

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ENDODONTIA

NATÁLIA DELFINO PACHECO

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA SÍLICA NANOPARTICULADA UTILIZADA COMO
MEDICAÇÃO INTRACANAL EM CANAIS RADICULARES INFECTADOS COM *ENTEROCOCCUS
FAECALIS***

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

NATÁLIA DELFINO PACHECO

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA SÍLICA NANOPARTICULADA
UTILIZADA COMO MEDICAÇÃO INTRACANAL EM CANAIS RADICULARES
INFECTADOS COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Linha de Pesquisa: Etiopatogênese, tratamento e repercussões sistêmicas das
doenças periodontais, pulpares e periapicais

Orientador: Prof. Dr. MAXIMILIANO SCHÜNKE GOMES

Porto Alegre, janeiro de 2019

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA SÍLICA NANOPARTICULADA
UTILIZADA COMO MEDICAÇÃO INTRACANAL EM CANAIS RADICULARES
INFECTADOS COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Área de concentração: Endodontia.

Aprovação em: _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Maximiliano Schünke Gomes (Orientador)

Prof. Dra. Maristela Gutiérrez de Borba – PUCRS

Prof. Dr. Tiago André Fontoura de Melo – UFRGS

Prof. Dr. Rafael Chies Hartmann – PUCRS (Suplente)

Porto Alegre, janeiro de 2019

DEDICATÓRIA

Dedico essa vitória aos meus pais. Pelo amor incondicional a mim dedicado a cada dia e por sempre apoiarem as minhas decisões.

Sou grata a Deus por ter vocês ao meu lado, desde os primeiros passos, segurando a minha mão e não me deixando desistir de nenhum sonho!

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e a minha família por todo o suporte e dedicação.

Sou grata especialmente a minha mãe, **Cátia Delfino** e minha irmã, **Rosália Pacheco Santana**, por tanto amor e incentivo durante a minha caminhada. Mesmo morando longe, sempre sinto vocês por perto. Muito obrigada por me ampararem, sempre!

Ao meu namorado, **Ivan Paim da Silva**, obrigada pelo suporte e por acreditar em mim. Obrigada por sempre saber o que falar e o que fazer para que eu não desistisse nunca. Obrigada por fazer eu me sentir tão especial. Todos os dias!

Ao meu orientador, **Professor Dr Maximiliano Schünke Gomes**, por acreditar no meu potencial quando eu mesma duvidei. Muito obrigada por me “adotar” no meio do caminho e me orientar brilhantemente, mesmo nos momentos mais turbulentos. Obrigada pela paciência e por me entender sempre, tanto nos meus momentos de risos quanto nos de lágrimas! Obrigada por tudo.

Ao meu professor e idealizador desse projeto, **Professor Dr José Antônio Poli de Figueiredo**, muito obrigada por confiar em mim. Obrigada por ser um exemplo pra minha carreira e por guiar meus passos. Obrigada, Figui!

Obrigada **Professora Dra. Silvia Dias de Oliveira** por abraçar esse projeto comigo, pelo suporte durante toda a etapa experimental e por sempre me tranquilizar dizendo que tudo daria certo. De coração, muito obrigada!

Obrigada queridas amigas **Liliana Agostini Stys**, **Thayana Souza Leão**, **Cyntia Jara**, **Gisele Franciscatto** e **Melissa Rio**. Muito obrigada pelo gigantesco suporte nos momentos que tanto precisei. Vocês são verdadeiros presentes que a vida acadêmica me deu e que levarei comigo pra sempre.

Em especial, agradeço ao meu “biofilme” mais amado: **Gabriela Bonacina**, **Isadora Basso** e **Bárbara Koppe**. A vocês, minhas amigas, muito obrigada pela base formada desde o primeiro dia de aula e que me sustentou até o final do mestrado. Obrigada pelas risadas mais sinceras, pelas lágrimas mais puras e pelos conselhos mais sábios que me tornaram forte o suficiente para trilhar esse caminho junto com vocês. Amo demais vocês e sou eternamente grata pelos nossos caminhos terem se cruzado. Sem dúvida alguma, essa caminhada teria sido muito mais árdua e insegura sem o apoio de vocês.

Ao meu amigo e **Professor Dr. Rafael Hartmann** por ter sido a primeira pessoa a me incentivar a entrar pra vida acadêmica e mostrar, pra mim mesma, o quanto sou capaz. Obrigada por sempre conseguir ver meu potencial. Obrigada pelos conselhos e ajudas diárias.

Obrigada a **Professora Dra. Daiana Böttcher** por me apoiar de várias formas, pelo aprendizado e conhecimento que eu sempre pude contar, desde a graduação.

Obrigada a **Professora Dra Maria Martha Campos** pelo conhecimento compartilhado ao longo desse caminho. E, mais do que isso, agradeço pela compreensão e delicadeza nos momentos mais difíceis.

A querida **Juliana Sumiensi** pela paciência em me ajudar na etapa laboratorial dessa pesquisa. Obrigada pela disponibilidade e gentileza de sempre.

Obrigada às amigas de uma vida toda: **Carolina Lacerda, Ana Lígia Espuny** e **Fernanda Caruso** por estarem sempre presentes na minha vida. Obrigada por entenderem a minha ausência e por me apoiarem de tantas maneiras. Amo vocês.

Sou grata à **Escola de Ciências da Saúde da PUCRS** e a **CAPES** por terem me proporcionado a oportunidade de aprofundar meus conhecimentos.

De maneira geral, agradeço de coração a todos que, direta ou indiretamente, estiveram comigo durante esses anos e me apoiaram para que eu conseguisse trilhar esse caminho da melhor maneira possível.

Muito obrigada,
Natália Delfino Pacheco.

Porto Alegre, 2019.

RESUMO

Algumas espécies de bactérias, como o *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), apresentam maior resistência aos procedimentos terapêuticos endodônticos, podendo sobreviver no sistema de canais radiculares mesmo após o uso de medicações intracanal, como o hidróxido de cálcio (HC). A sílica nanoparticulada (SN) tem sido recentemente pesquisada devido a suas propriedades biológicas e, em especial, a sua possível ação antimicrobiana. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação antimicrobiana da sílica nanoparticulada (SN) usada como medicação intracanal em dentes humanos com canais infectados com *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*). Vinte e cinco dentes com canal único e extraídos por razões terapêuticas, tiveram a coroa cortada próximo à junção amelocementária. Os canais radiculares foram infectados com *E. faecalis* (ATCC 29212) e incubados por 14 dias a 37°C. Após o preparo químico e mecânico, os dentes foram alocados em quatro grupos de maneira aleatória: CP – controle positivo (sem medicação, n=4); CN – controle negativo (sem contaminação, n=6); HC – hidróxido de cálcio (n=7); SN – sílica nanoparticulada (n=8). As medicações intracanal permaneceram nos canais radiculares por 15 dias a 37°C. Testes microbiológicos foram realizados para a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). A análise estatística foi realizada usando o teste de Kruskal-Wallis para a comparação do número de UFC entre todos os grupos estudados, seguido pelo teste de Mann-Whitney para a comparação entre os grupos (SN X HC; SN X CP; HC X CP), com $\alpha=5\%$. Após 15 dias com medicação intracanal, os grupos HC e SN apresentaram uma significativa diminuição na contagem de UFC quando comparado com o grupo CP ($p<0.05$). O grupo SN apresentou a menor média de UFCs ($4.0 \pm 7.3 \times 10^4$ cell/mL), ainda que não tenha sido estatisticamente significativa quando comparado com o grupo HC ($5.3 \pm 1.3 \times 10^5$ cell/mL). De acordo com o presente estudo, tanto o HC quanto a SN apresentaram efeito antimicrobiano contra o *E. faecalis*. A SN parece ter um potencial como medicação intracanal, mas novos estudos são necessários para validar o uso clínico da SN na terapia endodôntica.

Palavras-chaves: medicação intracanal, *enterococcus faecalis*, hidróxido de cálcio, canal radicular, sílica nanoparticulada.

ABSTRACT

Introduction: Some species of bacteria, such as *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), present greater resistance to endodontic therapeutic procedures, and can survive in the root canal system even after the use of intracanal medications, such as calcium hydroxide (HC). Nanoparticulate silica (SN) has been recently researched because of its biological properties and, in particular, for a possible antimicrobial action. This study aimed to evaluate the antimicrobial action of nanoparticulated silica (NS) as an intracanal medication in human root canals infected with *E. faecalis*. **Methods:** Twenty-five teeth with a single canal and extracted for therapeutic reasons had the crown cut close to the cemento-enamel junction. The root canals were infected with an *E. faecalis* strain (ATCC 29212) and incubated for 14 days at 37°C. After root canal preparations, the teeth were randomly allocated into four groups: PC - positive control (no medication, n=4); NC - negative control (no contamination, n=6); CH - calcium hydroxide (n=7); NS - nanoparticulated silica (n=8). The intracanal medications remained in the root canals for 15 days at 37°C. Microbiological testing was performed to count the colony forming units (CFU). Statistical analysis was carried out by Kruskal-Wallis test for comparison of CFU between all groups, followed by the Mann-Whitney test for comparisons between groups (NS X CH; NS X PC; CH X PC), with $\alpha=5\%$. **Results:** After 15 days as intracanal medication, both CH and NS groups showed a significant decrease in the CFU count compared to the PC ($p<0.05$). The NS group presented the lower mean of CFUs ($4.0 \pm 7.3 \times 10^4$ cell/mL), but with no significant differences compared to the CH ($5.3 \pm 1.3 \times 10^5$ cell/mL) group. **Conclusion:** Present findings suggest that both NS and CH had similar antibacterial effect against *E. faecalis*. NS has potential to be used as an intracanal medication, but further studies are required to validate the clinical use of NS in root canal therapy.

Keywords: intracanal medication, *enterococcus faecalis*, calcium hydroxide, root canal, nanoparticulated silica.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 ARTIGO	15
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
4 REFERÊNCIAS.....	27

SIGLAS E ABREVIATURAS

UFC: Unidade formadora de colônia

SN: Sílica nanoparticulada

HC: Hidróxido de cálcio

CP: Controle positivo

CN: Controle negativo

E. faecalis: *Enterococcus faecalis*

Hidroxila: OH⁻

1 INTRODUÇÃO

O tratamento dos canais radiculares tem como principal objetivo a limpeza e a desinfecção do sistema endodôntico, visando a manutenção da estrutura dental saudável, capaz de exercer suas funções mecânicas e estéticas. Na busca para alcançar esse objetivo, além de uma técnica bem executada, é fundamental que o endodontista entenda o protagonismo que os microrganismos e seus subprodutos possuem no que diz respeito à etiologia, desenvolvimento e manutenção das doenças pulpares e periapicais (Kakehashi *et al.*, 1965; Möller *et al.*, 1981).

Ainda que a fase de preparo químico-mecânico seja extremamente importante para a redução da carga microbiana no interior do sistema de canais radiculares (Goldman *et al.*, 1988; Hülsmann *et al.*, 2005), alguns microrganismos podem permanecer viáveis nos canais radiculares e serem capazes de perpetuar a infecção endodôntica (Byström e Sundqvist, 1981; Lin *et al.*, 1992; Sundqvist *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 2008).

Inúmeros fatores podem contribuir para a continuação do processo infeccioso mesmo após realizado o tratamento endodôntico. A manutenção de microrganismos nos túbulos dentinários ou em sítios complexos da anatomia do sistema de canais radiculares é uma das principais causas para a manutenção da doença (Safavi *et al.*, 1990).

Dessa maneira, o uso de uma medicação intracanal entre as consultas vem sendo proposto, historicamente, como manobra auxiliar visando o controle de bactérias que podem permanecer viáveis mesmo após a fase de limpeza e modelagem do canal radicular. Alguns estudos sugerem que o uso da medicação intracanal proporciona um ambiente mais adequado para o reparo clínico (Trope *et al.*, 1999), radiográfico (Trope *et al.*, 1999) e histológico (Sundqvist *et al.*, 1998; Tanomaru Filho *et al.*, 2002) dos tecidos periapicais.

Assim, visando o sucesso da terapia endodôntica e um melhor controle dos microrganismos mais resistentes aos procedimentos de desinfecção, o hidróxido de cálcio vem sendo amplamente estudado e utilizado como a medicação intracanal de escolha. A eficácia do hidróxido de cálcio é dependente da difusão dos íons hidroxila (OH^-) para se alcançar adequados níveis de pH. Trata-se de uma base forte, com pH em torno de 12,5 e que se dissocia em íons cálcio e íons OH^- , quando em solução aquosa (Estrela *et al.*, 1995; Estrela *et al.*, 1999).

A atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio, quando usado como medicação intracanal entre as consultas, está descrito na literatura (Byström e Sunqvist, 1985). Além disso, foram relatados também a sua habilidade de dissolução tecidual (Hasselgren *et al.*, 1988), inibição da reabsorção dental (Tronstad *et al.*, 1988) e a indução de reparo na formação de tecido duro (Foreman e Barnes, 1990).

A velocidade da dissociação dos íons cálcio e íons OH⁻ influencia o mecanismo de ação antimicrobiana desse produto (Estrela *et al.*, 1995; Estrela e Pesce, 1996). Na tentativa de melhorar a sua eficácia contra grupos bacterianos mais resistentes, diferentes veículos são associados ao hidróxido de cálcio, como o gel de clorexidina a 0,12%, o paramonoclorofenol canforado (PMCC), a glicerina e o metronidazol, por exemplo (Leonardo *et al.*, 1993; Siqueira e De Uzeda, 1997).

Apesar das excelentes propriedades antimicrobianas desse medicamento, o hidróxido de cálcio não é totalmente eficaz contra todos os microrganismos envolvidos nas infecções endodônticas. A destruição das bactérias causada pelo hidróxido de cálcio vai depender da disponibilidade dos íons OH⁻ no meio aquoso, que é maior no momento em que a medicação é aplicada. Quando o hidróxido de cálcio se difunde pelos tecidos, a concentração de íons OH⁻ é reduzida, levando a redução ou completa perda da eficácia antimicrobiana dessa medicação. Dessa maneira, o espectro antibacteriano do hidróxido de cálcio é limitado diante do *E. faecalis* e não afeta todos os microrganismos envolvidos na infecção endodôntica. Além disso, as propriedades físico-químicas desse medicamento podem limitar sua eficácia na desinfecção de todo o sistema de canais radiculares (Siqueira Jr e Lopes, 1999).

Alguns fatores, como o tempo em que os íons OH⁻ levam para se difundirem nos túbulos dentinários e variações anatômicas mais complexas, podem estar relacionados com a dificuldade de se atingir elevados níveis de pH em regiões periféricas da dentina. Além disso, ainda não há consenso na literatura em relação ao tempo que hidróxido de cálcio deve permanecer como medicação intracanal (Sharma *et al.*, 2018).

Segundo alguns autores, pode ocorrer uma redução nas propriedades mecânicas da dentina radicular após o contato com o hidróxido de cálcio por um período de 5 semanas ou mais (Yassen e Platt, 2013).

É bem sedimentada na literatura a pouca eficácia do hidróxido de cálcio contra o *E. Faecalis* (Siqueira Jr e Lopes, 1999). Este microrganismo é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, e é um dos microrganismos mais resistentes ao

hidróxido de cálcio (Sundqvist *et al.*, 1998). Diante do preparo químico e mecânico, ocorrem alterações no sistema de canais radiculares como, por exemplo, alteração do ambiente anaeróbico, eliminação de outros grupos bacterianos, diminuição de nutrientes e interferência nas interações desses microrganismos. Tais alterações podem ser vantajosas para o *E. faecalis*, já que esse microrganismo é capaz sobreviver mesmo após o preparo químico e mecânico dos canais radiculares, podendo resultar em infecções persistentes (Sundqvist, 1992).

O *E. faecalis* resiste à ação de alguns agentes antimicrobianos por possuir mecanismos de defesa, sendo isolada em casos de falha do tratamento endodôntico (Evans *et al.*, 2002; Portenier *et al.*, 2002; Kayaoglu *et al.*, 2009). Alguns fatores que podem contribuir para a resistência desses microrganismos ao hidróxido de cálcio são a capacidade de penetração nos túbulos dentinários, a elevada tolerância às variações de pH, possuir condições de sobreviver em ambientes com escassez de nutrição e capacidade de se manter viável sem a interação de outras espécies bacterianas (Sundqvist *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 2002; Haapasalo *et al.*, 2007).

Assim, novos produtos estão sendo testados quanto as suas propriedades antimicrobianas para que possam ser alternativas viáveis de medicação intracanal. A SN vem sendo estudada devido a uma possível ação antimicrobiana desse produto. Tal substância é produzida por organismos unicelulares – as diatomáceas – que possuem suas paredes celulares revestidas por sílica (SiO_2). A parte interna dessas células, composta pelo núcleo, citoplasma e membrana plasmática, é duplamente fechada pela parede celular. A parte superior que forma a diatomácea é denominada Epiteca, ligeiramente maior e se sobrepõe a parte inferior, a Hipoteca. Em cada uma dessas metades que formam a diatomácea, está presente uma válvula e inúmeras bandas que se encontram por toda a extensão da célula. Todos esses elementos que formam as diatomáceas são compostos por uma sílica amorfa. Esses microrganismos conseguem controlar a formação de sílica e a sua padronização de maneira precisa ao longo do tempo. Dessa maneira, durante os últimos anos, produtos envolvidos na biomineralização da sílica produzida pelas diatomáceas foram descobertos e caracterizados (Sumper e Brunner, 2006).

Em alguns estudos foi observado que para a produção da sílica, as diatomáceas usam um compartimento intracelular especializado: a vesícula de deposição de sílica. No momento em que se completa o processo de formação e padronização da sílica, todo o conteúdo depositado na vesícula é transferido para o espaço extracelular.

Depois disso, as células são novamente constituídas por uma parede celular completa e rica em sílica (Drum e Pankratz, 1964).

As substâncias bioativadas à base de vidro podem ser consideradas uma alternativa para o tratamento de defeitos ósseos bucais, e vem sendo sugeridas também para a desinfecção do sistema de canais radiculares. A redução do tamanho das partículas pode ser um fator importante para aumentar a atividade antimicrobiana dessas substâncias com grandes quantidades de SiO₂ (Mortazavi *et al.*, 2010).

A ação antibacteriana desses compostos pode ser afetada pela sua composição química e pelas condições em que irá ocorrer a dissolução nos tecidos envolvidos. Tais substâncias, em um ambiente aquoso, liberam Ca²⁺, Na⁺, PO₄⁻³ e Si⁺⁴ resultando em um considerável aumento do pH e da pressão osmótica nos tecidos circundantes. Esses fatores influenciam fortemente a viabilidade de microrganismos envolvidos no ambiente oral, por exemplo (Stoor *et al.*, 1998).

Foi mostrado, em alguns estudos *in vitro*, que a bioatividade desses componentes é capaz de manter o crescimento e a maturação de células semelhantes a osteoblastos, tanto de ratos quanto de humanos, sendo capaz de promover a expressão e manutenção do fenótipo osteoblástico. Os compostos bioativados apresentam um comportamento melhor do que os fosfatos de cálcio e as reações em algumas substâncias nanoparticuladas a base de sílica parecem ocorrer mais rapidamente do que em hidroxiapatita (Effah Kaufmann *et al.*, 2000; Bosetti *et al.*, 2003; Vallet-Regí *et al.*, 2003).

Em um estudo *in vitro* foram avaliadas as propriedades antimicrobianas e mineralizadoras de nanopartículas de silicato de cálcio carregadas com clorexidina. Avaliou-se o efeito antibacteriano contra o *E. faecalis* e as propriedades de mineralização desse composto, uma vez que a clorexidina pode ser eficaz contra o *E. faecalis* (Karpiński e Szkaradkiewicz, 2015) mas não possui propriedade mineralizadora (Da Silva *et al.*, 2008). Podendo ainda ser citotóxica aos tecidos periapicais, incapaz de neutralizar endotoxinas e possuir um pH ácido (Chang *et al.*, 2001; Giannelli *et al.*, 2008). O silicato de cálcio carregado com clorexidina apresentou uma liberação dessa substância, bem como a liberação de íons Ca⁺² e SiO₃⁻², promovendo ótima ação antimicrobiana contra o *E. faecalis*, baixa toxicidade e propriedades de mineralização. Esses achados sugerem que o silicato de cálcio carregado com clorexidina pode ser pensado como uma nova alternativa para

medicação intracanal, bem como material de preenchimento para defeitos ósseos (Fan *et al.*, 2016).

E, embora durante as últimas décadas o desenvolvimento desses biomateriais tenha sido conduzido, principalmente, para as aplicações médicas, nota-se que esse campo de pesquisa está se tornando cada vez mais explorado e seu uso prático vem sendo ampliado também para outras áreas, como a odontologia, por exemplo.

A SN usada na pesquisa ainda não é comercializada no Brasil, embora já seja usada como agente dessensibilizante na Europa. Alguns materiais combinados com partículas de sílica em dentifrícios, podem melhorar a estabilidade do efeito tampão e promover um melhor selamento dos túbulos dentinários (Liu *et al.*, 2011).

Diante do que foi exposto, justifica-se a necessidade de se desenvolver um medicamento intracanal que, como agente principal, tenha ação antimicrobiana contra o *E. faecalis*, que seja biocompatível e possa promover reparo ósseo da região periapical. Potencialmente, a SN pode contemplar tais características, porém esta hipótese ainda necessita de confirmação científica.

Portanto, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a eficácia antimicrobiana da sílica nanoparticulada quando utilizada como medicação intracanal, em canais radiculares infectados com *E. faecalis*.

2 ARTIGO

Antimicrobial Efficacy of Nanoparticulated Silica Used as Intracanal Medication in Human Root Canals Infected with *Enterococcus faecalis*: A Laboratory Study.

Natália D. Pacheco, MSc*; **Silvia Dias de Oliveira, DDS, MSc, PhD****; **José A. P. de Figueiredo, DDS, MSc, PhD ***; **Maximiliano S. Gomes, DDS, MSc, PhD***

From the *Post-Graduate Program in Dentistry and **Laboratory of Immunology and Microbiology, School of Health Sciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Address requests for reprints to Dr Maximiliano Schünke Gomes, Post-Graduate Program in Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, PUCRS, Av. Ipiranga 6681, prédio 6, sala 206, CEP 90619-900. Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail address: maximiliano.gomes@pucrs.br

This research will be submitted to the Journal of Endodontics (impact factor: 2.886), in 2019.

ABSTRACT

Introduction: This study aimed to evaluate the antimicrobial action of nanoparticulated silica (NS) as an intracanal medication in human root canals infected with *E. faecalis*. **Methods:** Twenty-five single-rooted extracted human teeth were decoronated below the cemento-enamel junction. The root canals were infected with an *E. faecalis* strain (ATCC 29212) and incubated for 14 days at 37°C. After root canal preparations, the teeth were randomly allocated into four groups: PC - positive control (no medication, n=4); NC - negative control (no contamination, n=6); CH - calcium hydroxide (n=7); NS - nanoparticulated silica (n=8). The intracanal medications remained in the root canals for 15 days at 37°C. Microbiological testing was performed to count the colony forming units (CFU). Statistical analysis was carried out by Kruskal-Wallis test for comparison of CFU between all groups, followed by the Mann-Whitney test for comparisons between groups (NS X CH; NS X PC; CH X PC), with $\alpha=5\%$. **Results:** After 15 days as intracanal medication, both CH and NS groups showed a significant decrease in the CFU count compared to the PC ($p<0.05$). The NS group presented the lower mean of CFUs ($4.0 \pm 7.3 \times 10^4$ cell/mL), but with no significant differences compared to the CH ($5.3 \pm 1.3 \times 10^5$ cell/mL) group. **Conclusion:** Both NS and CH had similar antibacterial effect against *E. faecalis*. NS have potential as an intracanal medication, but further studies are required to validate the clinical use of NS in root canal therapy.

Keywords: intracanal medication, *enterococcus faecalis*, calcium hydroxide, root canal, nanoparticulated silica.

INTRODUCTION

Microorganisms play a fundamental role in the etiology of pulp and periapical diseases (1, 2). Cleaning and shaping the root canals is the most effective way to reduce the microbial load from endodontic infections (3, 4). Nevertheless, the disinfection of the root canal system is challenging due to the anatomic complexity, and the use of an intracanal dressing is accepted as a strategy to enhance the outcome of endodontic therapy (5).

Calcium hydroxide (CH) is the gold standard intracanal medication, widely used in clinical practice. Its antimicrobial action, essentially related to the high pH, provides the elimination of several microbial species commonly found in infected root canals (6). However, this substance is not fully effective against all microorganisms involved in endodontics infections, such as *E. faecalis*. In addition, the physico-chemical properties of CH may limit its effectiveness in disinfecting the entire root canal system (7).

Thus, a continuous search for substances with more favorable antimicrobial properties, which may be used as intracanal medications, is under way. Bioactive nanoparticulated glass-based substances, such as silica, may be considered as an alternative for the treatment of oral bone defects, and have been suggested for the disinfection of the root canal system (8).

Some authors have shown that calcium silicate loaded with chlorhexidine can be used as a new alternative for intracanal medication and treatment of oral bone defects (9). NS have been used as a desensitizing agent and, according to some studies, materials combined with silica particles in dentifrices can improve the stability of the buffer effect and promote a better sealing of the dentinal tubules (10).

The antimicrobial effect of a bioactive glass containing silica (Ca, Na e SiO₂) was reported previously (11, 12). Stoor *et al.* (1998) observed a broad antibacterial effect on oral microorganisms (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*). This effect might be due to its high pH, osmotic effects or the Ca⁺² concentration in the dentine environment (11).

Accordingly, the development of a biocompatible intracanal medication with antimicrobial action against resistant endodontic microorganisms is recommended. Thus, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial action of NS as an intracanal medication in human root canals infected with *E. faecalis*.

METHODOLOGY

This study was approved by the Science and Ethics Commission of the School of Health Sciences of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (PUCRS), under the protocols CAAE #95348318.5.0000.5336 and SisGen #AEC69AF.

Teeth Selection and Preparation

Twenty-five human permanent teeth with straight single-canal and mature apices were collected for this study. Patients who needed the dental service and had indication of extraction for therapeutic reasons were invited to be part of the research. Before accepting the invitation, the patient signed the Free and Informed Consent Term of the Human Teeth Donation.

All the selected teeth were submitted to previous radiographs (TIMEX 70C - Gnatus Equipamentos Médico-Odontológicos Ltda., Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) in order to determine any alteration in the root canal (exclusion criteria), such as the presence of more than one canal, previous endodontic treatment, presence of intracanal posts, root fracture or pulp calcification.

After selection of the samples, in order to remove the periodontal ligament adhered to the roots, a root scraping with a periodontal curette was performed (Gracey nº 13/14, Hu-Friedy, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil). The samples were washed in tap water for 1 minute, dried at room temperature and sterilized (*Cristófoli*, Curitiba, Paraná, Brazil).

Then, teeth were decoronated below the cementoenamel junction, perpendicular to the long axis, using a diamond disk (KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda., Barueri, São Paulo, Brazil) and all the roots remained with 16 mm in length. In order to facilitate the cleavage of the root for later microbiological analysis, grooves were made in the long root axis of each sample using a diamond disk and taking care to not expose the root canal. The chemical-mechanical preparation of the root canal was done in all

samples, with working length of 16mm, manually and with the staggered technique using stainless steel K-type hand files (Dentsply-Maillefer, Petrópolis, Brazil). An initial exploration of the root canal with hand file Flexofile-type size #10 was made and the memory instrument was the fourth instrument after the first one that fitted the walls of the root canal (initial anatomical); followed by staggering using three more instruments. Irrigation was done with NaOCl at 2.5% (Biodinâmica, Ibiporã, Brazil). Then, the roots canals were irrigated with EDTA 17% (Iodontosul, Porto Alegre, Brazil) for 5 minutes for the removal of the smear layer. Aspiration and drying with absorbent paper (Tanari Indústria Ltda., Brazil) was performed prior to intracanal medication application.

CH paste (Biodynamic-Ibiporã / PA, Brazil) was obtained mixing the powder with distilled water, as recommended by the manufacturer. The medication was taken into the root canal using the memory instrument of each sample. Silica (DentCoat®, Germany) has been handled and applied with syringes and needles that accompany the product, according to the manufacturer's instructions. Then all samples were sealed with temporary restorative material (Cavit® 3M ESPE, Germany).

To facilitate tooth handling and changes in the culture medium, the samples were fixed in a 1.5 mL polypropylene tube (SPLABOR - Presidente Prudente, São Paulo, Brazil), so that it remained upright with the cervical portion facing upward.

Control of Sterilization

After sterilization of each polypropylene box containing the samples, a sterile paper cone was inserted in the root canal of one of the teeth in the box, and this cone was immediately inoculated in a tube containing sterile saline solution at 0.85%. The material was homogenized for 5 minutes and an aliquot of 100 µL of the saline solution was cultivated in duplicate on 5% sheep blood agar and incubated for 24 hours at 37°C; it did not present bacterial growth.

Bacterial Growth and Root Canal Infection

E. faecalis ATCC 29212 was grown in 3 mL brain heart infusion (BHI) broth at 37°C for 24h in the Laboratory of Immunology and Microbiology of the School of Health Sciences of PUCRS. Then, a 100 µL-aliquot of the culture was inoculated in 10 mL of sterile BHI and incubated at 37°C for 24h. To determine the number of colony-forming units (CFU/mL), it was diluted to 10⁻⁸ in 0.85% saline solution. These dilutions were spread on the surface of 5% sheep blood agar in duplicate and incubated at 37°C for

24 h. An aliquot of 100 μ L of the overnight culture of *E. faecalis* was inoculated into the root canal. After inoculation, the sterile BHI broth was added to the microtubes and the root apex remained in contact with the culture medium. The base containing the samples inoculated with *E. faecalis* was maintained at 37°C for 14 days. During this period, the culture medium was renewed every two days. All samples were manipulated under aseptic conditions, the laminar flow hood being used for this purpose.

Experimental Groups

Initially, the calculated n sample was 45 teeth. However, due to contaminations in routine laboratory procedures, there was a sample loss of 20 teeth.

Then the teeth were randomly allocated in 4 groups, according to the intracanal medication used after the endodontic treatment.

PC: Positive Control (n = 4) - Did not receive intracanal medication. *E. faecalis* was inoculated and chemical and mechanical preparation was performed.

NC: Negative Control (n = 6) - It was not inoculated with any species of microorganisms. Chemical and mechanical preparation was performed.

CH: Calcium Hydroxide (n = 7) - Inoculation with *E. faecalis*; chemical and mechanical preparation was performed. This group received CH as intracanal medication.

NS: Nanoparticulated Silica (n = 8) - Inoculation with *E. faecalis*; chemical and mechanical preparation was performed. This group received NS as intracanal medication.

Microbiological analysis

The microbiological analysis was performed after the cleavage of the teeth with the aid of orthodontic cutting pliers (JON® Produtos Odontológicos, São Paulo, Brazil). The hemisection was placed in 0.5 mL of 0.85% saline solution and in an ultrasonic bath (Ultrasonic Cleaner 1400A, Unique, Indaiatuba, Brazil) for 10 minutes to disrupt the 14 days-biofilm. A 50 μ L-aliquot of the saline containing the adherent cells was transferred to another microtube containing 450 μ L of 0.85% sterile saline. The material

was homogenized and diluted until 10^{-8} . 100 μ L-aliquots of each dilution were spread on BHI agar in triplicate to determine the number of CFU/mL remaining after each treatment. The remaining root hemisection was stored in 2.5% glutaraldehyde for future studies with microscopic analysis.

Data analysis

The Shapiro-Wilk test was performed to confirm the non-normality of the sample distribution. Then the statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test for comparison of CFU between all groups, followed by the Mann-Whitney test for comparisons between groups (NS X CH; NS X PC; CH X PC), with $\alpha=5\%$.

RESULTS

Table 1 shows the mean and standard deviation of CFUs of *E. faecalis* in experimental and control groups. After 15 days of intracanal medication, both CH and NS groups showed a significant decrease in the CFU count compared to the PC ($p<0.05$). The NS group presented the lower mean of CFUs ($4.0 \pm 7.3 \times 10^4$ cell/mL), but with no significant differences compared to the CH ($5.3 \pm 1.3 \times 10^5$ cell/mL) group ($p=0.86$). NC group did not show bacterial growth throughout the experimental time of the present study.

Table 1. Mean and standard deviation of CFU's of *E. faecalis* in all groups

Group	n	Mean \pm SD
PC	4	$1.6 \pm 2.6 \times 10^7$ cell/mL ^A
CH	7	$5.3 \pm 1.3 \times 10^5$ cell/mL ^B
NS	8	$4.0 \pm 7.3 \times 10^4$ cell/mL ^B

SD, standard deviation; Different letters (A, B) show a statistically significant difference between the groups ($p<0.05$).

DISCUSSION

The results suggest that NS has an antimicrobial capacity at least comparable to CH. Present findings agree with the importance of intracanal medication in the treatment of root canals to eliminate the microorganisms involved in endodontic infections (13, 14), since both NS and CH revealed a reduction in the microbial load compared to the PC with no medication.

Although there is no clinical evidence proving that the use of intracanal medication is a decisive factor for a better clinical and radiographic prognosis of endodontic therapy (15, 16), the use of intracanal medication in cases of chronic apical periodontitis has been recommended by many schools worldwide. The results of the present study highlight that a significant decrease in the CFU count is observed when NS or CH intracanal medication is used between sessions, reinforcing previous findings (17, 18).

The results of this study revealed no statistically significant differences between NS and CH, but a decrease in the crude mean of CFU of *E. faecalis* in the NS group could be observed when compared to the CH group. These findings may be reinforced by studies that also observed antimicrobial activity of silica-based substances, and may allow us to infer that these materials may have a potential to be used as intracanal disinfection agents (8). Reinforcing the idea that these materials have an antimicrobial capacity, a study tested a silica-based material as intracanal dressing and observed that this medication produced significantly ($p = 0.014$) lower CFU's of *Streptococcus mutans* when compared with both CH and 1% chlorhexidine gel (19). However, that study found no statistical difference in the CFU's count of *E. faecalis* when silica-based or chlorhexidine were used (19). Noteworthy, it is important that future research may assess the efficacy of NS against other bacterial species than *E. faecalis*, especially mixed cultures.

Although the antimicrobial mechanism of this materials is not fully understood, it may be based on the high pH environment in aqueous suspensions (11) or serving as a source of Ca and P ions to precipitate on bacterial cell wall surfaces, thereby destroying their cellular integrity (12).

Some methodological strengths and limitations of the present study must be discussed. Present research used both positive and negative control groups, which obviously contributed to a better control and comparisons between groups. The NC group was important to confirm that there was no breakage of the aseptic chain throughout the experiment. PC group can support the results found, reinforcing the idea that only the root canal preparation is not sufficient to substantially reduce the microbial load, requiring the use of intracanal medication. Thus, it is correct to infer that the decrease of the UFC count in the test groups was caused by the use of NS and CH and not by other factors. In the present study, the chemical-mechanical preparation was standardized and performed before using the medications, which contributed to

simulate the test conditions to the clinical settings. In addition, this study used human root canals, which gives a better external validity when compared to other studies that tested the antimicrobial capacity of intracanal medications on glass plates and other media (20-22) Furthermore, in our research, we used an ultrasonic bath to disrupt the biofilm formed in the root canals. This can give more accuracy to the CFU count and less risk of contamination. Differently from other authors who carried out research similar to this, and used paper points for biofilm collection, which can increase the chances of contamination compromising the validity of the results these studies (19, 23).

On the other hand, sample loss was a limitation of this study. Unfortunately, successive contaminations occurred throughout the experiment, considerably decreasing the sample size. Future studies with a larger sample should be performed so that a significant difference between the medications tested may arise. Additionally, in the present study, it was not possible to analyze images with scanning electron microscopy (SEM), which would be interesting because it would allow a morphological and topographic analysis of the microorganisms. Another important point to highlight is the liquefied consistency of the NS. This fact generated a certain difficulty at the moment of the application of the NS inside the root canals, challenging the complete filling of the root canal.

Further studies should be performed so that other NS properties are evaluated, in addition to the antimicrobial property. Biocompatibility and bone repair capacity in the periapical region are desirable characteristics of an intracanal medication (9).

In order to obtain more reliable results, new laboratory, animal and clinical research must be performed to assess the antimicrobial action of NS. Noteworthy, study models that may simulate the clinical practice are encouraged. In addition, future research should test the combination of NS with other vehicles, to verify their antimicrobial capacity and to improve the consistency of this medication for clinical application.

Controlling endodontic infection remains as the major challenge for clinicians and researchers. Finding viable alternatives to intracanal medication is an open research field yet to be unveiled.

CONCLUSION

According to the present study, both NS and CH had similar antibacterial effect against *E. faecalis*. Thus, NS have potential as an intracanal medicament in root canal therapy. However, further studies with *in vivo* models are required to validate the potential clinical application of NS in root canal therapy.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

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

REFERENCES

1. Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol.* 1965;20(3):340-9.
2. Möller ÅJ, Fabricius L, Dahlen G, Öhman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res.* 1981;89(6):475-84.
3. Hülsmann M, Peters OA, Dummer PM. Mechanical preparation of root canals: shaping goals, techniques and means. *Endodontic topics.* 2005;10(1):30-76.
4. Goldman M, White RR, Moser CR, Tenca JI. A comparison of three methods of cleaning and shaping the root canal in vitro. *J Endod.* 1988;14(1):7-12.
5. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, and Endod.* 1998;85(1):86-93.
6. Byström A, Sunqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J.* 1985;18(1):35-40.
7. Siqueira Jr J, Lopes H. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999;32(5):361-9.
8. Mortazavi V, Nahrkhalaji MM, Fathi M, Mousavi S, Esfahani BN. Antibacterial effects of sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle on aerobic bacteria. *J Biomed Mater Res.* 2010;94(1):160-8.
9. Fan W, Li Y, Sun Q, Ma T, Fan B. Calcium-silicate mesoporous nanoparticles loaded with chlorhexidine for both anti-*Enterococcus faecalis* and mineralization properties. *J Nanobiotechnology.* 2016;14(1):72.

10. Liu X *et al.* Effects of dentin tubule occlusion by dentifrice containing a PVM/MA bioadhesive copolymer in a silica base. *J Dent.* 2011;39(4):293-301.
11. Stoor P, Söderling E, Salonen JI. Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms. *Acta Odontol Scand.* 1998;56(3):161-5.
12. Zehnder M, Söderling E, Salonen J, Waltimo T. Preliminary evaluation of bioactive glass S53P4 as an endodontic medication in vitro. *J Endod.* 2004;30(4):220-4.
13. Sathorn C, Parashos P, Messer H. Australian endodontists' perceptions of single and multiple visit root canal treatment. *Int Endod J.* 2009;42(9):811-8.
14. Vianna M, Horz HP, Conrads G, Zaia A, Souza-Filho F, Gomes B. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22(6):411-8.
15. Sharma G, Ahmed HMA, Zilm PS, Rossi-Fedele G. Antimicrobial properties of calcium hydroxide dressing when used for long-term application: A systematic review. *Aust Endod J.* 2018;44(1):60-5.
16. Fonzar F *et al.* Single versus two visits with 1-week intracanal calcium hydroxide medication for endodontic treatment: One-year post-treatment results from a multicentre randomised controlled trial. *Eur J of Oral Implantol.* 2017;10(1).
17. Barbosa-Ribeiro M *et al.* Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medication on infectious/inflammatory contents in teeth with post-treatment apical periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2018:1-8.
18. Trope M, Delano EO, Ørstavik D. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment. *J Endod.* 1999;25(5):345-50.
19. Atila-Pektaş B, Yurdakul P, Gülmez D, Görduysus Ö. Antimicrobial effects of root canal medicaments against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*. *Int Endod J.* 2013;46(5):413-8.
20. Awawdeh L, AL-Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: A laboratory study. *Aust Endod J.* 2009;35(2):52-8.
21. Aguiar AS, Guerreiro-Tanomaru J, Faria G, Leonardo R, Tanomaru-Filho M. Antimicrobial activity and pH of calcium hydroxide and zinc oxide nanoparticles intracanal medication and association with chlorhexidine. *J Contemp Dent Pract.* 2015;16(8):624-9.
22. Dianat O, Saedi S, Kazem M, Alam M. Antimicrobial Activity of Nanoparticle Calcium Hydroxide against *Enterococcus Faecalis*: An In Vitro Study. *Ira Endod J.* 2015;10(1):39.
23. Valverde ME *et al.* Antibacterial efficacy of several intracanal medicaments for endodontic therapy. *Dent Mater J.* 2017;36(3):319-24.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o presente estudo, tanto a SN quanto HC apresentaram um efeito antimicrobiano similar contra o *E. faecalis*. Dessa maneira, podemos inferir que a SN possui um bom potencial como medicação intracanal. Entretanto, mais estudos *in vivo* e *in vitro* precisam ser realizados para que seja possível validar a aplicação clínica da SN no tratamento do sistema de canais radiculares.

Além da propriedade antimicrobiana, novos estudos devem ser realizados para que sejam avaliadas outras características da SN. A biocompatibilidade e capacidade de reparo ósseo na região periapical são propriedades desejáveis de uma medicação intracanal.

Sendo a infecção endodôntica ainda um grande desafio para endodontistas e pesquisadores, uma nova possibilidade de medicação intracanal parece ser bastante interessante.

4 REFERÊNCIAS

- BOSETTI, M. et al. Type I collagen production by osteoblast-like cells cultured in contact with different bioactive glasses. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 64, n. 1, p. 189-195, 2003.
- BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **European Journal of Oral Sciences**, v. 89, n. 4, p. 321-328, 1981.
- BYSTRÖM, A.; SUNVQVIST, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. **International Endodontic Journal**, v. 18, n. 1, p. 35-40, 1985.
- CHANG, Y.-C. et al. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 92, n. 4, p. 446-450, 2001.
- DA SILVA, R. A. B. et al. Effects of the association between a calcium hydroxide paste and 0.4% chlorhexidine on the development of the osteogenic phenotype in vitro. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 12, p. 1485-1489, 2008.
- DRUM, R. W.; PANKRATZ, H. S. Pyrenoids, raphes, and other fine structure in diatoms. **American Journal of Botany**, v. 51, n. 4, p. 405-418, 1964.
- EFFAH KAUFMANN, E.; DUCHEYNE, P.; SHAPIRO, I. Evaluation of osteoblast response to porous bioactive glass (45S5) substrates by RT-PCR analysis. **Tissue Engineering**, v. 6, n. 1, p. 19-28, 2000.
- ESTRELA, C.; PESCE, H. F. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions from calcium hydroxide pastes in connective tissue in the dog. Part I. **Braz Dent J**, v. 7, n. 1, p. 41-6, 1996..
- ESTRELA, C. et al. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide pastes. **Braz Dent J**, v. 10, n. 2, p. 63-72, 1999.
- _____. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Braz Dent J**, v. 6, n. 2, p. 85-90, 1995.
- EVANS, M. et al. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **International Endodontic Journal**, v. 35, n. 3, p. 221-228, 2002.
- FAN, W. et al. Calcium-silicate mesoporous nanoparticles loaded with chlorhexidine for both anti-*Enterococcus faecalis* and mineralization properties. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 72, 2016.
- FOREMAN, P.; BARNES, I. A review of calcium hydroxide. **International Endodontic Journal**, v. 23, n. 6, p. 283-297, 1990.

GIANNELLI, M. et al. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 2, p. 308-317, 2008.

GOLDMAN, M. et al. A comparison of three methods of cleaning and shaping the root canal in vitro. **Journal of Endodontics**, v. 14, n. 1, p. 7-12, 1988.

GOMES, B. P. et al. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 5, p. 537-540, 2008.

HAAPASALO, M. et al. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 8, p. 917-925, 2007.

HASSELGREN, G.; OLSSON, B.; CVEK, M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. **Journal of Endodontics**, v. 14, n. 3, p. 125-127, 1988.

HÜLSMANN, M.; PETERS, O. A.; DUMMER, P. M. Mechanical preparation of root canals: shaping goals, techniques and means. **Endodontic Topics**, v. 10, n. 1, p. 30-76, 2005.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.; FITZGERALD, R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 20, n. 3, p. 340-349, 1965.

KARPIŃSKI, T.; SZKARADKIEWICZ, A. Chlorhexidine–pharmaco-biological activity and application. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 19, n. 7, p. 1321-1326, 2015.

KAYAOGLU, G. et al. The resistance of collagen-associated, planktonic cells of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 1, p. 46-49, 2009.

LEONARDO, M. et al. Effect of intracanal dressings on repair and apical bridging of teeth with incomplete root formation. **Dental Traumatology**, v. 9, n. 1, p. 25-30, 1993.

LIN, L. M.; SKRIBNER, J. E.; GAENGLER, P. Factors associated with endodontic treatment failures. **Journal of Endodontics**, v. 18, n. 12, p. 625-627, 1992.

LIU, X. et al. Effects of dentin tubule occlusion by dentifrice containing a PVM/MA bioadhesive copolymer in a silica base. **Journal of Dentistry**, v. 39, n. 4, p. 293-301, 2011.

MORTAZAVI, V. et al. Antibacterial effects of sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle on aerobic bacteria. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 94, n. 1, p. 160-168, 2010.

MÖLLER, Å. J. *et al.* Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scand J Dent Res**, v. 89, n. 6, p. 475-484, 1981.

PORTENIER, I. *et al.* Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. **Journal of Endodontics**, v. 28, n. 9, p. 634-637, 2002.

SAFAVI, K. E.; SPNGBERG, L. S.; LANGELAND, K. Root canal dentinal tubule disinfection. **Journal of Endodontics**, v. 16, n. 5, p. 207-210, 1990.

SHARMA, G. *et al.* Antimicrobial properties of calcium hydroxide dressing when used for long-term application: A systematic review. **Australian Endodontic Journal**, v. 44, n. 1, p. 60-65, 2018.

SIQUEIRA, J. F.; DE UZEDA, M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. **Journal of Endodontics**, v. 23, n. 3, p. 167-169, 1997.

SIQUEIRA JR, J.; LOPES, H. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **International Endodontic Journal**, v. 32, n. 5, p. 361-369, 1999.

STOOR, P.; SÖDERLING, E.; SALONEN, J. I. Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 56, n. 3, p. 161-165, 1998.

SUMPER, M.; BRUNNER, E. Learning from diatoms: Nature's tools for the production of nanostructured silica. **Advanced Functional Materials**, v. 16, n. 1, p. 17-26, 2006..

SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **Journal of Endodontics**, v. 18, n. 9, p. 427-430, 1992.

SUNDQVIST, G. *et al.* Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 85, n. 1, p. 86-93, 1998.

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

TRONSTAD, L.; BARNETT, F.; FLAX, M. Solubility and biocompatibility of calcium hydroxide-containing root canal sealers. **Dental Traumatology**, v. 4, n. 4, p. 152-159, 1988.

TROPE, M.; DELANO, E. O.; ØRSTAVIK, D. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment. **Journal of Endodontics**, v. 25, n. 5, p. 345-350, 1999.

VALLET-REGÍ, M.; RAGEL, C. V.; SALINAS, A. J. Glasses with medical applications. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2003, n. 6, p. 1029-1042, 2003.

YASSEN, G.; PLATT, J. The effect of nonsetting calcium hydroxide on root fracture and mechanical properties of radicular dentine: a systematic review. **International Endodontic Journal**, v. 46, n. 2, p. 112-118, 2013.