranes where nanoparticles enter and induce oxidative stress in

bacterial cells, subsequently resulting in the inhibition of cell growth and eventually in cell death (Xie *et al.* 2011).

As expected, the pastes containing ZnO showed higher levels of radiopacity. When the  $\text{Ca(OH)}_2$  was mixed the radiopacity values decreased, once calcium hydroxide has radiopacity values similar to dentin. Zinc oxide can act as a radiopacifier compound that could react with the  $\text{Ca(OH)}_2$ , modifying physical or antimicrobial properties, provides root canal sealing and, as a consequence, prevents contamination and allows periapical repair (Ordinola-Zapata *et al.* 2015).

To establish the pH variations and calcium ions release from calcium hydroxide pastes, this study used polyethylene cylindrical tubes, which were chosen to standardize the amount of the pastes. Atomic absorption spectrometry to determine calcium ions release has been successfully used in previous studies (Signoretti *et al.* 2011; Linhares *et al.* 2013). The antimicrobial action of calcium hydroxide is related to its alkaline pH. The change of dentinal pH caused by hydroxyl ions is slow and depends on several factors that can alter the rate of ionic dissociation and diffusion (Gomes *et al.* 2006). Pastes prepared with  $\text{Ca(OH)}_2$  and sterile water have an alkaline pH (>12.0). A tendency of an increase in the pH for the pastes was observed from the initial period to the 14-days period. The pastes containing  $\text{Ca(OH)}_2$  had pH values higher than 11 during the first 24 hours and pH higher than 12 at 7 and 14 days.

Tronstad *et al.* (1981) evaluated changes in pH in monkey teeth after four weeks of insertion of calcium hydroxide pastes. The pH values in the circumpulpal dentine and in the peripheral dentin oscillated between 8-11 and 7.4-9.0, respectively. The pH of the cement was not altered, however, in areas of reabsorption without cement, alkaline pH was still detected. Nerwich *et al.* (1993), showed in an *in vitro* study that the pH change in dentin occurs after application with a peak of 10-8 in the cervical region and 9-7 in the apical region. However, in the external region of the root the time is variable, from 24 hours to 2-3 weeks after insertion, with values close to 9.0 – 9.3. Ordinola-Zapata *et al.* (2015), demonstrated that pH level of calcium hydroxide pastes associated with radiopacifying agents (iodoform, zinc oxide, and barium sulfate), favored an alkalinity and maintained their pH around 9.0, with the exception of when  $\text{BaSO}_4$  was added. Probably, the  $\text{BaSO}_4$  was responsible for a reduction in the solubility of the paste.

The high pH values observed in the pastes that had calcium hydroxide has an important effect over both bacterial growth and the root resorption process. Growth at pH 8.5 was found to be stressful for microorganisms and this increase in pH is directly related to the maintenance or not by a persistent endodontic infection (Kayaoglu *et al.* 2005). This high pH demonstrated by the pastes with  $\text{Ca(OH)}_2$  has a destructive effect on bacterial cell membranes and protein structure. The pH effect is important to explaining the arresting and healing effect of calcium hydroxide on inflammatory root resorption. The presence of calcium ions is necessary for the activity of the complement system in the immunologic reaction calcium-dependent ATP-ase, which has been associated with hard tissue formation (Tronstad *et al.* 1981). The vehicle associated with the  $\text{Ca(OH)}_2$  determines the velocity of ionic dissociation, solubility, and diffusibility (de Andrade Ferreira *et al.* 2004). Some vehicles provide faster dissociation, and, consequently, faster alkalinity of dentin and periapical region, they may make the paste more caustic and aggressive in direct contact with (Fava and Saunders 1999). The pastes that did not contain  $\text{Ca(OH)}_2$  showed levels of calcium ions release near to zero in all experimental periods. The groups with  $\text{Ca(OH)}_2$ , have a tendency to higher calcium levels over the time and in fourteenth day calcium values were the same for all groups.

Natrosol is a biocompatible carbon polymer and a water-soluble substance that was used as a gel base for chlorhexidine gluconate (Ferraz *et al.* 2001).

Duarte *et al.* (2009), believe that the CHX gel added to  $\text{Ca(OH)}_2$  seems to interfere in  $\text{Ca}^{2+}$  ion release by the reaction of Natrosol and affirmed that calcium ions play an essential role in tissue mineralization by encouraging fibronectin gene expression. In this study, the paste with  $\text{Ca(OH)}_2$ , CHX and ZnO increased the ions release in longer periods of evaluation.

The ability to penetrate accessory canals and dentinal tubules in order to fill the smallest voids and prevent fluid percolation through the root canal system, is a concern in endodontics, and this ability is related to flow. The flow and film thickness are directly influenced by the composition of the paste, temperature and relative humidity (Collares *et al.* 2013). The paste composed with  $\text{Ca(OH)}_2$ , CHX and ZnO showed low flowability (Fig. 5.). This characteristic may favor its insertion inside the root canal, allowing for its complete filling, without voids. The provisional obturation paste may be kept for long periods of time inside root canal without changes, promoting decrease in clinical symptoms and signals. Additionally, it favors radiographic visualization (10,13). The maintenance of intracanal



medicament for long periods of time is also supported in literature (Steiner *et al.* 1968; Chawla 1986; Felipe *et al.* 2005).

## Conclusion

Despite the fact of being an *in vitro* study, after comparing the physicochemical properties and antimicrobial action, it was concluded that the Ca(OH)<sub>2</sub>-ZnO-chlorhexidine paste showed release of Ca, high pH, antimicrobial activity mainly due to the presence of CHX and Ca(OH)<sub>2</sub>. Although ZnO has promoted a reduction in the antimicrobial effect, it is important because it provides radiopacity, and it also contributes for the high density to the pastes.

## References

- Ahangari Z, Nasser M, Mahdian M, et al (2015) Interventions for the management of external root resorption. *Cochrane Database Syst Rev* CD008003. doi: 10.1002/14651858.CD008003.pub3
- Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC (2002) Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol* 18:134–137.
- Asgary S, Nosrat A, Seifi A (2011) Management of inflammatory external root resorption by using calcium-enriched mixture cement: a case report. *J Endod* 37:411–413. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.015
- Athanassiadis B, Abbott PV, George N, Walsh LJ (2009) An *in vitro* study of the antimicrobial activity of some endodontic medicaments and their bases using an agar well diffusion assay. *Aust Dent J* 54:141–146. doi: 10.1111/j.1834-7819.2009.01107.x
- Brayner R, Ferrari-Iliou R, Brivois N, et al (2006) Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett* 6:866–870. doi: 10.1021/nl052326h
- Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G (1985) The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1:170–175.
- Chawla HS (1986) Apical closure in a nonvital permanent tooth using one Ca(OH)<sub>2</sub> dressing. *ASDC J Dent Child* 53:44–47.
- Collares FM, Klein M, Santos PD, et al (2013) Influence of radiopaque fillers on physicochemical properties of a model epoxy resin-based root canal sealer. *J Appl Oral Sci Rev FOB* 21:533–539. doi: 10.1590/1679-775720130334

Cvek M (1992) Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. *Endod Dent Traumatol* 8:45–55.

Darcey J, Qualtrough A (2013) Resorption: part 1. Pathology, classification and aetiology. *Br Dent J* 214:439–451. doi: 10.1038/sj.bdj.2013.431

Davies A (1973) The mode of action of chlorhexidine. *J Periodontal Res Suppl* 12:68–75.

de Andrade Ferreira FB, Silva E Souza P de AR, do Vale MS, et al (2004) Evaluation of pH levels and calcium ion release in various calcium hydroxide endodontic dressings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97:388–392. doi: 10.1016/S1079210403005237

de Jesus Soares A, Yuri Nagata J, Casarin RCV, et al (2012) Apexification with a new intracanal medicament: a multidisciplinary case report. *Iran Endod J* 7:165–170.

de Souza-Filho FJ, Soares A de J, Vianna ME, et al (2008) Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J* 19:28–33.

Duarte MAH, Midená RZ, Zeferino MA, et al (2009) Evaluation of pH and calcium ion release of calcium hydroxide pastes containing different substances. *J Endod* 35:1274–1277. doi: 10.1016/j.joen.2009.05.009

Fava LR, Saunders WP (1999) Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J* 32:257–282.

Felippe MCS, Felippe WT, Marques MM, Antoniazzi JH (2005) The effect of the renewal of calcium hydroxide paste on the apexification and periapical healing of teeth with incomplete root formation. *Int Endod J* 38:436–442. doi: 10.1111/j.1365-2591.2005.00959.x

Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, et al (2001) In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod* 27:452–455.

Fu G, Vary PS, Lin C-T (2005) Anatase TiO<sub>2</sub> nanocomposites for antimicrobial coatings. *J Phys Chem B* 109:8889–8898. doi: 10.1021/jp0502196

Gomes BPF de A, Vianna ME, Sena NT, et al (2006) In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102:544–550. doi: 10.1016/j.tripleo.2006.04.010

Gomes BPF de A, Montagner F, Berber VB, et al (2009) Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent* 37:76–81. doi: 10.1016/j.jdent.2008.09.009

Hauman CHJ, Love RM (2003) Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J* 36:75–85.

- Heithersay GS (2007) Management of tooth resorption. *Aust Dent J* 52:S105-121.
- Herrera DR, Herrera CM, Lima AR, et al (2014) Repair of apical root resorption associated with periodontitis using a new intracanal medicament protocol. *J Oral Sci* 56:311–314.
- Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC (2008) Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 279:71–76. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.01012.x
- José Freitas Siqueira Jr, Isabela das Neves Rôças, Hélio Pereira Lopes (2010) Medicação intracanal. In: *Endodontia: biologia e técnica*, 3rd edn. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p 951
- Kayaoglu G, Erten H, Ørstavik D (2005) Growth at high pH increases *Enterococcus faecalis* adhesion to collagen. *Int Endod J* 38:389–396. doi: 10.1111/j.1365-2591.2005.00957.x
- Kinirons MJ, Srinivasan V, Welbury RR, Finucane D (2001) A study in two centres of variations in the time of apical barrier detection and barrier position in nonvital immature permanent incisors. *Int J Paediatr Dent* 11:447–451.
- Linhares G da S, Cenci MS, Knabach CB, et al (2013) Evaluation of pH and calcium ion release of a dual-cure bisphenol A ethoxylate dimethacrylate/mineral trioxide aggregate-based root-end filling material. *J Endod* 39:1603–1606. doi: 10.1016/j.joen.2013.08.013
- Malka VB, Hochscheidt GL, Larentis NL, et al (2015) A new in vitro method to evaluate radiopacity of endodontic sealers. *Dento Maxillo Facial Radiol* 44:20140422. doi: 10.1259/dmfr.20140422
- Marion, Jefferson J. C., Martellosso, Laiza Vicente, Nagata, Juliana Yuri, et al (2014) Suggesting a new therapeutic protocol for traumatized permanent teeth: Case report. <http://connection.ebscohost.com/c/case-studies/99590031/suggesting-new-therapeutic-protocol-traumatized-permanent-teeth-case-report>. Accessed 3 Apr 2017
- Nerwich A, Figdor D, Messer HH (1993) pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod* 19:302–306.
- Ordinola-Zapata R, Bramante CM, García-Godoy F, et al (2015) The effect of radiopacifiers agents on pH, calcium release, radiopacity, and antimicrobial properties of different calcium hydroxide dressings. *Microsc Res Tech* 78:620–625. doi: 10.1002/jemt.22521
- Sawai J (2003) Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. *J Microbiol Methods* 54:177–182.
- Signoretto FGC, Gomes BPF de A, Montagner F, et al (2011) Influence of 2% chlorhexidine gel on calcium hydroxide ionic dissociation and its ability of reducing endotoxin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 111:653–658. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.11.016
- Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G (1997) Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 30:297–306.

Soares A de J, Prado M do, Brazão MA, et al (2015) The biocompatibility of a new endodontic paste used in dental trauma. *Rev Odontol UNESP* 44:232–238. doi: 10.1590/1807-2577.0079

Steiner JC, Dow PR, Cathey GM (1968) Inducing root end closure of nonvital permanent teeth. *J Dent Child* 35:47–54.

Tabrez Khan S, Ahamed M, Al-Khedhairy A, Musarrat J (2013) Biocidal effect of copper and zinc oxide nanoparticles on human oral microbiome and biofilm formation. *Mater Lett* 97:67–70. doi: 10.1016/j.matlet.2013.01.085

Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, et al (1981) pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 7:17–21. doi: 10.1016/S0099-2399(81)80262-2

Xie Y, He Y, Irwin PL, et al (2011) Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 77:2325–2331. doi: 10.1128/AEM.02149-10

## **ARTIGO 2**

**Ca(OH)<sub>2</sub>-ZnO-chlorhexidine paste for filling teeth with dental trauma and root resorption: bioactivity, cytotoxicity and cellular proliferation properties**

Otávio da Silva Sposito <sup>1</sup>

Leticia Boldrin Mestieri <sup>1</sup>

Fabiana Soares Grecca <sup>1</sup>

Francisco Montagner <sup>1</sup>

*1 Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2492, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.*

**Running title:** Paste for filling teeth with dental trauma and root resorption

**Key words:** Calcium hydroxide, Zinc Oxide, Chlorhexidine, Root Resorption, Materials Testing, Cell Survival

**Correspondent author:**

Dr Francisco Montagner  
Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Rua Ramiro Barcelos, 2492, Bairro Santana – Porto Alegre, RS, Brazil  
PO Box 90035-003, Phone: +55 51 3308 5430  
E-mail: [francisco.montagner@ufrgs.br](mailto:francisco.montagner@ufrgs.br)

**Abstract**

**Aim** To analyze the bioactivity, cytotoxicity and cellular proliferation by a intracanal paste composed by  $\text{Ca(OH)}_2$ , 2% CHX and ZnO.

**Methodology** The study analyzed and compared bioactivity, cytotoxicity and cellular proliferation properties from intracanal pastes, as follow: a) Natrosol; b) Natrosol + ZnO; c) Natrosol +  $\text{Ca(OH)}_2$ ; d) Natrosol + ZnO +  $\text{Ca(OH)}_2$ ; e) CHX; f) CHX + ZnO; g) CHX +  $\text{Ca(OH)}_2$ ; h) CHX + ZnO +  $\text{Ca(OH)}_2$ . Data were statistical analyzed, following the normality test (Shapiro-Wilk test), with a significance level of 5%.

**Results** MTT assay demonstrated that all groups containing Natrosol in their composition showed results above or near the control line. SRB assay showed that all groups containing Natrosol, and also CHX +  $\text{Ca(OH)}_2$  and CHX +  $\text{Ca(OH)}_2$  + ZnO showed viability rates similar to the control line. Cell proliferation assay demonstrated the continuous closure of the wound according to time in all evaluated groups except for CHX group. ALP assay demonstrated increased enzyme activity according to time for all evaluated groups except for CHX. Alizarin Red S assay showed increased mineralized nodules formation according to the time at all groups containing  $\text{Ca(OH)}_2$  on its composition. Groups Natrosol and CHX did not show production of mineralized nodules for any tested period.

**Conclusions** Paste with CHX + ZnO +  $\text{Ca(OH)}_2$  demonstrated favorable biological effects such as bioactivity, cytotoxicity and cellular proliferation.

## Introduction

Traumatic dental injuries can cause damage to the periodontal ligament cells, and severe inflammatory response, which leads to root resorption (Asgary *et al.* 2011). A high prevalence of ankylosis and inflammatory resorption and has been reported, especially in cases of intrusive luxation or avulsion (Hecova *et al.* 2010). External root resorption due to dental trauma in permanent teeth, can be classified into three various types such as surface resorption, replacement resorption/ankylosis and inflammatory resorption (Andreasen 1987). Inflammatory resorption is always associated with necrosis and infection of the pulp (Pohl *et al.* 2005). Replacement resorption/ankylosis appears in injured teeth whose periodontal ligaments have been dried, destroyed or removed from the surface of the root (Fuss *et al.* 2003).

Tissue alterations have been described in the teeth with root resorption after dental trauma. Pettini & Pettini (1998) showed that human teeth with external inflammatory root resorption due to avulsion and replantation had severe resorption of the intertubular and peritubular dentin. There was also the presence of bacteria-like elements on the bottom of the excavations and within the root canal wall. However, tooth with replacement resorption exhibit eroded areas and less pronounced lacunae, that decreased towards the apex. There was also a, broad deep tubiform excavations at the apical margin, and fibrous structures along the margin, possibly belonging to the collagen network that became exposed after demineralization. Barbizam *et al.* (2015) reported that >20 minutes of extraoral dry time were detrimental for the cells from the periodontal ligament of dog teeth. Several areas of advanced osseous replacement resorption were combined with areas with lack of periodontal ligament.

The host immunological and inflammatory responses may influence the aspects of external root resorption in avulsed and replanted teeth. No association between the single nucleotide polymorphisms in the interleukin-1 gene cluster (IL1) and the occurrence and severity of inflammatory external root resorption was reported by Bastos *et al.* (2015). Roskamp *et al.* (2017) observed no association of clinical variables and single nucleotide polymorphisms in the interleukin 4 gene (IL4) and the prognosis of avulsed and replanted teeth. However, Bastos *et al.* (2017) detected differences in the immunologic profile between inflammatory and replacement external root resorption. Clinical parameters such

as severity of the condition, and age of the patient seemed to modulate the presence of some tested inflammatory molecules.

The occurrence of external root resorption might be influenced by factors associated to the tooth and also to the environment. In a stepwise discriminant function analysis, choice of treatment, root development, and degree of intrusion were significantly associated with the development of replacement resorption in intruded teeth (Tsilingaridis *et al.* 2016). The periodontal healing in avulsed and replanted teeth is affected by stage of root development, length of the dry extra-alveolar storage period, immediate replantation and length of the wet period (saliva or saline storage) (Andreasen *et al.* 1995).

A literature review on the intracanal dressings used in cases of tooth replantation after dental trauma showed that calcium hydroxide [Ca(OH)<sub>2</sub>] is usually recommended, as well its association with antibiotic or corticosteroid can be beneficial for the treatment of progressive root resorption and periodontal healing (Panzarini *et al.* 2012). In vitro studies have suggested that the intracanal medicaments may reach the external root surface, exerting both antimicrobial action (Gomes *et al.* 2009) and also tissue alcalinization (Tronstad *et al.* 1981; Nerwich *et al.* 1993). Chen *et al.* (2008) demonstrated that corticosteroids and corticosteroids and tetracycline may reduce the inflammatory reaction, including clastic-cells mediated resorption, thus promoting favorable healing. Thong *et al.* (2001), analyzed the periodontal response to intracanal medicaments in replanted monkey teeth and observed that periodontal ligament inflammation and inflammatory root resorption were markedly inhibited by Ca(OH)<sub>2</sub> and corticosteroid-antibiotic, but corticosteroid-antibiotic was slightly more effective than calcium hydroxide in producing a periodontal healing response. However, the corticosteroid-antibiotic pastes are not employed for long periods of time. Trope *et al.* (1995), indicated that root canal infection in the presence of cemental damage will predictably result in inflammatory root resorption. Furthermore, long-term Ca(OH)<sub>2</sub> dressing seemed to be more effective than the one-week treatment to established inflammatory root resorption.

Recently, Herrera *et al.* (2014), employed adense filling paste composed by Ca(OH)<sub>2</sub> powder, zinc oxide (ZnO) powder and 2% chlorhexidine gel (CHX) in teeth with apical root resorption. Soares *et al.* (2015), investigated the short-term subcutaneous tissue reaction of this endodontic paste composed by Ca(OH)<sub>2</sub>, CHX and ZnO. The results indicated that the paste is biocompatible. The presence of ZnO might be associated with low tissue irritation



and induced favorable tissue repair. Zinc oxide can reduce inflammatory reaction in granulation tissue, stimulate the healing of both chronic and acute wounds and can significantly increase re-epithelialization, the mitotic index of epidermal basal cells is stimulated by the topical application of ZnO (Santos *et al.* 2001). De Souza *et al.* (2000) examined the effects of ZnO and other metal ions on the activity of the major matrix metalloproteinases that have been implicated in several pathogenic processes. It was shown that the activity of oral tissue MMPs may be modulated by metal ions present in the oral environment mainly by ZnSO<sub>4</sub> that showed a strong inhibitor.

Although the association of Ca(OH)<sub>2</sub>, 2% CHX and ZnO can be advantageous for the endodontic treatment due to the increased synergic antimicrobial effect, the biological properties of this paste has not been widely investigated. The aim of this study was to analyze the bioactivity, cytotoxicity and cellular proliferation by this intracanal paste.

### Materials and Methods

The present study was approved by the Research Committee from the School of Dentistry of Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS, Porto Alegre, Brazil) (Protocol number 31550).

The tested pastes were prepared using calcium hydroxide p.a. [Ca(OH)<sub>2</sub>] (Sigma-Aldrich Brazil LTDA, SP, Brazil), zinc oxide p.a. (ZnO) (Sigma Aldrich), 2% chlorhexidine gluconate gel (2% CHX) (Endogel, Itapetinga, SP, Brazil) and natrosol gel [Natrosol] (Endogel). This study analyzed and compared *in vitro* the biological properties of the following intracanal pastes:

- a) Natrosol (75 µl);
- b) Natrosol (75 µl) + ZnO (84 mg);
- c) Natrosol (75 µl) + Ca(OH)<sub>2</sub> (48 mg);
- d) Natrosol (75 µl) + ZnO (84 mg) + Ca(OH)<sub>2</sub> (48 mg);
- e) 2% CHX (CHX) (75 µl);
- f) 2% CHX (75 µl) + ZnO (84 mg);
- g) 2% CHX (75 µl) + Ca(OH)<sub>2</sub> (48 mg); and,
- h) 2% CHX (75 µl) + ZnO (84 mg) + Ca(OH)<sub>2</sub> (48 mg).

## Cell culture

Osteoblast-like cells derived from human osteosarcoma (Saos-2, ATCC HTB-85) were grown as monolayer cultures in cell culture flasks (T-75, Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) containing Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma Aldrich), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, ThermoFisher Inc., Waltham, MA, USA) and 1% solution of penicillin and streptomycin (PenStrep, Gibco) at a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, and 95% humidity environment.

## Preparation of the medicaments

The medicaments were mixed according to the proportions described above, and 1 mL of each paste was individually placed in wells of a 12-well plate (n = 4 wells per paste) (TPP, Techno Plastic Products, Zollstrasse, Trasadingen, Switzerland) and spread to completely fill the bottom. The plate were immediately filled with 5 mL DMEM supplemented with 1% PenStrep per well and incubated at 37°C, 95% humidity and 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours, in order to obtain the pastes' extracts (Mestieri *et al.* 2015).

## Citotoxicity assays

For cytotoxicity assays,  $1 \times 10^4$  cells per well were plated in 96-well plates (TPP) and 24h after plating, cells were exposed to the pastes' extracts at 0.1% dilution using DMEM supplemented with 10% FBS and 1% PenStrep. Viability was accessed by the following assays after 24h of extracts exposure.

For the MTT assay, 10  $\mu$ L of a 5 mg/mL MTT solution (Sigma-Aldrich) were added to each well of the culture plate, which were incubated at 37°C, 95% humidity and 5% CO<sub>2</sub> for 3h. After this time, the contents of the wells were removed and the colorimetric product solubilized in 100  $\mu$ L of 0.04 N acidified isopropanol (Sigma-Aldrich). The optical density of the solutions was measured in a spectrophotometer (ThermoFisher) at 570 nm wavelength (Gomes-Cornélio *et al.* 2016).

In the SRB Assay, the cells were fixed with 10% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich) and stained with a 0.4% SRB dye solution (Sigma-Aldrich) for 1h. The plate were washed with a 1% acetic acid (Sigma-Aldrich) solution and the resulting colorimetric product solubilized in 100  $\mu$ L of 10 mmol Tris solution (Sigma-Aldrich) and the samples analyzed in a spectrophotometer (ThermoFisher) at 560 nm wavelength (Visioli *et al.* 2014).

### **Bioactivity Assays**

For bioactivity assays,  $1 \times 10^4$  cells per well were plated in 24-well plates (TPP) and 24h after plating, cells were exposed to the pastes' extracts at 0.1% dilution, using DMEM supplemented with 10% FBS and 1% PenStrep. Bioactivity was accessed by the following assays after 1, 7 and 14 days of extracts exposure.

To evaluate the activity of the alkaline phosphatase enzyme (ALP) a colorimetric kit (Fosfatase Alcalina, Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil) were used. After the experimental periods, the cells were lysed with 1.0 mL of a 0.1% sodium dodecyl-sulfate solution (SDS, Sigma-Aldrich), following the manufacturer's instructions. The absorbance was measured in a spectrophotometer (ThermoFisher) at 590 nm wavelength (Mestieri *et al.* 2017).

For the Alizarin Red S assay, the cells were fixed with a 10% formaldehyde solution (Sigma-Aldrich), stained with Alizarin Red S 2% dye and washed with distilled water. The culture plate wells were photographed and the mineralized nodules were measured in specific software (ImageJ, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Results were expressed as the percentage of mineralized area (Salles *et al.* 2012).

### **Cell Proliferation Assay**

To assess cell proliferation capacity, cells were plated at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells per well 12-well culture plates (TPP). After 24h incubation at 37°C, 95% humidity and 5% CO<sub>2</sub>, two defects were created in the cell monolayer, perpendicular to each other, using a P200 pipette tip (TPP). Culture medium was replaced by the medium containing the pastes' extracts at 1% concentration. Using a microscope (Axio Observer Z1, Zeiss, Göttingen, Germany) coupled to a camera (AxioCam mRN, Zeiss) with 10x magnifying lenses (Eclan-Neofluar 10x / 0.3 aperture, Zeiss), photos were taken every 24h from four different places of the defects, until the period of 72h. The scratch area was measured through specific software (ImageJ, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Results were expressed in percentage according to the wound closure (Pellicoli *et al.* 2014).

### **Data analysis**

All assays were performed in triplicate and repeated two independent times. The data were statistical analyzed, following the normality test (Shapiro-Wilk test). Statistical

analysis was carried out with the software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), at a 5% level of significance.

## Results

### Cytotoxicity assays

The results for the cytotoxicity assays are demonstrated in **Figure 1**. MTT assay demonstrated that all groups containing Natrosol in their composition showed results above or near the control line, with no differences among them ( $P > 0.05$ ). 2% CHX group exhibited a viability rate lower than 50%, differing from Natrosol group ( $P < 0.05$ ). CHX + ZnO, CHX +  $\text{Ca(OH)}_2$  and CHX +  $\text{Ca(OH)}_2$  + ZnO groups showed results similar to the control line. No difference among the pastes that had 2% CHX or Natrosol in their composition was observed ( $P > 0.05$ ). SRB assay showed that all groups containing Natrosol, and also CHX +  $\text{Ca(OH)}_2$  and CHX +  $\text{Ca(OH)}_2$  + ZnO showed viability rates similar to the control line ( $P > 0.05$ ). The CHX and the CHX + ZnO demonstrated the lower viability rates (near 50%).

### Cell proliferation assay

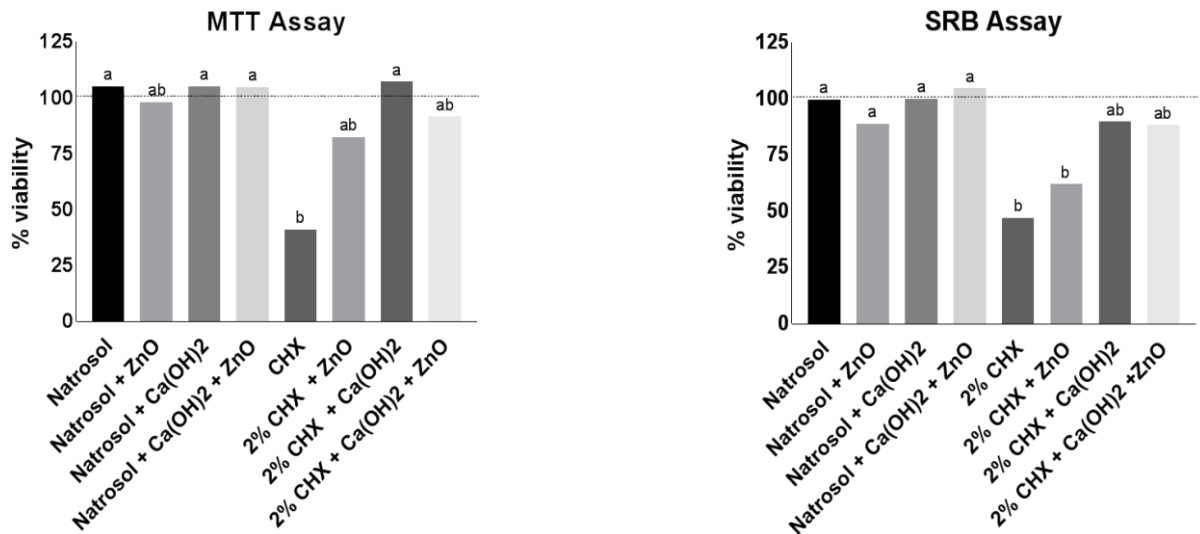
The cell proliferation assay (**Fig. 2**) demonstrated the continuous closure of the wound according to time in all evaluated groups except for CHX, whose wound maintained almost 100% open in all evaluated periods ( $P < 0.05$ ). Most favorable results were found in the 72h period for all evaluated groups. At 72h, the CHX group was statically different from CHX +  $\text{Ca(OH)}_2$  and CHX +  $\text{Ca(OH)}_2$  + ZnO and Natrosol +  $\text{Ca(OH)}_2$  + ZnO groups ( $P < 0.05$ ) and similar to the other evaluated groups ( $P > 0.05$ ).

### Bioactivity assays

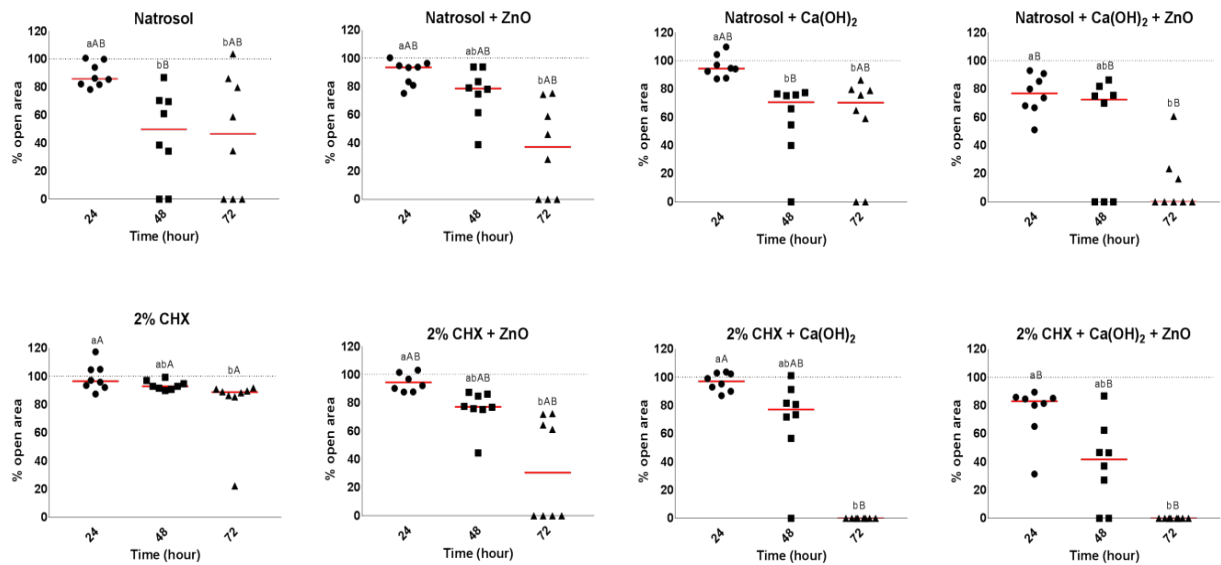
ALP assay (**Fig. 3**) demonstrated increased enzyme activity according to time for all evaluated groups except for CHX, whose activity significantly decreased at the 7 days period ( $P < 0.05$ ). At the 1 day period, the control group was similar to all the other groups, except for [Natrosol +  $\text{Ca(OH)}_2$  + ZnO], [CHX + ZnO] and [CHX +  $\text{Ca(OH)}_2$ ] ( $P < 0.05$ ). At the 7 and 14 days there was a reduction in the enzyme activity for CHX and (CHX+Zn) when compared to the other groups.

Alizarin Red S assay (**Fig. 4**) showed increased mineralized nodules formation according to the time at all groups containing  $\text{Ca(OH)}_2$  on its composition. Among these

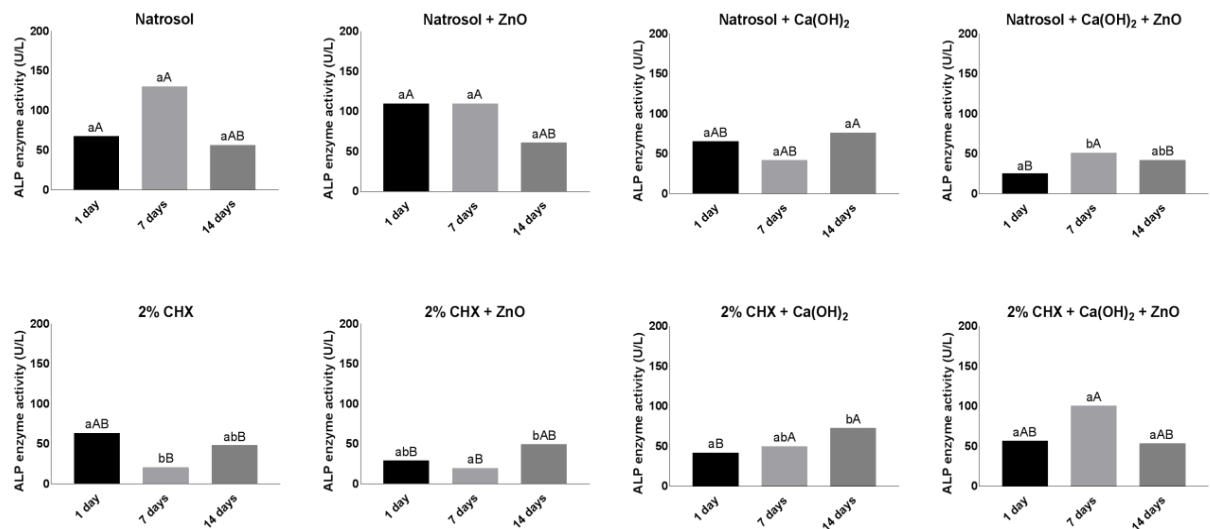
groups, CHX + Ca(OH)<sub>2</sub> + ZnO exhibited the highest rate, with no differences between the others ( $P > 0.05$ ). The groups Natrosol + ZnO and CHX + ZnO showed low deposition of mineralized nodules over time, and any deposition at the 14 period. The groups Natrosol and CHX were excluded from **Figure 4** because they did not show production of mineralized nodules for any tested period.



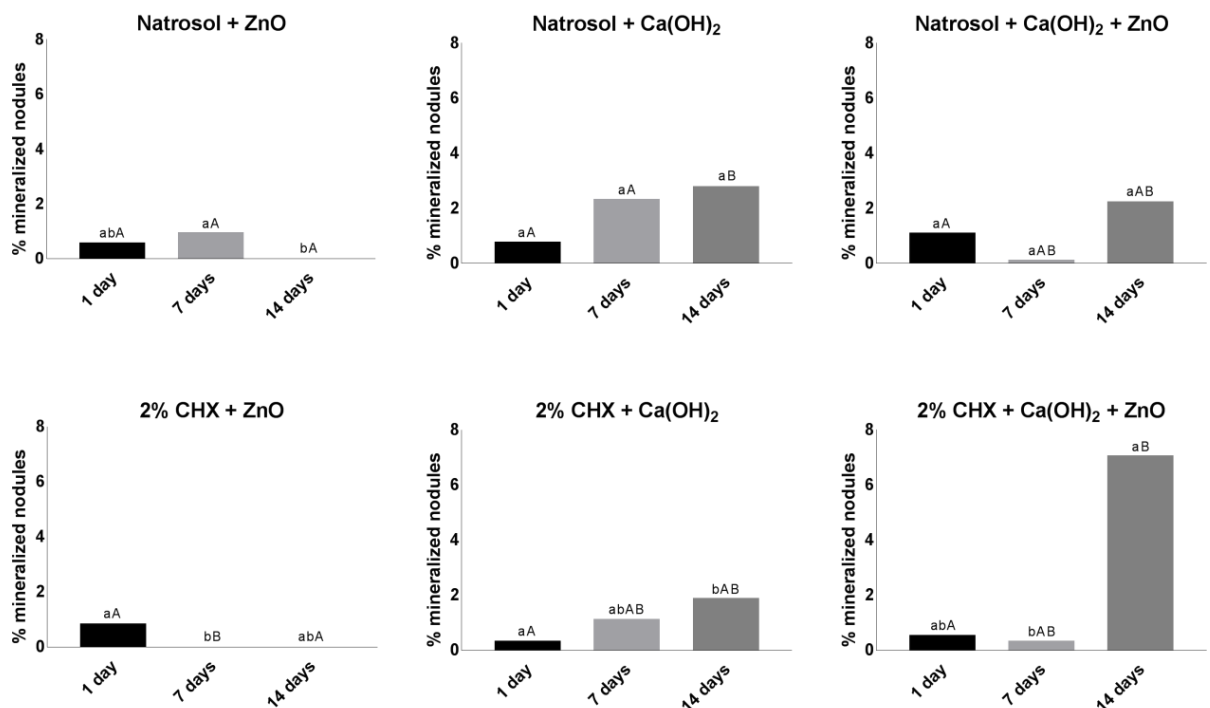
**Figure 1.** Results of cytotoxicity assays. \*Different lowercase letters represents statistical difference between the evaluated pastes in each assay.



**Figure 2.** Results of scratch assay. \*Different lowercase letters represent statistical difference in the same paste at different periods. Different uppercase letters represent statistical difference in the same periods at different pastes.



**Figure 3.** Results of ALP assay. \*Different lowercase letters represent statistical difference in the same paste at different periods. Different uppercase letters represent statistical difference in the same period at different pastes.



**Figure 4.** Results of Alizarin Red S assay. \*Different lowercase letters represent statistical difference in the same paste at different periods. Different uppercase letters represent statistical difference in the same period at different pastes.

## Discussion

Decision-making in inflammatory external root resorption after dental trauma is a challenge in clinical practice. According to International Association of Dental Traumatology

(IADT), calcium hydroxide is recommended as an intra-canal medication, followed by root canal filling with an acceptable material after dental avulsion and replantation. An antibiotic-corticosteroid paste can also be used with anti-inflammatory function. However all recommendations are not based on a high level evidences, and the guidelines should therefore be seen as the best evidence and practice based on literature research and professionals' opinion (Andersson *et al.* 2012). Calcium hydroxide is one of the most versatile medications especially for its use as an intracanal dressing. The association of  $\text{Ca(OH)}_2$  with CHX it has already been investigated and CHX seemed to enhance the antimicrobial effect of  $\text{Ca(OH)}_2$  (Gomes *et al.* 2003; Sirén *et al.* 2004). The mixture of  $\text{Ca(OH)}_2$ , CHX and ZnO is an alternative that has a low-cost, is easy-to-use, has a high radiopacity, and promotes hard tissue deposition. (de Souza-Filho *et al.* 2008; de Jesus Soares *et al.* 2012). Furthermore, it can be employed as a dense paste, reducing its apical absorption and the need for paste renewal.

Several methods have been used to evaluate *in vitro* the cytotoxicity. The MTT assay allows for determining the cell's metabolic activity by mitochondrial activity (Mosmann 1983). The SRB assay evaluates cells viability by the analysis of cell's protein content (Vichai and Kirtikara 2006). The association between different assays to access viability *in vitro* is important to decrease the false-positive outcomes, which may occur due to most of cytotoxicity assays measure cell's metabolic activity, not necessarily cell viability, allowing for detecting the presence of viable cells with low metabolic activity (Rodríguez-Lozano *et al.* 2017). In this study, either cytotoxicity assays had the same response pattern for all evaluated groups at 0.1% and 1% extract concentrations. Both MTT and SRB assays showed lower results CHX group. When chlorhexidine is associated with zinc oxide and calcium hydroxide [ $\text{CHX} + \text{ZnO} + \text{Ca(OH)}_2$  group], the viability increases, indicating that cells have been stimulated by this combination. Da Silva *et al.* (2008) evaluated the effect of a calcium hydroxide-based paste (Calen, Dentsply, York, PE, USA) associated to 0.4% chlorhexidine digluconate on a macrophage cell line culture. The addition of chlorhexidine to the medicament did not alter cell viability and the immunostimulating and anti-inflammatory properties.

Scratch assay was first described by Liang *et al.* (2007). It could mimic the extent of cells' migration *in vivo* during the wound healing. This assay has already been used in the evaluation of endodontic sealers (Gomes-Cornélio *et al.* 2016), irrigant solutions (Blattes et

al. 2017) and pulp-capping materials (Yu *et al.* 2016). The cell adhesion and migration are fundamental during the apical tissue repair associated with root resorption. In this study, most favorable results were found in the 72h period for all evaluated groups. The CHX group was statically different after 72h period from [CHX + Ca(OH)<sub>2</sub>], [CHX + Ca(OH)<sub>2</sub> + ZnO] and [Natrosol + Ca(OH)<sub>2</sub> + ZnO] groups. It has been found that CHX reduce the gingival fibroblasts adhesion to fibronectin an important extracellular matrix protein associated with tissue regeneration. CHX reduces cell proliferation in a dose-dependent manner. Cells treated with 0.12% chlorhexidine digluconate experienced complete inhibition of proliferation (Cline and Layman 1992). The inhibitory effect of CHX on cellular proliferation is concentration dependent, and it does not depend on the duration of CHX exposure. Due its substantivity, CHX can reduce the migration capacity of human fibroblasts even in a 10% concentration of the 0.12% (Tsourounakis *et al.* 2013).

The alkaline phosphatase (ALP) is an enzyme present in the plasmatic membrane, which is found in bone, liver and in attachments of the dental organ, like the dental pulp and dental follicle. ALP is one of the main markers of cellular osteoblastic activity, and it allows for evaluating the bioactivity of materials to promote repair by tissue mineralization (Rosa and Beloti 2005). ALP is a recognized marker of osteoblast differentiation and it is an essential enzyme in hydroxyapatite nucleation process (Salles *et al.* 2012). ALP assay demonstrated increased enzyme activity according to time for all evaluated groups except for CHX group, whose activity significantly decreased at the 7 days period. The induce of mineralization in human Saos-2 cell culture system was observed only in the groups containing Ca(OH)<sub>2</sub> on its composition, with an increase in mineralized nodules formation according to the time. The results also suggested that the incorporation of ZnO to the Ca(OH)<sub>2</sub> has improved the mineralization capacity of the pastes. Calcium hydroxide is able to promote hard tissue formation due to its dissociation into Ca<sup>+2</sup> and OH<sup>-</sup>. The increase in the local pH may initiate the mineralization process, due to its effect on enzymatic pathways. Ca(OH)<sub>2</sub> has also been shown to enhance bone metabolism processes, including collagen synthesis, glycolysis, and protein synthesis (Jaunberzins *et al.* 2000).

Soares *et al.* (2015), investigated the biocompatibility of this endodontic paste in subcutaneous tissue of rats, and showed favorable results regarding biocompatibility and may be explained by the presence of zinc oxide that presented low tissue irritation and induced favorable tissue repair. Zinc is an essential trace element in the human body and its



importance in health and disease is appreciated. It serves as a cofactor in numerous transcription factors and enzyme systems including zinc-dependent matrix metalloproteinases that augment autodebridement and keratinocyte migration during wound repair (Lansdown *et al.* 2007). Good results with respect to tissue repair were found, probably due to its anti-oxidant power, anti-inflammatory potential and tissue repair activity (Cunha *et al.* 2011).

## Conclusion

This study showed that the paste with CHX + ZnO + Ca(OH)<sub>2</sub> demonstrated favorable biological effects such as bioactivity, cytotoxicity and cellular proliferation. Although this is an *in situ* study, these properties are essential for the remineralization and tissue repair process.

## References

- Andersson L, Andreasen JO, Day P, et al (2012) International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol* 28:88–96. doi: 10.1111/j.1600-9657.2012.01125.x
- Andreasen JO (1987) Experimental dental traumatology: development of a model for external root resorption. *Endod Dent Traumatol* 3:269–287.
- Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM (1995) Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumatol* 11:76–89.
- Asgary S, Nosrat A, Seifi A (2011) Management of inflammatory external root resorption by using calcium-enriched mixture cement: a case report. *J Endod* 37:411–413. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.015
- Barbizam JVB, Massarwa R, da Silva LAB, et al (2015) Histopathological evaluation of the effects of variable extraoral dry times and enamel matrix proteins (enamel matrix derivatives) application on replanted dogs' teeth. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol* 31:29–34. doi: 10.1111/edt.12131
- Bastos JV, Côrtes MIS, Silva JFC, et al (2015) A study of the interleukin-1 gene cluster polymorphisms and inflammatory external root resorption in replanted permanent teeth. *Int Endod J* 48:878–887. doi: 10.1111/iej.12384

Bastos JV, Silva TA, Colosimo EA, et al (2017) Expression of Inflammatory Cytokines and Chemokines in Replanted Permanent Teeth with External Root Resorption. *J Endod* 43:203–209. doi: 10.1016/j.joen.2016.10.018

Blattes GBF, Mestieri LB, Böttcher DE, et al (2017) Cell migration, viability and tissue reaction of calcium hypochlorite based-solutions irrigants: An in vitro and in vivo study. *Arch Oral Biol* 73:34–39. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.08.037

Chen H, Teixeira FB, Ritter AL, et al (2008) The effect of intracanal anti-inflammatory medicaments on external root resorption of replanted dog teeth after extended extra-oral dry time. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol* 24:74–78. doi: 10.1111/j.1600-9657.2006.00483.x

Cline NV, Layman DL (1992) The effects of chlorhexidine on the attachment and growth of cultured human periodontal cells. *J Periodontol* 63:598–602. doi: 10.1902/jop.1992.63.7.598

Cunha SA, Rached FJA, Alfredo E, et al (2011) Biocompatibility of sealers used in apical surgery: a histological study in rat subcutaneous tissue. *Braz Dent J* 22:299–305.

da Silva RAB, Leonardo MR, da Silva LAB, et al (2008) Effect of a calcium hydroxide-based paste associated to chlorhexidine on RAW 264.7 macrophage cell line culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106:e44-51. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.06.027

de Jesus Soares A, Yuri Nagata J, Casarin RCV, et al (2012) Apexification with a new intracanal medicament: a multidisciplinary case report. *Iran Endod J* 7:165–170.

de Souza AP, Gerlach RF, Line SR (2000) Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater* 16:103–108.

de Souza-Filho FJ, Soares A de J, Vianna ME, et al (2008) Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J* 19:28–33.

Fuss Z, Tsesis I, Lin S (2003) Root resorption--diagnosis, classification and treatment choices based on stimulation factors. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol* 19:175–182.

Gomes BPFA, Montagner F, Berber VB, et al (2009) Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent* 37:76–81. doi: 10.1016/j.jdent.2008.09.009

Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, et al (2003) Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J* 36:267–275.

Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Mestieri LB, et al (2016) Cytotoxicity and genotoxicity of calcium silicate-based cements on an osteoblast lineage. *Braz Oral Res*. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0048

Hecova H, Tzigkounakis V, Merglova V, Netolicky J (2010) A retrospective study of 889 injured permanent teeth. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol* 26:466–475. doi: 10.1111/j.1600-9657.2010.00924.x

Herrera DR, Herrera CM, Lima AR, et al (2014) Repair of apical root resorption associated with periodontitis using a new intracanal medicament protocol. *J Oral Sci* 56:311–314.

Jaunberzins A, Gutmann JL, Witherspoon DE, Harper RP (2000) Effects of calcium hydroxide and transforming [correction of tumor] growth factor-beta on collagen synthesis in subcultures I and V of osteoblasts. *J Endod* 26:494–499.

Lansdown ABG, Mirastschijski U, Stubbs N, et al (2007) Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 15:2–16. doi: 10.1111/j.1524-475X.2006.00179.x

Liang C-C, Park AY, Guan J-L (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2:329–333. doi: 10.1038/nprot.2007.30

Mestieri LB, Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, et al (2015) Biocompatibility and bioactivity of calcium silicate-based endodontic sealers in human dental pulp cells. *J Appl Oral Sci Rev FOB* 23:467–471. doi: 10.1590/1678-775720150170

Mestieri LB, Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, et al (2017) Cytotoxicity and Bioactivity of Calcium Silicate Cements Combined with Niobium Oxide in Different Cell Lines. *Braz Dent J* 28:65–71. doi: 10.1590/0103-6440201700525

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63.

Nerwich A, Figdor D, Messer HH (1993) pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod* 19:302–306.

Panzarini SR, Trevisan CL, Brandini DA, et al (2012) Intracanal dressing and root canal filling materials in tooth replantation: a literature review. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol* 28:42–48. doi: 10.1111/j.1600-9657.2011.01023.x

Pellicoli ACA, Martins MD, Dillenburg CS, et al (2014) Laser phototherapy accelerates oral keratinocyte migration through the modulation of the mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biomed Opt* 19:028002. doi: 10.1117/1.JBO.19.2.028002

Pettini F, Pettini P (1998) Root resorption of replanted teeth: an SEM study. *Endod Dent Traumatol* 14:144–149.

Pohl Y, Filippi A, Kirschner H (2005) Results after replantation of avulsed permanent teeth. II. Periodontal healing and the role of physiologic storage and antiresorptive-regenerative therapy. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol* 21:93–101. doi: 10.1111/j.1600-9657.2004.00298.x

Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, et al (2017) Evaluation of cytocompatibility of calcium silicate-based endodontic sealers and their effects on the biological responses of mesenchymal dental stem cells. *Int Endod J* 50:67–76. doi: 10.1111/iej.12596

Rosa AL, Beloti MM (2005) Development of the osteoblast phenotype of serial cell subcultures from human bone marrow. *Braz Dent J* 16:225–230. doi: /S0103-64402005000300010

Roskamp L, Trevilatto PC, Souza CM, et al (2017) Analysis of the association of clinical factors and IL4 gene polymorphisms with root resorption in avulsed teeth after 1 year of replantation. *Int Endod J*. doi: 10.1111/iej.12797

Salles LP, Gomes-Cornélio AL, Guimarães FC, et al (2012) Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J Endod* 38:971–976. doi: 10.1016/j.joen.2012.02.018

Santos MC, Souza AP, Gerlach RF, et al (2001) Inhibition of human gelatinases (matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9) activity by zinc oxide: a possible mechanism to enhance wound healing. *Br J Dermatol* 145:854–855.

Sirén EK, Haapasalo MPP, Waltimo TMT, Ørstavik D (2004) In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci* 112:326–331. doi: 10.1111/j.1600-0722.2004.00144.x

Soares A de J, Prado M do, Brazão MA, et al (2015) The biocompatibility of a new endodontic paste used in dental trauma. *Rev Odontol UNESP* 44:232–238. doi: 10.1590/1807-2577.0079

Thong YL, Messer HH, Siar CH, Saw LH (2001) Periodontal response to two intracanal medicaments in replanted monkey incisors. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol* 17:254–259.

Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, et al (1981) pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 7:17–21. doi: 10.1016/S0099-2399(81)80262-2

Trope M, Moshonov J, Nissan R, et al (1995) Short vs. long-term calcium hydroxide treatment of established inflammatory root resorption in replanted dog teeth. *Endod Dent Traumatol* 11:124–128.

Tsilingaridis G, Malmgren B, Andreasen JO, et al (2016) Scandinavian multicenter study on the treatment of 168 patients with 230 intruded permanent teeth - a retrospective cohort study. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol* 32:353–360. doi: 10.1111/edt.12266

Tsourounakis I, Palaiologou-Gallis AA, Stoute D, et al (2013) Effect of essential oil and chlorhexidine mouthwashes on gingival fibroblast survival and migration. *J Periodontol* 84:1211–1220. doi: 10.1902/jop.2012.120312

Vichai V, Kirtikara K (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* 1:1112–1116. doi: 10.1038/nprot.2006.179

Visioli F, Wang Y, Alam GN, et al (2014) Glucose-regulated protein 78 (Grp78) confers chemoresistance to tumor endothelial cells under acidic stress. *PLoS One* 9:e101053. doi: 10.1371/journal.pone.0101053

Yu F, Dong Y, Yang Y-W, et al (2016) Effect of an Experimental Direct Pulp-capping Material on the Properties and Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *Sci Rep* 6:34713. doi: 10.1038/srep34713

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O traumatismo dentário pode originar o aparecimento das mais diversas alterações pulpares, desde infecções pulpares reversíveis, irreversíveis, necroses pulpares, e reabsorções radiculares internas, externas ou apicais. Em casos de traumatismo com luxações severas ou avulsão ocorre dano ao ligamento periodontal, cemento, pré-cemento e resto epiteliais de Malassez expondo a superfície radicular. Enquanto a reabsorção radicular inflamatória está relacionada diretamente a extensão do dano ao periodonto na hora do trauma e a presença de bactérias nos túbulos dentinários e no canal radicular, a reabsorção substitutiva dependerá da viabilidade das células do ligamento periodontal (FINUCANE & KINIRONS, 2003; ANDERSSON, 2013).

A maioria dos tratamentos para as reabsorções radiculares inflamatórias e por substituição envolvem longos períodos com uso de medicação intracanal, sendo que o material de escolha normalmente é o hidróxido de cálcio e necessita ser renovado conforme o passar do tempo (FELIPPE et al., 2005). Neste trabalho analisamos propriedades biológicas e físico-químicas de uma pasta que foi utilizada em relatos prévios da literatura em casos de traumatismos (HERRERA et al., 2014; SOARES et al., 2012; SOARES & SOUZA-FILHO, 2011). Esta pasta é utilizada como material obturador, não necessitando de trocas periódicas devido a sua consistência mais densa, sendo composta pela associação do hidróxido de cálcio + óxido de zinco + gel de clorexidina 2%.

Conforme citado no decorrer deste trabalho existem estudos de caso controle e estudos *in vivo* com esta pasta, porém pouco se sabe da influência de cada um dos componentes e o papel que eles desempenham no reparo tecidual, vantagens e desvantagens de cada componente. Realizamos uma série de testes *in vitro* tais como: bioatividade, citotoxicidade, proliferação celular, atividade antimicrobiana, radiopacidade, fluidez, liberação de cálcio e pH.

O “Artigo 1” demonstrou as propriedades antimicrobianas e físico-químicas da pasta de  $\text{Ca(OH)}_2 + \text{ZnO} + \text{CHX}$ , com relação a atividade antimicrobiana, o componente mais eficaz contra o crescimento bacteriano foi a clorexidina, principalmente para microrganismo anaeróbio facultativo (*Enterococcus faecalis*), e com a adição do  $\text{Ca(OH)}_2$  a inibição contra fungo (*Candida albicans*) é aumentada. Por apresentar uma consistência mais densa tipo uma “massa de vidraceiro”, em

áreas de reabsorção a presença da pasta composta por  $\text{Ca(OH)}_2 + \text{ZnO} + \text{CHX}$  provavelmente seja mais estável, possibilitando a sua presença por um período de tempo maior do que o de medicações de aspecto menos denso como o caso de medicações compostas por  $\text{Ca(OH)}_2$  + veículos (hidrossolúveis e oleosos). Quando analisamos a radiopacidade das pastas, o óxido de zinco mostra-se indispensável, pois confere níveis maiores que 3 mm de Al, o que torna a pasta bastante radiopaca ao exame radiográfico. Uma das propostas é a permanência da pasta por longos períodos de tempo, quando comparada especialmente com o  $\text{Ca(OH)}_2$ , o ZnO possibilita a visualização da presença da pasta dentro do canal. Em relação a liberação de íons cálcio e pH, mais uma vez notamos que a presença do hidróxido de cálcio é fundamental, pois ele é o principal responsável pelo aumento de pH das pastas com o passar do tempo. Tal fato é imprescindível para a ativação da fosfatase alcalina, enzima que tem a capacidade de induzir os íons fosfato a reagirem com os íons cálcio, formando precipitados de fosfato de cálcio (hidroxiapatita), fato que caracteriza o processo de mineralização.

Já no “Artigo 2”, demonstrou-se a capacidade de proliferação celular, de bioatividade e também o potencial de citotoxicidade desta pasta *in situ*. No teste de proliferação celular *in situ* observamos que após 72h a pasta com  $\text{Ca(OH)}_2 + \text{ZnO} + \text{CHX}$  promoveu a cicatrização da ferida, e ainda mostrou os melhores resultados em relação ao teste de bioatividade e mineralização conforme a análise pelo meio do método de Alizarin Red S e ALP. Em relação aos testes de citotoxicidade, MTT e SRB, quando a clorexidina esta presente, a pasta apresenta valores de viabilidade celular menores que 50%, porém com a adição de ZnO ou de  $\text{Ca(OH)}_2$  a viabilidade celular atinge níveis similares ao grupo controle. É sabido que o óxido de zinco possui ação anti-séptica, adstringente, secativa e anti-inflamatória, o que poderia favorecer o resultado previamente descrito.

Apesar da maioria dos protocolos odontológicos de atendimento estarem estabelecidos na literatura, segundo as diretrizes da Associação Internacional de Traumatologia Dentária (IADT), em muitos relatos de casos de trauma os dados coletados na literatura não demonstram respostas conclusivas quanto aos protocolos de utilização de medicamentos intracanal. Em relação ao tratamento endodôntico destes dentes traumatizados a IADT ainda cita que o sistema de canais radiculares deve ser preenchido com um material aceitável (ANDERSSON et al.,

2012). Então, as recomendações baseam-se também na opinião de consenso dos grupos de trabalho e da experiência clínica de cada profissional.

Os resultados de Soares (2007), demonstraram que a associação do  $\text{Ca(OH)}_2 + \text{ZnO} + \text{CHX}$ , mostrou-se eficaz no tratamento de dentes traumatizados, tanto em casos de formação radicular completa, quanto em casos de rizogênese incompleta. Do ponto de vista clínico, a pasta obturadora promoveu a redução na porcentagem de todos os sintomas e sinais clínicos observados inicialmente como: dor espontânea, fístula, abscesso, mobilidade e sensibilidade à percussão.

Portanto, após a revisão de literatura e também com base nos resultados deste estudo, pode-se descrever qual a importância e a ação de cada componente da pasta composta por  $\text{Ca(OH)}_2 + \text{ZnO} + \text{CHX}$ . Demonstrou-se que esta pode ser uma alternativa concreta para a obturação do sistema de canais radiculares de dentes acometidos por reabsorção dentária inflamatória ou substitutiva, pois ela possui boas propriedades biológicas e físico-químicas para tratamento do sistema de canais radiculares.



## REFERÊNCIAS

- AGREN MS, CHVAPIL M, FRANZEN L. Enhancement of re-epithelialization with topical zinc oxide in porcine partial-thickness wounds. *J Surg Res*, v.5, n.2, p.101-5, 1991.
- ALMYROUDI A, MACKENZIE D, MCHUGH S, SAUNDERS WP. The Effectiveness of Various Disinfectants Used as Endodontic Intracanal Medications: An In Vitro Study. *J Endod*, v.28, n.3, p.163-7, 2002.
- ANDERSSON L. Epidemiology of traumatic dental injuries. *Pediatr Dent*, v.35, n.2, p.102-5, 2013.
- ANDERSSON L, ANDREASEN JO, DAY P, HEITHERSAY G, TROPE M, DIANGELIS AJ, KENNY DJ, SIGURDSSON A, BOURGUIGNON C, FLORES MT, HICKS ML, LENZI AR, MALMGREN B, MOULE AJ, TSUKIBOSHI M, INTERNATIONAL ASSOCIATION OF DENTAL TRAUMATOLOGY. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol*, v.28, n.2, p.88-96, 2012.
- ANDREASEN JO, ANDREASEN FM. Avulsões. Fundamentos de traumatismo dental. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2001.
- ANDREASEN JO, ANDREASEN FM. Avulsões. Texto e atlas colorido de traumatismo dental. São Paulo: Artmed; 2001.
- ANDREASEN JO, HJØRTING-HANSEN E. Replantation of teeth: I Radiographic and clinical study of 110 human teeth replanted after accidental loss. *Acta Odont Scand*. v.24, n.3, p.263-86, 1966.
- ASGARY S, NOSRAT A, SEIFI A. Management of Inflammatory External Root Resorption by Using Calcium-enriched Mixture Cement: A Case Report. *JOE*. v.37 p.411- 413, 2011.
- ATHANASSIADIS B, ABBOTT PV, GEORGE N, WALSH LJ. An in vitro study of the antimicrobial activity of some endodontic medicaments and their bases using an agar well diffusion assay. *Aust Dent J*. v.54, n.2, p.141-6, 2009.
- BASRANI B.; GHANNEM A.; TJADERHANE L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. *J Endod*, v.30, n.6, p.413-7, 2004.
- BYSTROM A.; CLAESSION 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, 1985.
- ÇALISKAN M.K.; TURKUN M. Periapical repair and apical closure of a pulpless tooth using calcium hydroxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.84, n.6, p.683-7, 1997.

CHU F.C.; LEUNG W.K.; TSANG P.C.; CHOW T.W.; SAMARANAYAKE L.P. Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings. *J Endod.* v.32, n.1, p.17-23. 2006.

DAMETTO, FR; FERRAZ CC; GOMES BPFA; ZAIA, AA; TEIXEIRA FB; SOUZA-FILHO, FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg. Oral Med Oral Pathol.* n.99, p.768-72, 2005.

DELGADO RJ, GASPAROTO TH, SIPERT CR, PINHEIRO CR, MORAES IG, GARCIA RB, BRAMANTE CM, CAMPANELLI AP, BERNARDINELLI N. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* v.36, n.8, p.1389-93, 2010.

DUARTE M.A.; DEMARCHI A.C.; YAMASHITA J.C.; KUGA M.C.; FRAGA Sde C. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v.95, n.3, p.345-347, 2003

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

ESTRELA C.; SYDNEY G.B.; BAMMANN L.L.; FELIPPE Jr. O. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. *Rev. Fac. Odontol. Bauru*, v. 2, n.4, p. 29-36, 1994.

ESTRELA C.; SYDNEY G.B.; PESCE H.F.; FELIPPE Jr. Dentinal diffusion of hydroxyl ions of various calcium hydroxide pastes. *Braz Dent J*, v.6, n.1, p.5–9, 1995.

ESTRELA C.; LOPES H.P.; FELIPPE Jr.O. Chemical study of calcium carbonate present in various calcium hydroxide samples. *Braz. Endod. J*, v.2, n.2, 1997.

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

FAVA L.R.G.; SAUNDERS W.P. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J*, v.32, n.4, p.257-282, 1999.

FELIPPE MCS, FELIPPE WT, MARQUES MM, ANTONIAZZI JH. The effect of the renewal of calcium hydroxide paste on the apexification and periapical healing of teeth with incomplete root formation. *Int Endod J*, v.38, n.7, p.436–442, 2005.

FINUCANE D & KINIRONS MJ. External inflammatory and replacement resorption of luxated, and avulsed replanted permanent incisors: a review and case presentation. *Dent Traumatol.* v.19, n.3, p.170-4, 2003.

GANDOLFI M.G.; TADDEI P.; SIBONI F.; MODENA E.; CIAPETTI G.; PRATI C. Development of the foremost light-curable calcium-silicate MTA cement as root-end

in oral surgery. Chemical-physical properties, bioactivity and biological behavior. *Dent Mater*, v.27, n.7, p.134-57, 2011.

GOMES BPFA, CARVALHO SS, FERRAZ CC, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ. In vitro antibacterial activity chlorhexidine gel and calcium hydroxide separately and combined on infected bovine root dentine in vitro. *Int Endod J*. v.36, n.4, p.267-75, 2003.

GOMES BPFA, VIANNA ME, SENA NT, ZAIA AA, FERRAZ CCR, SOUZA-FILHO FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. v.102, n.4, p.544-50, 2006.

GOMES BP, MONTAGNER F, BERBER VB, ZAIA AA, FERRAZ CC, DE ALMEIDA JF, SOUZA-FILHO FJ. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent*. v.37, n.1, p.76-81, 2009.

HELING I.; SOMMER M.; STEINBERG D.; FRIEDMAN M.; SELA M.N. Microbiological evaluation of efficacy of chlorhexidine in sustained release device for dentine sterilization. *Int Endod J*, v.25, n.1, p.15-9, 1992.

HERRERA DR, HERRERA CM, LIMA AR, NAGATA JY, PEREIRA AC, SILVA EJ, SOARES AJ, GOMES BP. Repair of apical root resorption associated with periodontitis using a new intracanal medicament protocol. *J Oral Sci*. v.56, n.4, p.311-4, 2014.

JIN L, MURAKAMI TH, JANJUA NA, HORI Y. The effect of zinc oxide and diethyldithiocarbamate on the mitotic index of epidermal basal cells of mouse skin. *Acta Med Okayama*, v.48, n.5, p.231-6, 1994.

LANSDOWN ABG, MIRASTSCHIJSKI U, STUBBS N, SCANLON E, AGREN MS. Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*, v.15, n.1, p.2-16, 2007.

LEONARDO MR, SILVA LAB, TONAMARU FILHO M, BONIFÁCIO KC, ITO IY. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in Endodontics. *J Endod*. v.26, n.7, p.391-394, 2000.

LEONARDO MR, SILVA LAB, LEONARDO RT, UTRILLA LS, ASSED S. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. *J Endod*, v.19, n.7, p.348-52, 1993.

LINDSKOG S, PIERCE AM, BLONLÖF L. Chlorhexidine as a root canal medicament for treating inflammatory lesions in the periodontal space. *Endod Dent Traumatol*. n.14, p.186-190, 1998.

LOPES HP, COSTA FILHO AS, JONES JUNIOR J. O emprego do hidróxido de cálcio associado ao azeite de oliva. *RGO*, v.34, n.4, p.306-13, 1986.

LOPES HP, SIQUEIRA JR JF. Endodontia. Biologia e Técnica. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2011.

MOHAMMADI Z, DUMMER PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*, v.44, n.8, p.697–730, 2011.

MOORER WR, GENET JM. Antibacterial activity of gutta-percha cones attributed to the zinc oxide component. *Oral Surg*. v.53, n.5, p.508-517, 1982.

NEELAKANTAN P, SANJEEV K, SUBBARAO CV. Duration-dependent susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide and chlorhexidine gel used as intracanal medicament: an in vitro evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.104, n.4, p.138-141, 2007.

NERWICH A, FIGDOR D, MESER HH. pH changes in root dentine over a 4 week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod*, v.19, n.6, p.302-306, 1993.

OKABE T, SAKAMOTO M, TAKEUCHI H, MATSUSHIMA K. Effects of pH on mineralization ability of human dental pulp cells. *J Endod*, v.32, n.3, p.198-201, 2006.

ORDINOLA-ZAPATA R, BRAMANTE CM, GARCÍA-GODOY F, MOLDAUER BI, GAGLIARDI MINOTTI P, TERCÍLIA GRIZZO L, DUARTE MA. The effect of radiopacifiers agents on pH, calcium release, radiopacity, and antimicrobial properties of different calcium hydroxide dressings. *Microsc Res Tech*, v.78, n.7, p.620–5, 2015.

PACIOS MG, DE LA CASA ML, DE BULACIO M LOS A, LÓPEZ ME. Influence of different vehicles on the pH of calcium hydroxide pastes. *J Oral Sci*, v.46, n.2, p.107–11, 2004.

PETERS L. B.; VAN WINKELHOFF A. J.; BUIJS J. F.; WESSELINK P. R. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periradicular bone lesions. *Int Endod J*, v.35, n.1, p.13–21, 2002.

PIZZO G, GIAMMANCO GM, CUMBO E, NICOLOSI G, GALLINA G. *In vitro* antibacterial activity of endodontic sealers. *J Dent*. V.34, n.1, p.35-40, 2006.

SAFAVI K., NAKAYAMA T.A. Influence of mixing vehicle on dissociation of calcium hydroxide in solution. **J Endod**, v.26, n.11, p.649-51, 2000.

SANTOS MC, SOUZA AP, GERLACH RF, TABCHOURY CM, LINE SR. Inhibition of human gelatinases (matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9) activity by zinc oxide: a possible mechanism to enhance wound healing. *Br J Dermatol*, v.145, n.5 p.854-5, 2001.

SIGNORETTI FG, GOMES BP, MONTAGNER F, BARRICHELLO TOSELLO F, JACINTO RC. Influence of 2% chlorhexidine gel on calcium hydroxide ionic dissociation and its ability of reducing endotoxin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.111, n.5, p.653-8, 2011.

SILVA RAB DA, ASSED S, NELSON-FILHO P, SILVA LAB DA, CONSOLARO A. Subcutaneous tissue response of isogenic mice to calcium hydroxide-based pastes with chlorhexidine. *Braz Dent J*, v.20, n.2, p.99–106, 2009.

SILVEIRA CF DE M, CUNHA RS, FONTANA CE, DE MARTIN AS, GOMES BPF DE A, MOTTA RHL, DA SILVA BUENO CE. Assessment of the antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine paste and other intracanal medications against bacterial pathogens. *Eur J Dent*. V.5, n.1, p.1–7, 2011.

SILVEIRA LFM, GONÇALVES LB, DAMIAN MF, CRUZ LER, XAVIER CB, MARTOS J. Frequência de reabsorção radicular inflamatória decorrente de trauma em dentes anteriores. *RFO Passo Fundo*. v.18, n.2, p.185-92, 2013.

SIQUEIRA JR JF, RÔÇAS IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. n.97, p.85-94, 2004.

SIQUEIRA JR JF, RÔÇAS IN, LOPES HP, MAGALHÃES FAC, UZEDA M. Elimination of *Candida albicans* infection of the radicular dentin by intracanal medications. *J Endod*. n.29, p.501-4, 2003.

SÓ MVR, SILVA LAB, LEONARDO MR, FIGUEIREDO JAP, PROCHNOW E. Calcium Hydroxide Pastes: pH values and release of calcium ions. *Giornale Italiano di Endodonzia*, v. 19, p. 235-238, 2005.

SOARES A.J. Análise clínica e radiográfica de dentes traumatizados submetidos a um protocolo de medicação intracanal com a associação hidróxido de cálcio, clorexidina gel 2% e óxido de zinco, sem trocas periódicas. 2007. 130f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, São Paulo.

SOARES AJ & SOUZA-FILHO FJ. Traumatized teeth submitted to a new intracanal medication protocol. *Brazilian Journal of Dental Traumatol*. v.2, n.2, p.1-5, 2011.

SOARES AJ, PRADO M DO, BRAZÃO MA. The biocompatibility of a new endodontic paste used in dental trauma. *Rev Odontol UNESP*, v.44, n.4, p.232-238, 2015.

SOARES AJ, YURI NAGATA J, CASARIN RC, FLÁVIO AFFONSO DE ALMEIDA J, GOMES BP, AUGUSTO ZAIA A, RANDI FERRAZ CC, JOSÉ DE SOUZA-FILHO F. Apexification with a new intra-canal medicament: a multidisciplinary case report. *Iran Endod J*. v.7, n.3, p.165-70, 2012.

SOUZA AP, GERLACH RF, LINE SRP. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater*, v.16, n.2, p.103-8, 2000.

SOUZA-FILHO FJ, SOARES ADE J, VIANNA ME, ZAIA AA, FERRAZ CC, GOMES BP. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J*. v.19, n.1, p.28-33, 2008.

SPANGBERG LSW. Instruments, materials and devices. In: Cohen S, Burns RC, eds. *Pathways of the Pulp*. 7 ed, St Louis: CV Mosby p.508-10, 1998.

STEINER JC, DOW PR, CATHEY GM. Inducing root and closure of nonvital permanent teeth. *J Dent Chil*, v.35, n.1, p.47-54, 1968.

TRONSTAD L, ANDREASSEN JO, HASSELGREN G, KRISTERSON L, RIIS I. PH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod*, v. 7, n.1, p.17-21, 1981.

WALTIMO T, ØRSTAVIK D, SIREN E, HAAPASALO M. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J*, v.32, n.6, p.421-9, 1999.

## ANEXO

## Aprovação pela Comissão de Pesquisa em Odontologia - COMPESQ

Sistema Pesquisa - Aluno

https://www1.ufrgs.br/PortalServidor/Pesquisa/Aluno/forms/form\_index.php

Sistema Pesquisa - Pesquisador: Otávio Da Silva Sposito

**Dados Gerais:**

<b>Projeto N°:</b>	31550	<b>Título:</b>	ANALISE DE PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DE PASTA INTRACANAL COMPOSTA POR HÍDROXIDO DE CÁLCIO, ÓXIDO DE ZINCO E CLOREXIDINA GEL 2%	
<b>Área de conhecimento:</b>	Endodontia	<b>Início:</b>	19/09/2016	<b>Previsão de conclusão:</b> 18/09/2018
<b>Situação:</b>	Projeto em Andamento			
<b>Origem:</b>	Faculdade de Odontologia Programa de Pós-Graduação em Odontologia	<b>Projeto da linha de pesquisa:</b> BIOMATERIAIS E TÉCNICAS TERAPÊUTICAS EM ODONTOLOGIA		
<b>Local de Realização:</b>	não informado			
<b>Não apresenta relação com Patrimônio Genético ou Conhecimento Tradicional Associado.</b>				
<b>Objetivo:</b>	<p> frente aos microorganismos <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 e <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277. A citotoxicidade e a bioatividade serão determinadas in vitro, por meio dos ensaios SRB e atividade da enzima fosfatase alcalina, respectivamente. O teste in vitro de scratch será empregado para verificar a capacidade de migração celular após a exposição às pastas. Será determinada ainda a radiopacidade das mesmas. Os dados obtidos serão tabulados e submetidos à análise estatística.</p>			

**Palavras Chave:**  
ENDODONTIA, MEDICAÇÃO INTRACANAL

**Equipe UFRGS:**

<b>Nome:</b> FRANCISCO MONTAGNER Coordenador - Início: 19/09/2016 Previsão de término: 18/09/2018
<b>Nome:</b> FABIANA SOARES GRECCA VILELLA Pesquisador - Início: 19/09/2016 Previsão de término: 18/09/2018
<b>Nome:</b> Leticia Boldrin Mestieri Outra: Aluno de Doutorado - Início: 19/09/2016 Previsão de término: 18/09/2018
<b>Nome:</b> MARIA GORETI RODRIGUES VALE Pesquisador - Início: 19/09/2016 Previsão de término: 18/09/2018
<b>Nome:</b> MORGANA BAZZAN DESSUY Pesquisador - Início: 19/09/2016 Previsão de término: 18/09/2018
<b>Nome:</b> Otávio da Silva Sposito Outra: Aluno de Doutorado - Início: 19/09/2016 Previsão de término: 18/09/2018

**Avaliações:**  
**Comissão de Pesquisa de Odontologia - Aprovado** em 11/07/2016 [Clique aqui para visualizar o parecer](#)

**Anexos:**

<a href="#">Projeto Completo</a>	<b>Data de Envio:</b> 30/06/2016
<a href="#">Outro</a>	<b>Data de Envio:</b> 22/06/2016
<a href="#">Concordância de Instituição</a>	<b>Data de Envio:</b> 30/06/2016

UFRGS

Projetos

Bolsas

Programa de Fomento à Pesquisa (auxílio)

Windows

Digite aqui para pesquisar

POR PTB2 21:18 31/07/2017