



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Mariana Porciuncula de Almeida

**Efeito bactericida e alteração de cor proporcionada por medicações
antibióticas em diferentes consistências**

Rio de Janeiro

2018

Mariana Porciuncula de Almeida

Efeito bactericida e alteração de cor proporcionada por medicações antibióticas em diferentes consistências

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Endodontia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Luciana Moura Sassone

Coorientadora: Prof.^a Dra. Sandra Rivera Fidel

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

A447 Almeida, Mariana Porciuncula de.
Efeito bactericida e alteração de cor proporcionada por medicações
antibióticas em diferentes consistências / Mariana Porciuncula de Almeida.
– 2018.
65 f.

Orientadoras: Luciana Moura Sassone, Sandra Rivera Fidel.
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Odontologia.

1. Antibacterianos. 2. Descontaminação. 3. Descoloração de dente. I.
Sassone, Luciana Moura. II. Fidel, Sandra Rivera. III. Universidade do
Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

CDU
616.314

Kárin Cardoso CRB/7 6287

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Mariana Porciuncula de Almeida

Efeito bactericida e alteração de cor proporcionada por medicações antibióticas em diferentes consistências

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Endodontia.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2018.

Orientadoras:

Prof.^a Dra. Luciana Moura Sassone
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Sandra Rivera Fidel
Faculdade de Odontologia - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Teresa Cristina Ávila Berlinck
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Heloisa Carla Dell Santo Gusman
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Ao meu pai e minha mãe por todo o apoio ao longo dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família por todo apoio e paciência e a Deus por me guiar e me cercar de pessoas boas.

Agradeço aos que fizeram a realização desse trabalho possível:

A Professora doutora Luciana Sassone, por sua orientação, não só no mestrado, mas desde o meu primeiro laboratório de endodontia, e por ser um exemplo de professora comprometida com seus alunos e com a faculdade.

A Professora doutora Sandra Fidel por seu apoio e incentivo, desde as clínicas de trauma dental.

Ao Professor doutor Raphael Hirata Júnior pelo empréstimo do meio Enterococosele e por ser uma pessoa iluminada e fundamental no meu mestrado.

Ao Professor doutor Antônio Monnerat pelo empréstimo do espectrofotômetro Vita EasyShade e por ser uma das pessoas que despertaram meu interesse pela área de dentística e descoloração dentária desde a graduação.

Ao Doutor Fernando Marques por ser tão solícito e me dar o propilenoglicol e macrogol utilizados pelo Hoshino e me ensinar protocolo de manipulação utilizado por ele e por ser uma grande influência no meu interesse pela área de trauma dental.

A técnica de laboratório Bárbara Coelho por todo comprometimento e por ser tão prestativa.

Ao Professor doutor Emmanuel Silva por todo auxílio e por todos os ensinamentos proporcionados durante os 2 anos de convivência no laboratório de endodontia.

Agradeço também aos que foram um grande incentivo no meu mestrado:

A Professora doutora Teresa Berlinck pelo apoio e companheirismo desde o laboratório de endodontia.

A equipe da atualização em endodontia da PUC-RJ: Augusto Barbosa, Marco André de Berredo, Cássius Fonseca e Fábio Tancredo pelo incentivo durante o curso para que seguisse na área.

A equipe da especialização em endodontia da UFRJ por aumentar ainda mais minha paixão pela endodontia e principalmente as professoras doutoras Máira Prado e Heloísa Gusman pelo incentivo a pesquisa.

A turma de mestrado em endodontia da UERJ de 2012-2014 composta por Ane Poly, Fanor Marques, Felipe Belladonna, João Marcelo Teixeira, Justine Tinoco e Marcus Vinicius

Andrade pelo companheirismo e conhecimentos compartilhados durante as clínicas de trauma dental.

Aos meus companheiros de mestrado Cláudio Malizia, Milena Tomaz e Nicole Fiallos pelo companheirismo e convivência agradáveis. Vocês foram ótimos companheiros de jornada.

RESUMO

ALMEIDA, Mariana Porciuncula. *Efeito bactericida e alteração de cor proporcionada por medicações antibióticas em diferentes consistências*. 2018. 65f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito de medicações antibióticas em consistência pastosa e sólida sobre o biofilme de *E. faecalis* formado em dentina humana e mensurar a alteração de coloração coronária de dentes que receberam tais medicamentos. Setenta dentes foram divididos em dois grupos controle (n=5) e seis grupos antibióticos (n=10) de acordo com a formulação da medicação antibiótica testada e sua consistência, como a seguir: CN – Controle negativo, em que água destilada foi aplicada, CP – Controle positivo, em que a ausência de contaminação cruzada foi comprovada, só tendo sido realizada descontaminação externa, Grupo 3MIX-sol – medicação triantibiótica, consistência sólida, Grupo 3MIX-past – medicação triantibiótica, consistência pastosa, Grupo 2MIX-sol – medicação biantibiótica, consistência sólida, Grupo 2MIX-past - medicação biantibiótica, consistência pastosa, Grupo 3MIX-mod-sol – medicação triantibiótica modificada com clindamicina, consistência sólida. Grupo 3MIX-mod-past - medicação triantibiótica modificada com clindamicina consistência pastosa. Para a avaliação da alteração de coloração, foram realizadas tomadas de cor em uma mesma posição, utilizando-se um espectrofotômetro de acordo com o sistema CIELAB, antes da aplicação das medicações antibióticas e três semanas após a aplicação, os valores de ΔL^* , Δa^* e Δb^* foram coletados para verificar se houve modificação no valor, eixo verde-vermelho ou eixo azul-amarelo. Para se avaliar a atividade antibacteriana das medicações antibióticas testadas, os espécimes dos grupos antibióticos e CN foram contaminados com uma cultura de *E. faecalis*, durante 30 dias, buscando a formação de biofilme intrarradicular. Transcorrido esse período, os espécimes dos grupos-teste foram irrigados com hipoclorito de sódio a 1,5% e com EDTA a 17%, por 5 minutos, os canais foram secos e a medicação foi aplicada. Após 15 dias as medicações antibióticas foram removidas do canal radicular por irrigação com água destilada e EDTA a 17% e as amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo o meio Enterococcosel para avaliar a descontaminação das mesmas por 48h em estufa. O grupo CN passou pelo mesmo processo de descontaminação, mas teve seu canal preenchido por água destilada e o grupo CP foi submetido somente a descontaminação externa. Os resultados do presente estudo demonstraram que todos os grupos que continham minociclina na sua formulação sofreram alteração de cor ($P < 0,05$), enquanto a coloração dos outros grupos, incluindo controle, continuaram estáveis ($P > 0,05$). Em relação a ação antibacteriana, o CN apresentou crescimento bacteriano e o Grupo 3MIX-mod-past foi o único grupo experimental a apresentar crescimento bacteriano pós terapia ($P < 0,05$). Portanto, em relação a alteração de cor, o grupo 3MIX-sol, promoveu uma menor descoloração coronária do que o grupo 3MIX-past. Já os grupos CP, 2MIX-sol, 2MIX-past, 3MIX-mod-sol e 3MIX-mod-past não apresentaram alteração de cor no elemento dentário. Em relação a ação antibacteriana das substâncias, os grupos 3MIX-sol, 3MIX-past, 2MIX-sol e 2MIX-past se mostraram eficientes contra o biofilme *E. faecalis*, independente de sua consistência e o CP não apresentou presença bacteriana. O grupo 3MIX-mod-past permitiu o registro de presença bacteriana no meio Enterococcosel, o que não ocorreu com o grupo 3MIX-mod-sol.

Palavras-chave: Medicação antibiótica. Descontaminação. Descoloração coronária.

ABSTRACT

ALMEIDA, Mariana Porciuncula. *Bactericidal effect and color change provided by antibiotic medications in different consistency*. 2018. 65f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The aim of this study was to analyze the effect of triple antibiotic medication in pasty and solid consistency against of *E.faecalis* biofilm formed in human dentin and measure by using spectrophotometer if there was any change in the coronary color of the dental elements. Seventy teeth were divided into two control groups (n=5) and six antibiotic groups (n=10) according to the formulation and consistency of the antibiotic medication, as followed: CN – negative control, with distilled water applied, CP – positive control, Group 3MIX-sol – triple antibiotic paste in solid consistency, Group 3MIX-past – triple antibiotic paste, pasty consistency, Group 2MIX-sol – triple antibiotic medication in solid consistency, Group 3MIX-mod-sol – triple antibiotic medication modified with clindamicyn, solid consistency, Group 3MIX-mod-past – triple antibiotic medication modified with clindamicyn, paste consistency. The coronary color change was measured by a spectrophotometer according the CIELAB system, before and three weeks later the antibiotic medication was used, the ΔL^* , Δa^* e Δb^* were collected to verify if it had luminosity, axis green-red and blue-yellow changes. To analyze the antibacterial activity of the medications tested, the specimens were contaminated with *E.faecalis* culture, for 30 days, aiming the growth of intra radicular biofilm. After that, the specimens of all groups were irrigated with sodium hypochlorite 1,5% and EDTA 17% by five minutes each, so the root canals were dried and the antibiotic paste could be applied, remaining in the dental element for 15 days. After 15 days the antibiotic paste were removed from the root canals by irrigation with distilled water and EDTA 17% and the samples were placed into test tubes filled with Enterococcosel medium to analyze the descontamination of them in 48 hours at the incubator. The NC group went through the same process of descontamination, but had its root canal filled with distilled water and the PC group only went through external surface descontamination. All the groups with minocycline in formulation had coronary color change ($P < 0,05$), while the staining of the other groups, including control, remained stable ($P > 0,05$). The NC and the 3MIX-mod-paste group was the only experimental group that showed bacterial growth after therapy ($P < 0,05$). The 3MIX-sol showed less coronary color change compared to 3MIX-past. The 2MIX-sol, 2MIX-past, 3MIX-mod-sol and 3MIX-mod-past groups did not show change in dental color. The antibacterial effect of the 3MIX-sol, 3MIX-past, 2MIX-sol and 2MIX-past groups showed to be efficient agains *E. faecalis* biofilm. The 3MIX-mod-past group allowed bacterial growth in the Enterococcosel medium, which did not occur in the 3MIX-mod-sol group.

Keywords: Antibiotic medication. Decontamination. Coronal discoloration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Procedimentos pré contaminação e processo de aferição.....	34
Figura 2-	Procedimentos necessários para a contaminação.....	36
Figura 3-	Selamento dos túbulos dentinários.....	37
Figura 4-	Preparo da pasta antibiótica - Grupo 3MIX-sol.....	40
Figura 5-	Comparação entre os três grupos de consistência pastosa.....	41
Figura 6-	Colocação das pastas antibióticas nos grupos 3MIX-past e 3MIX-mod-past	41
Figura 7-	Modo de preparo dos grupos antibióticos sólidos.....	42
Figura 8-	Preparo para colocação da amostra no meio Enterococoselel.....	44
Figura 9-	Plaqueamento das amostras microbiológicas.....	45
Figura 10-	Avaliação de cor da amostra do grupo 3MIX-past inicialmente e após três semanas.....	48
Figura 11-	Avaliação de contaminação dos grupos controle no meio Enterococoselel	50
Figura 12-	Placas com meio <i>mitis salivarius</i> para contagem de UFCs dos grupos CN e CP.....	50
Figura 13-	Amostras 1 dos grupos 3MIX-sol, 3MIX-past, 2MIX-sol, 2MIX-past, 3MIX-mod-sol após 48h.....	52
Figura 14-	Placas com meio <i>mitis salivarius</i> dos grupos 3MIX-sol, 3MIX-past, 2MIX-sol, 2MIX-past, 3MIX-mod-sol após 24h.....	53
Figura 15-	Grupo 3MIX-mod-past.....	54
Figura 16-	Grupos antibióticos ao final do experimento.....	54

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	10
1	REVISÃO DE LITERATURA	14
2	PROPOSIÇÃO	31
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Seleção dos espécimes	32
3.2	Preparo dos elementos dentários	32
3.3	Aferição da coloração coronária	33
3.4	Contaminação da amostra	35
3.5	Selamento dos túbulos dentinários coronários	36
3.6	Desinfecção da amostra	38
3.7	Avaliação da desinfecção	43
3.8	Análise Estatística	46
3.8.1	<u>Aferição da coloração</u>	46
3.8.2	<u>Ação antibacteriana</u>	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Avaliação da relação entre as medicações antibióticas e alteração da coloração coronária por meio do aparelho Vita Easysshade	47
4.1.1	<u>Grupo controle</u>	47
4.1.2	<u>3MIX-sol e 3MIX-past</u>	47
4.1.3	<u>2MIX-sol, 2MIX-past, 3MIX-mod-sol, 3MIX-mod-past</u>	48
4.2	Avaliação antimicrobiana das medicações antibióticas sobre biofilme de <i>E.faecalis</i>	49
4.2.1	<u>Grupos controle</u>	49
4.2.2	<u>3MIX-sol, 3MIX-past, 2MIX-sol, 2MIX-past, 3MIX-mod-sol</u>	51
4.2.3	<u>3MIX-mod-past</u>	53
5	DISCUSSÃO	55
	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61

INTRODUÇÃO

Os dentes permanentes com rizogênese incompleta que sofrem necrose pulpar tem o processo de formação radicular paralisado (SHAH et al., 2008). Nestes casos, dois procedimentos clínicos têm sido recomendados: a apicificação ou a revascularização (BOSE; NUMMIKOSKI; HARGREAVES, 2009). A apicificação consiste na formação de uma barreira apical utilizando-se diferentes materiais como o agregado de trióxido mineral (MTA) e o hidróxido de cálcio (BOSE; NUMMIKOSKI; HARGREAVES, 2009; SHAH et al., 2008). A apicificação com o MTA é realizada de forma imediata (SHABAHANG et al., 1999) pois não depende do organismo para criação da barreira apical, que é realizada por meio da aplicação deste material como tampão no terço apical da raiz, o que possibilita a compactação do material obturador com segurança (HOLDEN et al., 2008; MENTE et al., 2009; WITHERSPOON et al., 2008). Já o protocolo com hidróxido de cálcio requer trocas sucessivas, em múltiplas sessões, para estimular a formação de uma barreira mineralizada natural, que possibilite a compactação do material obturador dentro do canal radicular. Este procedimento possui uma série de inconvenientes como: maior facilidade de recontaminação do elemento pelo tempo do tratamento e aumento da fragilidade da dentina radicular, gerando um risco futuro de fratura radicular (NOSRAT; SEIFI; ASGARY, 2011).

O tratamento de revascularização pulpar visa proporcionar a finalização do processo de complementação radicular, proporcionando um maior fechamento apical, aumentando a espessura da dentina intrarradicular e o tamanho da raiz, diminuindo o risco futuro de fratura do elemento (DING et al., 2009; JUNG; LEE; HARGREAVES, 2008; NOSRAT; SEIFI; ASGARY, 2011; SHAH et al., 2008). O protocolo de revascularização consiste na cirurgia de acesso ao dente não vital, irrigação abundante com hipoclorito de sódio a 1,5% sem a realização da instrumentação, evitando-se assim a remoção de tecido viável remanescente e a diminuição da espessura da dentina intrarradicular (DIOGENES et al., 2014; REYNOLDS; JOHNSON; COHENCA, 2009; TROPE, 2008), irrigação com EDTA 17%, secagem do canal radicular com cone de papel e colocação de uma medicação intracanal para descontaminação dentinária (DIOGENES et al., 2014; GARCIA-GODOY; MURRAY, 2012; LOVELACE et al., 2011; TROPE, 2008). Em uma segunda sessão, o canal radicular deve ser irrigado com EDTA 17% e é realizada a estimulação da região periapical com uma lima buscando-se o surgimento de um sangramento. O canal radicular deve ser preenchido por sangue e, finalmente, o elemento dentário deve ser selado internamente por MTA, no terço cervical,

abaixo da junção amelocementária, e por resina fotopolimerizável na porção coronária, impedindo recontaminação deste (HOSHINO et al., 1996).

A descontaminação do canal radicular possibilita a conclusão do processo inflamatório na região, sendo fundamental para o sucesso da nova formação tecidual, por isso a medicação 3MIX em forma pastosa, vem sendo o medicamento intracanal de escolha, pois sua combinação garante ampla ação contra biofilmes multiespécie (REYNOLDS; JOHNSON; COHENCA, 2009). Isto se daria pela presença e combinação dos três antibióticos. A minociclina apresenta ação bacteriostática contra espécies Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias, além de inibir collagenases e metaloproteínase de matriz (YAO et al., 2007) e de aumentar o nível de interleucina 10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória (RAMAMURTHY et al., 2002). A ciprofloxacina apresenta ação bactericida contra espécies Gram-positivas e Gram-negativas. Já o metronidazol possui ação bactericida contra anaeróbicos estritos (cocos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos e Gram-positivos) (CHUENSOMBAT et al., 2013; SATO et al., 1993).

Entretanto, a associação de antibióticos proporciona um aumento na citotoxicidade comparando-a quando utilizados separadamente nas mesmas concentrações (CHUENSOMBAT et al., 2013). Portanto a medicação antibiótica 3MIX deve ser usada em uma concentração que possua o equilíbrio entre ação antimicrobiana e baixa citotoxicidade, pois a toxicidade celular é proporcional ao aumento da sua concentração, o que poderia gerar destruição das células remanescentes, que apresentam potencial para a diferenciação no novo tecido que ocupará o espaço do canal radicular, com capacidade de formação óssea/dentinária (LABBAN et al., 2014; RUPAREL et al., 2012; SABRAH et al., 2015). A ação antimicrobiana nas concentrações não-tóxicas em estudos *in vitro* têm sido comumente avaliadas sobre o biofilme de *Enterococcus faecalis* (ALGARNI; YASSEN; GREGORY, 2015; SABRAH; YASSEN; GREGORY, 2013). Esta espécie apresenta predisposição à formação de biofilme, o que é um aspecto vantajoso sobre outras espécies, pois isso demonstra ser um dos principais fatores da persistência e recolonização em ambientes adversos (JEFFERSON, 2004; KISHEN; GEORGE; KUMAR, 2006; LIU et al., 2010). O *E. faecalis* também é indicado para estudos *ex vivo* (CARBAJAL MEJÍA; AGUILAR ARRIETA, 2016; DEVARAJ; JAGANNATHAN; NEELAKANTAN, 2016; LANA et al., 2009; ORDINOLA-ZAPATA et al., 2013) devido às suas dimensões, pois apresenta a capacidade de penetrar nos túbulos dentinários, sobrevivendo e proliferando-se no canal radicular sem a presença de outra espécie bacteriana (LOVE, 2001). Todavia estudos *ex vivo* de ação antibacteriana da medicação antibiótica 3MIX utilizando como protocolo as baixas

concentrações atualmente preconizadas e sua comparação com outras medicações antibióticas ainda é um campo pouco explorado (DEVARAJ; JAGANNATHAN; NEELAKANTAN, 2016).

Apesar da eficácia apresentada ao realizar a descontaminação dos túbulos dentinários (ORDINOLA-ZAPATA et al., 2013), a medicação antibiótica 3MIX possui a desvantagem de causar mudança de coloração pelo uso da minociclina, pertencente à família das tetraciclina, em um processo de quelação dos íons cálcios, em que a minociclina se junta ao cálcio da estrutura dentária formando um complexo insolúvel (TANASE et al., 1998). Uma tentativa de se minimizar os danos estéticos causados pela aplicação desta medicação antibiótica é a utilização de sistemas adesivos e resinas para que a minociclina não entre em contato direto com a dentina coronária (REYNOLDS; JOHNSON; COHENCA, 2009), o que pode ser alcançado com mais facilidade por sistemas adesivos de passo único autocondicionantes (GIACHETTI et al., 2011). Também foi sugerida por Hoshino (2007) uma modificação na consistência da medicação antibiótica intrarradicular, modificando o veículo utilizado para macrogol e propilenoglicol, dando uma consistência sólida ao invés de pastosa para a medicação antibiótica 3MIX, o que proporcionaria maior controle para o operador na colocação do antibiótico intracanal. Devido a essa perda estética, novas combinações antibióticas foram colocadas em prática como a utilização da medicação antibiótica em sua versão biantibiótica, sem a minociclina (PORTER et al., 2016) ou substituição da minociclina por outro antibiótico como a clindamicina (ALGARNI; YASSEN; GREGORY, 2015; MCTIGUE; SUBRAMANIAN; KUMAR, 2013).

A clindamicina é uma substância recomendada pela *American Association of Endodontics* (AAE) (AAE, 2015) como substituta para a minociclina por não proporcionar descoloração coronária em testes *ex vivo* (DETTWILER et al., 2016; THOMSON et al., 2012) e apresentar eficiência bactericida (MCTIGUE; SUBRAMANIAN; KUMAR, 2013). Algarni, Yassen, Gregory (2015) apresentaram resultado semelhante *in vitro* ao da medicação biantibiótica, ambos na consistência em gel e de acordo com as diretrizes da AAE, porém a literatura carece de estudos *ex vivo* que comparem a ação antibacteriana da medicação triantibiótica modificada por clindamicina com a medicação antibiótica 3Mix e com a medicação biantibiótica em dentina contaminada.

Além disso, após as diretrizes da *American Association of Endodontics* em 2015 (AAE, 2015) há uma deficiência na literatura sobre a ação antimicrobiana em dentina das três medicações antibióticas supracitadas considerando fatores como sua baixa concentração,

consistência e associação ao hipoclorito de sódio em uma baixa concentração de 1,5% e se a aplicação de um sistema adesivo, associado aos dois primeiros fatores, produzem alguma diferença na descoloração coronária promovida pela minociclina.

1 REVISÃO DE LITERATURA

Alteração da coloração dentária: Tanase et al. (1998) desenvolveram uma técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos para simultaneamente separar antibióticos derivados da tetraciclina e aplicar na análise de descoloração dentária. O eluato das amostras que apresentaram descoloração foi identificado como minociclina e a minociclina não foi identificada em nenhuma amostra que não sofreu descoloração, portanto indicando que houve incorporação da minociclina na dentina e no esmalte.

Thomson et al. (2012) quantificaram a descoloração de raízes dentárias causada por vários medicamentos e cimentos obturadores. Os medicamentos avaliados foram Multi-cal (a base de hidróxido de cálcio), Ledermix (a base de derivado da tetraciclina), Acetato de clorexidina a 2% em polietilenglicol, clindamicina a 5% em polietilenglicol e somente polietilenglicol. As raízes foram mantidas em 37°C em ambiente úmido e escuro. Imagens padronizadas foram realizadas e mostraram que Ledermix causou o maior escurecimento, enquanto hidróxido de cálcio e os materiais em polietilenglicol não causaram o escurecimento das amostras.

Akçay et al. (2014) avaliaram a descoloração coronária induzida por vários tipos de combinações antibióticas em setenta incisivos bovinos no período de tempo de 1 dia, 1 semana, 2 semanas e 3 semanas utilizando um espectrofotômetro e o sistema CIELAB. As substâncias testadas foram: hidróxido de cálcio, pasta biantibiótica, pasta triantibiótica, pasta triantibiótica substituindo a minociclina pelas seguintes substâncias: doxicilina, amoxicilina e cefaclor. O resultado obtido revelou que o grupo controle, o hidróxido de cálcio e a pasta biantibiótica não apresentaram mudança de coloração.

Kahler et al. (2014) realizaram um estudo clínico prospectivo de relatos de resultados preliminares de procedimentos de revascularização com acompanhamento de pelo menos 18 meses. O procedimento foi realizado em 16 dentes, sendo 3 pré-molares inferiores e 13 incisivos centrais que sofreram trauma dental e foi utilizada a pasta triantibiótica modificada com amoxicilina. Foram feitas análise qualitativa da regressão da radiolucidez apical e do fechamento apical dos casos. Um programa de imagem geométrica que calcula em porcentagem as medidas em tamanho da raiz e espessura da parede dentinária foi utilizado para a análise quantitativa, que comparou as radiografias iniciais e de acompanhamento do caso. Na avaliação qualitativa houve desaparecimento da imagem radiolúcida apical em

90,3% dos casos. O fechamento apical foi avaliado como incompleto em 47,2% e o completo fechamento apical foi identificado em 19,4% dos casos. Na avaliação quantitativa houve mudança no comprimento da raiz variando de -2,7% a 25,3% e mudança na espessura da dentina radicular de -1,9% a 72,6%. O estudo concluiu que apesar do programa utilizado controlar mudanças de angulação, nem todos os casos podem utilizar essa ferramenta por sobreposição de imagem da junção amelocementária e da erupção de outros elementos e que a descoloração coronária foi uma consequência comum, com perda estética em 10 dos 16 casos, mesmo substituindo a minociclina pela amoxicilina.

Dettwiler et al. (2016) avaliou com Vita Easyshade compact a alteração de cor de produtos odontológicos por 12 meses em cavidades cilíndricas realizadas em 330 blocos compostos de esmalte e dentina bovinos distribuídos em 22 grupos. O estudo concluiu que houve alteração de cor no cimento de Portland associado ao óxido de bismuto (H-MED BiOx), a pasta triantibiótica modificada com cefuroxime (M-TreVitaMix) e a pasta biantibiótica (N-BiMix).

Kahler, Rossi-Fedele (2016) realizaram uma revisão sistemática dos casos publicados para determinar a incidência de descoloração reportados nos casos de revascularização pulpar e examinar se houve a associação de algum material em particular relacionado a isso. Eles revisaram 80 estudos e 379 dentes e concluíram que houve uma forte associação entre descoloração coronária e pasta triantibiótica utilizando minociclina, entretanto descoloração também foi observada quando outros materiais foram utilizados. MTA também foi associado com a pigmentação coronária, contudo ainda há pouca evidência de um material superior a ele que possa ser utilizado como alternativa como barreira entre o coágulo e a coroa.

Porter et al. (2016) avaliaram pastas triantibióticas utilizando minociclina ou doxiciclina e 4 concentrações de minociclina e doxiciclina separadamente, com grupo sem antibiótico e grupo sem tratamento servindo como controle da mudança de coloração. A coloração foi mensurada de acordo com o CIELAB após 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias e com as diferenças sendo expressas por meio do ΔE^* . Microscopia eletrônica de varredura e Espectroscopia de raios X por dispersão em energia também foram realizadas nas amostras após o tratamento. Após o primeiro dia ocorreu uma descoloração severa nas amostras. Ao final do experimento o antibiótico obliterou totalmente ou parcialmente os túbulos dentinários. A presença de minociclina resultou em uma maior diferença de cor do que a promovida pela doxiciclina.

Możyńska et al. (2017) realizaram uma revisão sistemática de estudos *in vitro* sobre descoloração coronária induzida por diferentes cimentos a base de silicato de cálcio. O

resultado da revisão indicou que alguns materiais mostraram forte potencial de pigmentação incluindo MTA cinza e branco, ProRoot MTA cinza e branco e Ortho MTA, enquanto outros materiais mostraram somente mudanças suaves na coloração.

Alternativas para diminuir a alteração da coloração dentária: Reynolds, Johnson. Cohenca (2009) fizeram um relato de caso de revascularização utilizando uma técnica para evitar a descoloração causada pela pasta triantibiótica em 2 dentes na mesma paciente. O protocolo de revascularização foi realizado com hipoclorito de sódio a 6%, solução salina e irrigação final com clorexidina a 2% e a pasta triantibiótica teve a concentração de 250mg de cada antibiótico, utilizando como veículo água esterilizada. Para evitar o contato da pasta triantibiótica com as paredes dentinárias foi feito o condicionamento do dente com ataque ácido com ácido fosfórico e sistema adesivo, então um Projetor de Canal Radicular com a espessura de uma lima K 20 foi inserido dentro do canal para manter patência e o espaço entre o projetor e a dentina foi inserida uma resina flow e fotopolimerizada, para que após esse selamento dos túbulos dentinários houvesse a aplicação da pasta triantibiótica. Após acompanhamento de 18 meses os dentes apresentaram sucesso clínico e radiográfico, com um dos dentes não apresentando mudança de coloração visível fotograficamente e o outro elemento apresentando um acinzentamento cervical que segundo os autores se deve ao uso do MTA cinza.

Kim et al. (2010) realizaram um relato de caso sobre o uso da pasta triantibiótica para revascularização, o escurecimento causado após seis semanas e a tentativa de clareamento do elemento e um estudo *in vitro* em relação ao agente causador do escurecimento e uma alternativa para diminuir essa perda estética. No relato de caso o protocolo de clareamento interno melhorou a perda estética, mas não de fazer o escurecimento do terço cervical desaparecer. O estudo *in vitro* em relação a substância que causa a descoloração dentinária avaliou cada substância componente da pasta em um fragmento dentário e constatou que a minociclina é a substância responsável. A partir disso outro estudo *in vitro* foi realizado utilizando sistema adesivo nos fragmentos dentários para prevenir ou reduzir a descoloração e o grau de descoloração foi avaliado usando um colorímetro. A conclusão foi que o sistema adesivo reduziu a intensidade da descoloração, mas não foi capaz de preveni-la.

Sistema adesivo: Dieng-Sarr et al. (2011) utilizaram análise termogravimétrica e infravermelha, além de comparação com ácido láctico e ácido fosfórico na quelação de cálcio com objetivo de analisar a força do ácido e sua concentração em quatro sistemas adesivos autocondicionantes e testar se o conceito de adesão/descalcificação funciona da mesma maneira para todos os produtos. Os sistemas adesivos autocondicionantes foram dissolvidos

em um solvente de água-etanol a 50% e reagidos com apatita biológica na forma de pó de dentina para quantificar a liberação de cálcio e estudar os produtos da reação em relação a função de força do ácido e da concentração. A conclusão do estudo foi que adesivos autocondicionantes podem ser diferenciados e classificados em dois tipos: Ácidos fracos, como o OptiBond All-in-one, se ligam à fase mineral e liberam pouco cálcio, enquanto ácidos fortes se aderem aos íons cálcios, desmineralizando mais e tendem a apresentar falha de união dos tecidos duros da dentina por formarem mais sais de cálcio solúveis.

Giachetti et al. (2011) compararam um sistema adesivo de dois passos e um sistema adesivo autocondicionante de um passo avaliando a influência da experiência clínica na força de adesão. Estudantes do segundo ano aplicaram o sistema adesivo em uma metade da amostra, enquanto dentistas com experiência em dentística aplicaram o mesmo adesivo na outra metade da amostra. Após isso uma resina composta foi aplicada por cima e os espécimes sofreram termociclagem para testar a força de adesão. A força de adesão dos adesivos autocondicionantes foi similar entre o grupo dos estudantes e dos especialistas, enquanto que o adesivo de dois passos mostrou melhor resultado com a aplicação do grupo dos especialistas.

Fu et al. (2017) avaliaram a influência de diferentes durações de jato de ar na microtensão da força de união de cinco sistemas adesivos de passo único a dentina. Eles utilizaram 105 molares sem cárie e aplicaram o adesivo conforme as instruções do fabricante e aplicaram jato de ar a 0, 5, 15 ou 30 segundos antes de fotopolimerizar. A força de adesão foi determinada após as amostras ficarem 24h armazenadas em água por meio do teste de resistência a microtensão. O padrão de fratura na superfície dentinária, assim como a interface resina-dentina foram analisados por microscopia eletrônica de varredura. O resultado revelou o efeito do tempo de duração do jato de ar na força de adesão dos materiais a dentina. OptiBond All-in-one (76.34 ± 19.15 MPa), o sistema adesivo usado em nosso estudo, obteve a maior força de adesão dos cinco sistemas adesivos de passo único testados ao ser submetido a jato de ar por 15 segundos e foi estatisticamente diferente em relação aos dois últimos adesivos em desempenho.

Apicificação utilizando MTA como tratamento para dentes imaturos necrosados: Shabahang et al. (1999) compararam a eficiência da proteína osteogênica-1, MTA e hidróxido de cálcio na formação de barreira apical em raízes com ápice aberto de cachorros. Após indução de lesões periapicais ao deixar os dentes despolpados expostos a cavidade oral por 14 dias, os canais foram instrumentados e hidróxido de cálcio foi colocado para descontaminar o canal por 1 semana. Após remoção do hidróxido de cálcio os canais receberam um dos três

materiais supracitados e depois de 12 semanas os animais sofreram eutanásia e os elementos sofreram avaliação histomorfológica. O estudo concluiu que o MTA promoveu uma barreira apical mais rígida e que o grau de inflamação não foi diferente entre os grupos.

Holden et al. (2008) analisaram os resultados clínicos do ProRoot MTA de forma retrospectiva em 20 dentes com ápice aberto, obtendo cicatrização e ausência de sinais clínicos em 85% (17 dentes) dos casos. Indicando a utilização do material para uso em apicificação.

Witherspoon et al. (2008) realizaram um estudo retrospectivo de 78 elementos dentários anteriores e posteriores necrosados de ápice aberto de pacientes atendidos entre 1999 e 2006, analisando o resultado do tratamento de apicificação realizado com MTA. A média do tempo de preservação foi de 19,4 meses e 76,6% dos dentes em que a apicificação foi realizada em 1 visita e 74,2% em que o tratamento foi realizado em 2 sessões apresentaram total indução de tecido mineralizado na região periapical e ausência de sintomatologia.

Mente et al. (2009) realizaram um estudo retrospectivo avaliando os resultados de apicificação com MTA em dentes de ápice aberto. Cinquenta e seis dentes apresentando reabsorção apical externa ou ápice excessivamente aberto foram tratados entre 2000 e 2006, com preservação em média de 30,9 meses e 78% dos elementos que antes possuíam lesão periapical, apresentaram completa mineralização tecidual do local, sendo, portanto, recomendado o seu uso para apicificação.

Revascularização em dentes imaturos necrosados: Jung, Lee, Hargreaves (2008) fizeram uma série de relato de casos de 4 dentes permanentes com necrose pulpar e periodontite periapical com formação radicular incompleta que foram submetidos a revascularização utilizando hipoclorito de sódio e pasta triantibiótica. Após 1 a 5 anos de acompanhamento os pacientes estavam assintomáticos, sem evidências de periodontite apical e o exame radiográfico mostrava aumento da espessura das paredes dentinárias, fechamento apical e aumento do tamanho radicular.

Shah et al. (2008) realizaram um estudo clínico piloto avaliando a eficiência do procedimento de revascularização em 14 casos de dentes necrosados com rizogênese incompleta utilizando hipoclorito de sódio a 2,5%, água oxigenada a 3% e formocresol. Os pacientes retornaram a cada 3 meses para acompanhamento e a preservação teve duração de 0,5 a 3,5 anos. Os resultados foram considerados favoráveis, pois 78% dos casos não apresentavam radiolucidez apical, nenhum paciente apresentou sintomatologia dolorosa ou

fístula, 57% dos casos apresentou aumento da espessura das paredes dentinárias e 71% apresentaram crescimento radicular.

Trope (2008) realizou uma compilação de conhecimento sobre o potencial de salvar ou de regenerar a polpa como procedimento odontológico de rotina e uma adaptação do protocolo de confecção da pasta 3Mix, em que é usado Ciprofloxacina 200mg, Metronidazol 500mg, Minociclina 100mg e como veículo tem propilenoglicol e macrogol, com sugestão de uso de duas consistências: 1:5 (Veículo:3Mix) para consistência cremosa e 1:7 (mistura padrão).

Bose, Nummikoski, Hargreaves (2009) fizeram um estudo retrospectivo utilizando radiografias de casos de revascularização pulpar, tendo como grupo controle radiografias de grupos que sofreram apicificação para avaliar o crescimento radicular e espessamento das paredes dentinárias e a influência da substância utilizada. As radiografias iniciais foram comparadas com as radiografias de preservação de casos de revascularização utilizando pasta triantibiótica, hidróxido de cálcio e formocresol, para avaliação dos critérios supracitados, comparando os grupos entre si e com o grupo controle. Eles concluíram que a pasta triantibiótica e o hidróxido de cálcio promoveram crescimento radicular em relação ao grupo controle e que o espessamento da parede radicular foi maior quando utilizada a pasta triantibiótica em relação ao hidróxido de cálcio e ao formocresol.

Ding et al. (2009) avaliaram o efeito da revascularização pulpar em pacientes com dentes necrosados com formação radicular incompleta seguindo o protocolo de hipoclorito de sódio a 5,25% e utilização da pasta triantibiótica por 1 semana. Após 15 meses os 3 dentes do estudo apresentaram formação radicular completa e resposta positiva ao teste de vitalidade pulpar.

Nosrat, Seifi, Asgary (2011) fizeram um relato de caso de dois primeiros molares inferiores necrosados com ápice aberto, de um paciente de 9 anos e uma paciente de 8 anos usando hipoclorito de sódio a 5,25% e pasta triantibiótica por 3 semanas na consistência pastosa e usando como veículo solução salina. A mistura enriquecida por cálcio (CEM) foi utilizada substituindo o MTA pela característica da superfície ser igual à da dentina. Os dois casos apresentaram sucesso clínico, com crescimento radicular e aumento da espessura das paredes dentinárias, radiográfico e cura de todos os sintomas.

Garcia-Godoy, Murray (2012) realizaram uma revisão da literatura e sugeriram diretrizes em relação a seleção do caso, uso de anestésico e substâncias a serem utilizadas. A conclusão da revisão é que ainda não há evidências a longo prazo que embasem a recomendação da revascularização pulpar.

Diogenes et al. (2014) realizaram uma revisão sobre os avanços recentes de pesquisas translacionais em relação a desinfecção nos casos de regeneração endodôntica e descreveram um protocolo a ser seguido. O estudo concluiu que mais estudos sobre desinfecção e criação de um ambiente propício para crescimento celular são necessários.

Conde et al. (2017) realizaram uma revisão avaliando a literatura sobre dentes permanentes necrosados que foram submetidos ao tratamento de revascularização e chegaram à conclusão que: O tempo de acompanhamento dos casos nos estudos é em média de 17,6 meses, que a concentração do hipoclorito de sódio varia entre 0,5 a 6% e que foi a substância utilizada em quase todos os casos, a falha do procedimento foi relacionada principalmente a recontaminação do canal radicular e a maioria dos casos apresentou um aumento no comprimento da raiz e nas paredes dentinárias. Entretanto a maioria dos dados é proveniente de relato de casos e estudos clínicos comparando o procedimento de revascularização com a apicificação são necessários e deficientes na literatura disponível para revisão.

Mecanismo de formação do biofilme e interação com a dentina humana: Love (2001) buscou identificar o mecanismo que explicaria o mecanismo de sobrevivência e crescimento do *E. faecalis* em tubos dentinários, sendo possível a recontaminação de canais radiculares obturados. *E. faecalis* JH2-2 foram cultivados em meio *Brain heart infusion* contendo quantidades variadas de soro sanguíneo humano por 56 dias. A habilidade de invadir dentina e se ligar ao colágeno tipo I na presença de soro humano foi avaliada por meio de experimentos de invasão dentinária e placa de microtitulação. O resultado encontrado é que o fator de virulência do *E. faecalis* pode estar relacionado a habilidade das células se manterem capazes de invadir os túbulos dentinários e aderir ao colágeno em presença de soro humano.

Jefferson (2004) discutiu os dados presentes na literatura referentes a genética molecular da formação de biofilme de diversas espécies e a motivação que leva essas espécies de realizar a transição de um crescimento planctônico para um crescimento sésil no corpo humano. A conclusão do estudo foram quatro potenciais incentivos: defesa, colonização, benefícios na cooperação, biofilmes são o padrão de crescimento do biofilme e culturas planctônicas só ocorrem *in vitro*.

Kishen, George, Kumar (2006) investigaram a interação entre o *E. faecalis* e a dentina presente no canal radicular. No grupo 1 as amostras foram incubadas com *E. faecalis* por períodos de 2, 4 e 6 semanas e a composição química do biofilme foi determinada usando difração de raio-x e espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier e os sedimentos formados pela interação da bactéria com a dentina também foram examinados pela espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier e microscopia eletrônica de

varredura. Já as espécies do grupo 2 foram incubadas por 6 semanas e a topografia e ultraestrutura do biofilme foram examinados utilizando a microscopia eletrônica de varredura, microscopia de luz e microscopia confocal de varredura a laser. A conclusão que o estudo chegou foi que a habilidade do *E. faecalis* de induzir um biofilme tão calcificado na dentina do canal radicular pode ser o fator que contribui para sua persistência após o tratamento endodôntico.

Liu et al. (2010) investigaram a capacidade de formação do biofilme do *E. faecalis* (ATCC) 29212 em diferentes fases de crescimento na dentina humana e em blocos de poliestireno, usando como metodologia a microscopia eletrônica de varredura e placa de microtitulação. A susceptibilidade do biofilme ao hipoclorito de sódio a 5,25% também foi avaliada por meio de plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônia. O estudo teve como resultado que células no estágio de inanição foram capazes de formar biofilme na dentina com eficiência reduzida em comparação com células nas fases exponencial e estacionárias. O crescimento de biofilme em dentina também possuía mais células que o crescimento em poliestireno. Os biofilmes das células em inanição foram mais resistentes ao hipoclorito de sódio a 5,25% do que as em fase estacionária e o impacto do hipoclorito nelas também diminuiu à medida que o biofilme amadurecia.

Ação antibacteriana da medicação antibiótica: Sato et al. (1993) avaliaram a eficácia da mistura de ciprofloxacina, metronidazol e um terceiro antibiótico (amoxicilina, cefaclor, cefroxadina, fosfomicina ou rokitamicina) contra patógenos de lesões cariosas e polpas infectadas de dentes decíduos. O resultado foi que as novas combinações de drogas em concentração de 100ug/ml foram capazes de inibir o crescimento de bactérias em placas de cultura. Eles também testaram a combinação ciprofloxacina, metronidazol e cefaclor *in situ* colocando os antibióticos em cima de dentes extraídos partidos ao meio de um dia para o outro e nenhuma bactéria foi recuperada.

Hoshino et al. (1996) utilizaram ciprofloxacina, metronidazol e minociclina separadamente e combinadas para testar a eficiência antibiótica em amostras infectadas por bactérias provenientes de polpas necrosadas utilizando placas de BHI-ágar sangue. Quando usadas em combinação na concentração de 25 µg/ml a pasta triantibiótica eliminava totalmente as bactérias, enquanto mesmo em maiores concentrações, cada antibiótico individualmente não possuía a capacidade de eliminar completamente a viabilidade bacteriana.

Skucaite et al. (2010) avaliaram a suscetibilidade de patógenos predominantes na endodontia isolados de dentes sintomáticos com periodontite apical aos antibióticos

comumente prescritos. Amostras microbianas de 47 casos de infecção primária e 11 casos de infecção secundária, foram retiradas do canal radicular, em 35 casos, ou de aspiração do abscesso apical, em 23 casos. Meio de cultura foi utilizado para identificar as bactérias presentes nas amostras e a suscetibilidade antibiótica foi avaliada com Etest. Na infecção primária as principais bactérias encontradas foram *Streptococci* e anaeróbios estritos, já na infecção secundária a bactéria predominante foi o *E. faecalis*. Todas as bactérias foram altamente sensíveis a penicilina G, amoxicilina e ampicilina, entretanto somente 73,8% das amostras foram suscetíveis a clindamicina, 54,7% a eritromicina e 60% a tetraciclina. Mais de 50% dos anaeróbios foram resistentes ao metronidazol e todas as amostras de *E. faecalis* isoladas foram resistentes a clindamicina.

Gomes et al. (2011) analisaram a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias isoladas de infecções endodônticas primárias no Brasil durante 9 anos. Além disso, analisaram se ao longo desse período de tempo houve algum padrão de desenvolvimento de resistência a alguns dos antibióticos frequentemente prescritos em endodontia. Amostras foram colhidas de canais radiculares e identificadas por cultura. A suscetibilidade das bactérias foi determinada pela concentração inibitória mínima da amoxicilina, amoxicilina + clavulanato, benzilpenicilina, clindamicina, eritromicina e metronidazol utilizando o Etest. A pesquisa teve como resultado que amoxicilina e amoxicilina + clavulanato foram efetivas na maioria das espécies nos diferentes períodos de estudo. Houve pouca diferença estatística em relação a suscetibilidade bacteriana ao longo do período avaliado. Entretanto, é possível observar um aumento na resistência de bactérias anaeróbias a penicilina G e clindamicina. A resistência a eritromicina foi observada em todas as espécies.

McTigue, Subramanian, Kumar (2013) realizaram uma série de relatos de casos clínicos em que usaram pasta triantibiótica com MTA cinza, pasta triantibiótica modificada com clindamicina e MTA cinza e pasta triantibiótica modificada com clindamicina e MTA branco. Os casos tiveram acompanhamento em relação ao sucesso de descontaminação e de alteração de coloração coronária. Em 32 casos, 10 foram tratados com pasta 3Mix e MTA cinza e 7 apresentaram mudança de coloração, já 22 casos foram tratados com pasta triantibiótica modificada com clindamicina e MTA branco e 7 apresentaram mudança de coloração. A presença de lesão periapical só permaneceu em 1 caso, fechamento do ápice ocorreu em 23 casos e espessamento das paredes dentinárias aconteceram em 22 casos.

Ordinola-Zapata et al. (2013) testaram o efeito antibacteriano da pasta triantibiótica, clorexidina gel a 2% e hidróxido de cálcio utilizando quarenta e cinco dentes bovinos contaminados oralmente para colonização da dentina por biofilme por meio de um aparelho

ortodôntico removível. As amostras foram tratadas com medicação por 7 dias e foram avaliadas imediatamente após a eliminação da medicação e após incubação em meio BHI por 24h utilizando microscopia confocal de varredura e a técnica *Live/Dead* para obter a porcentagem de células vivas. O resultado antibacteriano mais efetivo foi obtido pela pasta triantibiótica, que foi utilizado 250mg de ciprofloxacina, 250mg de metronidazol, 100mg de minociclina misturados ao propileno glicol numa proporção de aproximadamente 7:4 pó/propilenoglicol para obter uma consistência pastosa, em comparação com os outros medicamentos e grupo controle.

Sabrah, Yassen, Gregory (2013) avaliaram a concentração inibitória mínima (CIM), a concentração bactericida mínima (CBM) e concentração inibitória de biofilme mínima (CIBM) da pasta triantibiótica, biantibiótica e do hidróxido de cálcio em relação ao *E.faecalis* utilizando uma placa de microtitulação. Diferentes diluições das substâncias foram utilizadas na bactéria, variando da proporção de 1:10 até 1:64,000 e a turbidez das culturas bacterianas na placa de microtitulação foram avaliadas por densidade ótica a 490nm utilizando um espectrofotômetro. Tiveram como resultado que as pastas antibióticas foram mais efetivas que Ca(OH)_2 contra *E. faecalis* e que a pasta biantibiótica é uma substância efetiva e comparável a pasta triantibiótica, podendo ser usada como sua substituta.

Algarni, Yassen, Gregory (2015) analisaram longitudinalmente o efeito inibitório de géis a base de metilcelulose contendo 1mg/ml de pasta triantibiótica modificada com clindamicina e pasta biantibiótica contra biofilme de *E. faecalis*. A cultura do biofilme foi feita individualmente e seu crescimento ocorreu em placas de microtitulação de 96 poços por 48h. Após esse período de tempo o biofilme foi tratado com as duas medicações supracitadas e placebo e suas ações foram avaliadas imediatamente, após 1 mês e após 3 meses e ambas as substâncias reduziram significativamente a formação de biofilme em todos os períodos de tempo avaliados.

Carbajal Mejía; Aguilar Arrieta (2016) avaliaram a viabilidade de *E. faecalis* [ATCC] 29212 em amostras de dente humano após 14 dias de colocação das medicações intracanal. As amostras dentinárias foram coletadas e coradas pela técnica *Live/Dead* para obter a porcentagem de células viáveis por meio da microscopia de fluorescência. A pasta triantibiótica, composta por 500 mg de ciprofloxacina, 500mg de metronidazol, 100 mg de minociclina e veículo propilenoglicol foram misturados para obter uma consistência pastosa com proporção aproximada de 7:4 de pó/propilenoglicol, reduziu significativamente a viabilidade de *E.faecalis* comparando a clorexidina gel a 2% e ao hidróxido de cálcio.

Devaraj, Jagannathan, Neelakantan (2016) realizaram um estudo com microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) testando a atividade antimicrobiana de medicamentos intracanal na luz do canal e dentro de túbulos dentinários em duas profundidades contra *E. faecalis* [ATCC] 29212. A irrigação foi feita com hipoclorito de sódio a 3% por 15 minutos e as pastas antibióticas tiveram proporção de 1mg/ml, com o veículo sendo água estéril. O biofilme da luz do canal foi completamente rompido quando a pasta 3MIX foi utilizada, o que não foi alcançado com o uso da pasta biantibiótica, clorexidina a 2% em gel e com o hidróxido de cálcio em gel. A porcentagem de células mortas dentro dos túbulos dentinários em duas profundidades também foi maior quando a pasta 3MIX foi utilizada em comparação com a pasta biantibiótica, a clorexidina em gel e o Ca(OH)₂.

Atividade citotóxica das medicações antibióticas: Ruparel et al. (2012) pesquisaram o efeito após 3 dias da pasta triantibiótica, biantibiótica, triantibiótica modificada por cefaclor, e do hidróxido de cálcio em várias concentrações, variando de 100 mg/mL a 0,01 mg/mL, nas células-tronco da papila apical utilizando a técnica de exclusão por typan blue. Como resultado a citotoxicidade foi dependente da concentração, ou seja, quanto maior a concentração, menor a sobrevivência e proliferação celular.

Chuensombat et al. (2013) determinaram a citotoxicidade e efeito antibacteriano da pasta 3Mix e de cada antibiótico componente da pasta 3Mix. Para o teste de citotoxicidade células da polpa dental humana e células da papila apical foram expostas a pasta 3Mix ou aos componentes dela individualmente usando concentrações de 0.024, 0.097, 0.39, 1.56, 6.25, and 25.00 µg/mL por 1, 3, 5 e 7 dias. A viabilidade celular foi determinada por meio do um teste de microcultura na presença de metil tetrazólio (MTT) e o teste antibacteriano foi realizado utilizando bactérias isoladas de dentes necrosados e contando as bactérias sobreviventes no ágar sangue após elas serem expostas a pasta 3Mix e aos antibióticos individualmente em concentrações de 25.00 µg/mL e 0.39 µg/mL. A menor concentração foi a que promoveu maior viabilidade celular e 3Mix a 0.39 µg/mL por 7 dias foi capaz de promover mais de 90% de viabilidade celular, mas não foi capaz de erradicar todas as bactérias, o que foi possível na concentração de 25.00 µg/mL. Somente o metronidazol foi não-tóxico e a pasta 3Mix gerou mais citotoxicidade do que os antibióticos individualmente, além disso a citotoxicidade aumentou de acordo com a concentração e o tempo de uso.

Althumairy, Teixeira, Diogenes (2014) fizeram discos de dentina com o diâmetro do canal padronizado em 3,2mm e colocaram os discos em contato com pasta triantibiótica ou biantibiótica em concentrações de 1mg/ml ou 1000mg/ml por 7 ou 28 dias. Após a medicação ser removida, as amostras foram colocadas em meio de cultura por 7 dias e tiveram sua

viabilidade celular determinada usando o ensaio de bioluminescência CellTiter-Glo. As células que foram expostas a concentração clinicamente mais usada da medicação antibiótica (1000mg/ml) não sobreviveram a essa exposição. Já a concentração de 1mg/ml fez com que as células permanecessem viáveis.

Labban et al. (2014) avaliaram os efeitos do hidróxido de cálcio, pasta triantibiótica e pasta biantibiótica na sobrevivência das células da polpa dentária humana utilizando concentrações de 0,3; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 5mg/ml por 3 dias. A citotoxicidade foi avaliada pelo Ensaio de Lactato Desidrogenase (LDH) e a proliferação celular foi aferida pelo ensaio de viabilidade celular (WST-1). Como resultado somente a concentração de 5mg/ml de Ca(OH)_2 e de pasta triantibiótica causaram citotoxicidade, enquanto a pasta biantibiótica causou citotoxicidade nas concentrações 0,5; 1; 2,5 e 5mg/ml, já em relação a proliferação celular a concentração ideal foi de 0,3 para a pasta biantibiótica, 2 para a pasta triantibiótica e 2,5 para o hidróxido de cálcio.

Sabrah et al. (2015) investigaram qual a concentração necessária para ter um bom efeito antibacteriano em *E. faecalis* sem citotoxicidade usando várias diluições da pasta triantibiótica e biantibiótica (0,125; 0,25; 0,5; 1 e 10 mg/ml) na sobrevivência das células da polpa dentária humana. Após 3 dias da colocação da pasta, foram utilizados o ensaio LDH e o ensaio de viabilidade celular (WST-1) e contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/ml). Os resultados apresentados no ensaio LDH foram que a pasta triantibiótica é antibacteriana sem efeito citotóxico na concentração de 0,25 e 0,125mg/ml, enquanto a pasta biantibiótica é antibacteriana sem efeito citotóxico nas concentrações de 0,125; 0,25; 0,5 mg/ml, já o ensaio WST-1 concluiu que somente a concentração de 0,125mg/ml em ambas as pastas não reduziram a viabilidade celular. Todas as concentrações diminuíram as UFC/ml bacterianas.

Veículos utilizados na medicação antibiótica: Cruz et al. (2002) avaliaram a penetração de propilenoglicol na dentina radicular. O corante vermelho safranina O foi misturado ao propilenoglicol e a água destilada que foram colocados nos canais radiculares com ou sem *smear layer* artificial. A difusão do corante através dos túbulos dentinários foi aferida por um espectrofotômetro e o tempo para que o corante saísse pelo forame apical utilizando as duas substâncias também foi determinado. As áreas e extensão da penetração do corante nas superfícies divididas das raízes também foram avaliadas usando Adobe Photoshop e NIH Image Software. O resultado do estudo foi que o propilenoglicol permitiu uma maior penetrabilidade do corante em relação a área e profundidade, assim como teve a saída mais

rápida pelo forame apical ($P < 0.0001$) e a presença de *smear layer* fez com que levasse mais tempo para o corante penetrar na dentina.

Gomes-Filho et al. (2012) tiveram como objetivo avaliar a resposta do tecido subcutâneo do rato a tubos de polietileno preenchidos com pasta triantibiótica, hidróxido de cálcio, propilenoglicol e macrogol. Em um grupo de trinta ratos colocaram um tubo contendo pasta triantibiótica, outro contendo hidróxido de cálcio e um tubo vazio como controle. Em outro grupo contendo trinta ratos foram testados os veículos: um tubo recebeu propilenoglicol, outro recebeu macrogol e uma cirurgia placebo foi feita como controle. Após 7, 15, 30, 60 e 90 dias, 12 animais sofreram eutanásia e os tubos e tecidos circundantes foram removidos e analisados histologicamente usando glicol metacrilato e corados com hematoxilina eosina. A numeração histológica atribuída foi de 0 a 3 dependendo do conteúdo das células inflamatórias. A capsula fibrosa foi considerada fina ou grossa, a necrose e a calcificação foram classificadas em presente ou ausente. O resultado apresentado foi que as duas medicações induziram reações inflamatórias moderadas a 7 e 15 dias, mas essas reações foram semelhantes ao do grupo controle ($P > 0,05$) e a intensidade diminuiu para leve do dia 30 em diante ($P > 0,05$). O estudo também concluiu que os veículos não interferem com a reação causada pelos medicamentos.

Proliferação celular e efeitos da minociclina: Ramamurthy et al. (2002) testaram seis diferentes tipos de tetraciclina para prevenir reabsorção óssea no tecido periodontal, que é dependente de metaloproteinase de matriz, em um modelo animal de periodontite. Para isso ratos adultos foram usados e *Escherichia coli* foi aplicada por meio de injeções intragengivais e foram distribuídos em grupos de acordo com o tratamento recebido. O tecido gengival foi removido e testado para gelatinase e as mandíbulas dos ratos foram processadas na histologia e na imunohistoquímica para citocinas: fator de necrose tumoral(TNF), interleucinas-1(IL-1), IL-6 e Metaloproteinases de matriz 2 e 9. Todas as tetraciclinas testadas inibiram o colapso periodontal, portanto a perda óssea modulada por metaloproteinase de matriz pode ser prevenida pela utilização de tetraciclinas.

Yao et al. (2007) examinaram os efeitos da doxiciclina e da minociclina no fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e na indução de migração de célula muscular lisa de aorta humana (HASMC), principalmente em relação aos mecanismos que essas substâncias utilizam para realizar a inibição da migração de HASMC, demonstrando que ambas substâncias possuem efeitos anti-angiogênicos na inibição de migração da HASMC por diferentes transduções de sinais. No caso da minociclina esse efeito é obtido ao atenuar a atividade da metaloproteinase-9 da matriz induzida por VEGF. A citotoxicidade da

minociclina e da doxiciclina foi determinada usando um teste de microcultura na presença de metil tetrazólio (MTT), já para detectar as atividades das MMP-2 e MMP-9 foram utilizados zimogramas, que é uma técnica que permite detectar a atividade de uma determinada enzima diretamente no gel onde se fez a separação eletroforética.

Galler et al. (2011) investigaram se o condicionamento da dentina tinha relação com a resposta celular. As células-tronco da polpa foram cultivadas, transferidas para cilindros de dentina e transplantadas em ratos imunocomprometidos de forma subcutânea. Antes de receberem as células, os cilindros de dentina foram preparados com hipoclorito de sódio ou condicionados com EDTA. Os cilindros foram retirados após 6 semanas e submetidos a análises histológicas e imunohistoquímica. A dentina tratada com NaOCl apresentou células multinucleadas com atividade clástica que criaram áreas de reabsorção na interface célula-dentina. Já após uso do EDTA as células-tronco formaram uma associação íntima com a superfície dentinária e se diferenciaram em células tipo odontoblasto que expressaram sialoproteína dentinária e estenderam o processo celular aos túbulos dentinários. Um tecido mole conectivo vascularizado similar ao da polpa dental foi observado dentro do cilindro de dentina.

Lovelace et al. (2011) demonstraram que o passo de promover sangramento no interior do canal radicular no processo de revascularização desencadeia um acúmulo de células-tronco indiferenciadas, em que essas células podem contribuir para a regeneração dos tecidos pulpare após descontaminação do dente com rizogênese incompleta e necrose pulpar. Essa descontaminação foi realizada usando NaOCl a 6% e pasta triantibiótica em consistência pastosa, sendo o veículo água bidestilada estéril, por 1 mês. Na segunda sessão o sangramento intracanal foi estimulado e amostras do sangue foram coletadas por cones de papel e submetidas a reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real e imunocitoquímica para comparar os genes transcritos e proteínas encontradas nas amostras aos níveis encontrados na circulação sistêmica. O resultado foi os marcadores de células-tronco CD73 e CD105 foram comparáveis aos níveis encontrados no sangue sistêmico. Esse efeito se mostrou seletivo, por não haver mudanças na expressão dos marcadores de diferenciação ALK-P, DSPP, ZBTB16 e CD14. Análise histológica demonstraram que as células expressaram CD105 e STRO-1, que são marcadores de células-tronco mesenquimais, portanto o sangramento provocado pode contribuir para a regeneração pulpar.

Kim et al. (2015) estudaram em dentina radicular o efeito do tratamento de duas concentrações de pasta biantibiótica e do uso de EDTA a 17% na adesão e proliferação das células-tronco da polpa. Os grupos foram tratados na concentração de 500mg/ml ou 1mg/ml

com ou sem EDTA. As células foram cultivadas na dentina e o ensaio de Lactato Desidrogenase foi usado para calcular a quantidade de células após 1 dia de incubação. O ensaio de viabilidade celular WST-1 foi utilizado após 3 dias do tratamento para verificar a proliferação das células. O estudo concluiu que o uso de 1mg/ml seguido por 10 minutos de irrigação com EDTA não teve efeitos negativos na adesão e proliferação das células-tronco da polpa.

Galler et al. (2016) avaliaram o efeito do condicionamento da dentina em relação a migração, adesão e diferenciação das células-tronco da polpa. Os discos de dentina foram utilizados e receberam um tratamento prévio usando EDTA 10%, NaOCl a 5,25% ou água. A migração das células-tronco em direção a dentina foi avaliada após 24 e 48h com um ensaio modificado de câmara de Boyden. A adesão celular foi avaliada indiretamente por meio da viabilidade celular. Expressão dos gens associados a mineralização (COL1A1, ALP, BSP, DSPP, RUNX2) em células cultivadas no tratamento prévio da dentina foi determinado por RT-qPCR. O estudo concluiu que o EDTA promoveu adesão, migração e diferenciação das células-tronco em direção ou dentro da dentina.

Relação entre EDTA e a liberação de fatores de crescimento: Tomson et al. (2007) determinaram a composição iônica metálica por meio de espectrometria de absorção atômica das seguintes substâncias: MTA branco e cinza, hidróxido de cálcio e EDTA a 10%. Os componentes em pó da matriz extracelular da dentina foram extraídos usando todas as soluções por mais de 14 dias. Os extratos foram então analisados em busca de concentração de proteínas não-colagenosas e glicosaminoglicanos. O perfil proteico foi examinado usando eletroforese em gel de poliacrilamida. Para análise do TGF- β 1 e adrenomedulina o teste ELISA foi utilizado. O estudo detectou a presença de íons de alumínio, cálcio, potássio e sódio no MTA branco e cinza. Embora MTA e hidróxido de cálcio tenham liberado quantidades similares de proteínas não-colagenosas e glicosaminoglicanos, essa quantidade foi considerada baixa tendo em vista a quantidade liberada com o uso do EDTA. O EDTA também liberou uma maior quantidade de TGF- β 1, enquanto hidróxido de cálcio e MTA cinza liberaram mais adrenomedulina.

Pang et al. (2014) investigaram se o EDTA induzia a liberação de fatores de crescimento. Células-tronco foram colocadas em discos de dentina tratados ou não com EDTA. Após 21 dias de cultura, as expressões de genes de diferenciação foram investigadas por PCR quantitativa em tempo real e a calcificação foi observada usando coloração com vermelho de alizarina S. O resultado do estudo foi que a dentina tratada com EDTA apresentou maior expressão de sialofosfoproteínas dentinárias e proteína da matriz dentinária

1, enquanto as células-tronco cultivadas sem contato direto com a dentina tratada com EDTA não tiveram o mesmo resultado.

Galler et al. (2015) trataram discos de dentina com EDTA ou ácido cítrico e avaliaram com ensaio de imunoabsorção enzimática os fatores de crescimento. Após isso, diferentes substâncias foram testadas em relação a liberação de TGF- β 1 após os discos serem condicionados com EDTA. A conclusão do estudo foi que o EDTA induz a liberação de fatores de crescimento diretamente da dentina.

Hipoclorito de sódio: Zehnder (2006) realizou uma revisão sobre o ambiente pulpar, contaminação intrarradicular, instrumentação do canal radicular, princípios ideais da solução irrigadora, escolha do irrigante principal, comparando clorexidina e hipoclorito de sódio, substâncias quelantes, sugestão de protocolo de irrigação, aspectos técnicos da irrigação do sistema de canais radiculares e visão crítica de outros protocolos de descontaminação comparando-os com o padrão ouro.

Retamozo et al. (2010) tiveram com objetivo determinar a concentração de hipoclorito de sódio e o tempo de irrigação necessários para descontaminar cilindros de dentina contaminados com *E.faecalis*. Foram preparados 450 cilindros padronizados de dentina bovina com luz do canal com 2 a 3mm e as amostras foram contaminadas com *E.faecalis* (ATCC 4082) por 3 semanas em BHI. Os cilindros foram divididos de acordo com a concentração a ser utilizada (1,3%, 2,5% ou 5,25%) e de acordo com o tempo de aplicação (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 minutos) e cada amostra foi colocada em um tubo com BHI e incubada por 72h. Ausência de turbidez demonstrou ausência de crescimento bacteriano e turbidez indicou a presença de bactérias viáveis. O estudo concluiu que o protocolo de irrigação mais efetivo foi a concentração de 5,25% a 40 minutos, enquanto as outras concentrações nesse mesmo tempo foram ineficazes na remoção do *E.faecalis*.

Medicação intracanal associado ao uso do hipoclorito de sódio: Windley et al. (2005) avaliaram a eficácia do hipoclorito de sódio sozinho e combinado com o uso da pasta triantibiótica, composta por metronidazol, ciprofloxacina e minociclina, na desinfecção de dentes imaturos de cães com periodontite apical. Foram realizadas coletas no início do experimento (S1), após a irrigação com hipoclorito de sódio a 1,25% (S2) e após a utilização da pasta triantibiótica (S3). Em S1, 100% das amostras cultivadas foram positivas para as bactérias. No S2, 10% das amostras de cultura eram livres de bactérias. Em S3, ao combinar a ação do hipoclorito de sódio com a pasta triantibiótica, houve uma redução bacteriana de 70%.

Lana et al. (2009) testaram a efetividade do preparo químico mecânico, de pastas de hidróxido de cálcio Calen e Calen com PMCC, associadas ao preparo químico-mecânico do canal radicular por 7 e 14 dias em canais radiculares contaminados por *Enterococcus faecalis*. Após remoção das pastas os dentes foram inseridos em tubos de ensaio contendo o meio Enterococcosel. Os resultados mostraram que a pasta Calen independentemente do tempo mantido no canal radicular só eliminou 70% dos enterococcos e Calen com PMCC eliminou 100% dos enterococcos após 14 dias, esses resultados foram superiores ao preparo químico-mecânico sozinho e colocação da pasta Calen com PMCC por 7 dias, que não eliminaram a viabilidade bacteriana.

Citotoxicidade dos irrigantes odontológicos: Trevino et al. (2011) estudaram se os irrigantes utilizados em endodontia alteram a taxa de sobrevivência das células-tronco da papila apical. A metodologia utilizada foi coletar células-tronco de terceiros molares imaturos e selecionar uma subpopulação de células expressando STRO-1 que foram multiplicadas *in vitro*. Raízes humanas padronizadas foram irrigadas com 1 dos 4 protocolos: EDTA a 17%, NaOCl 6%/ EDTA 17%/ NaOCl 6%, EDTA a 17%/Clorexidina a 2% ou NaOCl 6%/ EDTA 17%/ NaOCl 6%/álcool isopropílico/ Clorexidina a 2%. Células-tronco da papila apical com STRO-1 foram misturadas com plasma rico em plaquetas, colocados na raiz e colocados em meio de cultura por 21 dias. As raízes passaram por descalcificação, processadas para imunohistoquímica e coradas para vimetina e TO-PRO-3. A proporção de células viáveis (coradas por vimetina) foi calculada tendo como base a contagem celular total (TO-PRO-3) de cada grupo. A irrigação com EDTA a 17% mostrou a melhor taxa de sobrevivência celular, seguida por NaOCl 6%/ EDTA 17%/ NaOCl 6% e os grupos que incluíram clorexidina não mostraram viabilidade celular.

Martin et al. (2014) testaram em *ex vivo* várias concentrações de NaOCl avaliando a sobrevivência das células-tronco da papila apical e a expressão da sialofosfoproteína dentinária. Os dentes humanos extraídos foram irrigados com NaOCl nas concentrações de 0,5%, 1,5%, 3% e 6%, seguidos por irrigação com EDTA a 17% ou solução salina estéril. As amostras foram colocadas em meio de cultura por 7 dias e as células viáveis foram quantificadas utilizando um ensaio de bioluminescência. A expressão da sialofosfoproteína dentinária foi avaliada quantitativamente usando PCR quantitativo em tempo real. O resultado foi que altas concentrações de NaOCl tem um efeito negativo profundo na sobrevivência e diferenciação das células-tronco da papila apical e que a melhor combinação para o protocolo de revascularização pulpar foi o uso de NaOCl a 1,5% seguido de EDTA a 17%.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de diferentes formulações de medicações antibióticas em duas diferentes consistências sobre o biofilme de *E. faecalis* formado em dentina humana e verificar o aparecimento de alteração de cor da coroa dos elementos dentários.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a ação antimicrobiana de medicações antibióticas, em diferentes formulações, com concentrações baixas destes medicamentos, sobre biofilme de *E. faecalis* em canais radiculares de dentes humanos;

2. Verificar se essas mesmas medicações antibióticas em duas diferentes consistências (uma pastosa com o propilenoglicol como veículo e uma sólida com o propilenoglicol e o macrogol como veículos) possuem diferença na ação antibacteriana;

3. Avaliar se as alterações na formulação e na consistência das medicações antibióticas interferem na alteração de cor da coroa do elemento dentário.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção dos espécimes

Foram selecionados dentes humanos, unirradiculares, com somente um canal radicular, extraídos e armazenados no Biobanco de dentes da FO/UERJ. Os critérios de seleção utilizados foram: ausência de anomalias, raízes completamente formadas, canais radiculares sem tratamento endodôntico prévio e coroas híginas com ausência de lesões cáries e/ou restaurações. Foram recebidos 80 dentes do Biobanco que foram analisados a partir dos critérios descritos acima e verificados por exame clínico e radiografia periapical. Destes, setenta elementos foram então selecionados, mantidos imersos em solução de timol a 0,1% por sete dias e utilizados em nosso estudo.

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CAAE: 65563417.9.0000.5259 / Número do parecer: 1.983.949).

3.2 Preparo dos elementos dentários

Setenta dentes unirradiculares foram acessados e ampliados até a saída foraminal ter o diâmetro equivalente a uma lima K 50 (Dentsply Maillefer®, Ballaigues, Suíça). Uma área de aferição coronária foi demarcada primeiramente com lápis seguindo o contorno da ponta do sensor do VITA Easyshade (Vita Wilcos, Brea, CA, EUA) em área plana e o mais próximo possível da cervical do dente e quatro pontos foram feitos com broca esférica diamantada 1012 (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) demarcando esse círculo para ser possível avaliar a mesma região posteriormente (Figura 1.A). A *smear layer* das amostras foi removida por imersão primeiro em ácido cítrico a 6% de pH 4,0 (Milfórmulas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), água destilada estéril e depois em em NaOCl a 2,5% (Milfórmulas), durante quatro minutos num banho ultrassônico (Cristófoli Equipamentos de Biossegurança, Campo Mourão, Paraná, Brasil) e, em seguida, foram lavados em água estéril por um minuto. Os dentes tiveram toda a superfície externa, coronária e radicular, sem obstruir a saída foraminal, impermeabilizada por uma camada de cianoacrilato (Super Bonder® Instant Adhesive, Loctite Corp., Rocky Hill,

CT, EUA) e uma camada de esmalte incolor (Impala, Mundial SA Produtos de Consumo, Porto Alegre, RS, Brasil) (Figura 1.B), e antes de serem esterilizados, para posterior contaminação, tiveram a sua coloração coronária aferida.

3.3 Aferição da coloração coronária

As mensurações de cor foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro digital intraoral VITA Easyshade, com metodologia semelhante à utilizada por Akcay et al. (2014). A fim de minimizar influências externas na determinação da cor os seguintes critérios foram estabelecidos: todos os elementos foram fotografados e tiveram sua coloração aferida em um mesmo ambiente, sob a mesma superfície, em um fundo branco, com a mesma iluminação, foram mantidos em estufa a 37°C e passaram por aferição de cor em triplicata, com o uso do mesmo sensor digital de cor VITA Easyshade (Figura 1.C). O sensor foi posicionado na área previamente demarcada, de tamanho proporcional ao sensor, para que a avaliação pós inserção do medicamento possa ser realizada no mesmo local, tendo sido recalibrado após a aferição em triplicata de cinco amostras. Os elementos dentários tiveram suas cores avaliadas antes da colocação do antibiótico (Figura 1.D-E) e após três semanas da colocação das medicações antibióticas (Figura 1.F-G).

O sistema de cor CIELAB foi o parâmetro utilizado para verificar a coloração das amostras, em que L^* corresponde ao valor de luminosidade, tendo a máxima de cem que representa o branco e o mínimo de zero, que representa o preto, a^* é o valor da cor no eixo vermelho-verde, em que o valor positivo indica uma tendência ao vermelho e negativo ao verde, e b^* é o valor da cor no eixo amarelo-azul, que se for positivo tende ao amarelo e negativo ao azul. A mudança de coloração (ΔE^*) é calculada a partir da média dos valores aferidos em triplicata de L^* , a^* , b^* de cada amostra nos dois períodos de tempo e esses valores foram submetidas à análise estatística.

Figura 1 - Procedimentos pré contaminação e processo de aferição



Legenda: (A) Marcações para avaliação de coloração; (B) selamento externo do dente com esmalte; (C) Sensor posicionado para aferição da coloração; (D) Aferição de coloração antes da pasta antibiótica; (E) Amostra na foto inicial; (F) Aferição da coloração após 21 dias; (G) Amostra na foto final.

Fonte: O autor, 2017.

3.4 Contaminação da amostra

Antes de serem contaminados, os elementos dentários foram inseridos em microtubos tipo *ependorf* (Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil) contendo solução salina e passaram pelo processo de esterilização em autoclave (Autoclave Vertical AV Plus, Phoenix Lufenco, Araraquara, SP, Brasil) a 121°C por 15 minutos. Um elemento dentário foi colocado em meio BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco, Detroit, MI, EUA) e na estufa a 37°C por 48h para atestar a eficácia da esterilização (Figura 2.A). Após esse processo, cada elemento foi colocado sob pressão em uma rolha de borracha estéril com um orifício no meio, na porção cervical da raiz para que os elementos pudessem ficar verticalizados e acima da estante para microtubo em que foram mantidos por 30 dias (Figura 2.B). Todos os procedimentos realizados com as amostras após esterilização foram feitos dentro de um fluxo laminar (Grupo Veco, Campinas, SP, Brasil).

Uma cultura de *E. faecalis* obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC 29212) foi utilizada para contaminar os canais radiculares. A suspensão foi preparada adicionando 1ml de cultura pura de *E. faecalis* cultivadas em BHI por 24h em estufa a 37°C (Solab, Piracicaba, São Paulo, Brasil). A suspensão bacteriana foi ajustada para o grau 0,5 da escala de McFarland que corresponde a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC) por ml utilizando-se um espectrofotômetro TP-Reeader (ThermoPlate, Eschede, Holanda). Cada canal foi preenchido com a suspensão de *E. faecalis* usando micropipetas até o seu preenchimento (Figura 2.C) e uma lima K 10 foi usada como carreadora de bactéria em toda extensão do elemento até o forame.

As amostras foram então incubadas a 37°C por trinta dias (Figura 2.D), com o meio de cultura BHI sendo renovado intracanal a cada 48h para manutenção do biofilme (Figura 2.E). Após esse período foram aplicadas duas camadas de cianoacrilato e uma camada de esmalte incolor com o objetivo de obstruir a saída foraminal (Figura 2.F). A parte externa do elemento dentário foi descontaminada com gaze estéril e NaOCl 2,5% (LANA et al., 2009).

3.5 Selamento dos túbulos dentinários coronários

Após o processo de contaminação e antes do início da descontaminação, as paredes da câmara pulpar até a junção amelocementária receberam por meio de um microaplicador descartável estéril (Cavibrush extrafino, FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil) duas camadas do sistema adesivo autocondicionante de passo único OptiBond All-in-one (Kerr, Hawe, CA, EUA), cada uma sendo aplicada por vinte segundos. Transcorridos quinze segundos de jato de ar indireto, estes foram fotopolimerizados por dez segundos (Radii-cal, SDI, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 3).

Figura 2 – Procedimentos necessários para a contaminação



Legenda: (A) Meio translúcido comprovando a esterilização das amostras; (B) Posicionamento das amostras na rolha de borracha, posicionadas acima da estante para microtubos e dentro da caixa metálica; (C) Contaminação utilizando micropipetas; (D) Estufa utilizada para o crescimento bacteriano; (E) Amostra inserida na rolha de borracha após ter meio renovado com micropipeta; (F) Ápices selados por esmalte.

Fonte: O autor, 2017

Figura 3 – Selamento dos túbulos dentinários



Legenda: (A) Instruções de uso do sistema adesivo – O jato de ar teve duração de 15 segundos (FU et al., 2017);
 (B) Sistema adesivo, microaplicador estéril e fotopolimerizador; (C) Modo de aplicar do fabricante;
 (D) Aplicação em dentina; (E) Fotopolimerização

Fonte: O autor, 2017

3.6 Desinfecção da amostra

O protocolo utilizado para desinfecção das amostras foi baseado no guia para revascularização dentária da *American Association of Endodontics* (AAE) implementado em 2015.

As amostras foram irrigadas com 20ml de NaOCl a 1,5% por cinco minutos, sendo 4ml por minuto, seguido de 20ml de EDTA a 17% por mais cinco minutos, sendo 4ml por minuto. Finda esta etapa, foi realizada a secagem dos canais radiculares com ponta de papel absorvente estéreis tipo *cell pack* (MK Life, Porto Alegre, RS, Brasil).

Após esse procedimento, as amostras foram divididas aleatoriamente em seis grupos experimentais de acordo com a substância empregada e a consistência da mesma e, mais dois grupos controle (negativo e positivo).

- Grupo 3MIX-sol (n=10): Medicação triantibiótica 3MIX em consistência sólida (Ciprofloxacina, metronidazol e minociclina, veículo: propilenoglicol e macrogol); (Figura 4)
- Grupo 3MIX-past (n=10): Medicação triantibiótica 3MIX em consistência pastosa (Ciprofloxacina, metronidazol e minociclina, veículo: propilenoglicol);
- Grupo 2MIX-sol (n=10): Medicação biantibiótica em consistência sólida (Ciprofloxacina e metronidazol, veículo: propilenoglicol e macrogol);
- Grupo 2MIX-past (n=10): Medicação biantibiótica em consistência pastosa (Ciprofloxacina e metronidazol, veículo: propilenoglicol);
- Grupo 3MIX-mod-sol (n=10): Medicação triantibiótica modificada em consistência sólida (Ciprofloxacina, metronidazol e clindamicina, veículo: propilenoglicol e macrogol);
- Grupo 3MIX-mod-past (n=10): Medicação triantibiótica modificada em consistência pastosa (Ciprofloxacina, metronidazol e clindamicina, veículo: propilenoglicol);
- Grupo CN (n=05): Água destilada estéril (controle negativo);
- Grupo CP (n=05): Dentes esterilizados (controle positivo).

O grupo controle negativo foi contaminado e recebeu todo o tratamento prévio realizado nos dentes que receberam a medicação antibiótica, mas ao invés da medicação, o canal radicular foi preenchido por água destilada estéril. Já o grupo controle positivo não foi

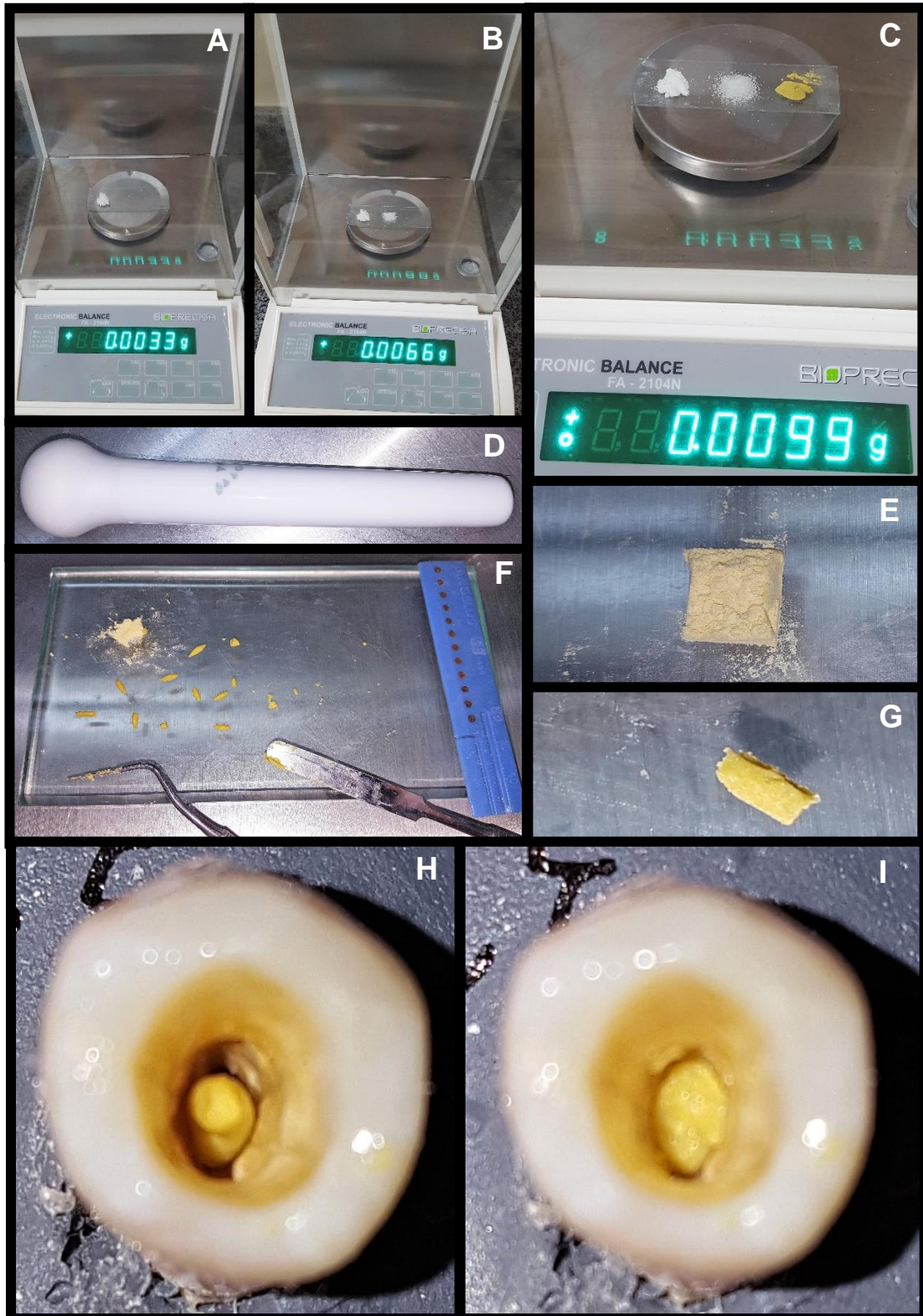
contaminado e recebeu somente meio BHI por trinta dias, sofrendo apenas descontaminação externa para atestar a eficácia da esterilização.

No caso das medicações triantibióticas foi utilizada uma mistura de 1:1:1 dos antibióticos em concentração de 0,3mg, em um total de 1mg/ml. Já no grupo das medicações biantibióticas a proporção foi de 1:1 com concentração de 0,5mg, em um total de 1mg /ml. A quantidade de pó foi determinada por uma balança analítica digital (FA-2104N Bioprecisa, Curitiba, PR, Brasil) e nos grupos em que a medicação antibiótica teve consistência sólida o pó foi previamente macerado com um pistilo por 3 minutos, com metodologia baseada em Hoshino (2007).

As medicações antibióticas que tiveram como veículo somente o propilenoglicol ficaram com consistência pastosa (Figura 5) e foram inseridas dentro do canal com uma seringa e agulha para irrigação de 27 G1'' 25x0,40 (Injex, Ourinhos, SP, Brasil) tendo o espaço do canal radicular preenchido até 3mm aquém da junção amelocementária (Figura 6). Já as que tiveram como veículo o propilenoglicol e macrogol, ficaram com consistência sólida, em forma retangular, medindo 5mm de comprimento aferidos com régua milimetrada (Intermedium, Angelus, Londrina, PR, Brasil), tendo sido inseridas com o auxílio de um calcador de Paiva número um (Golgran Indústria e Comércio de Instrumental Odontológico Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil) (Figura 7).

Em ambos os casos, o antibiótico permaneceu abaixo da junção amelocementária e a abertura coronária foi vedada com cimento provisório (Villevie, Joinville, SC, Brasil).

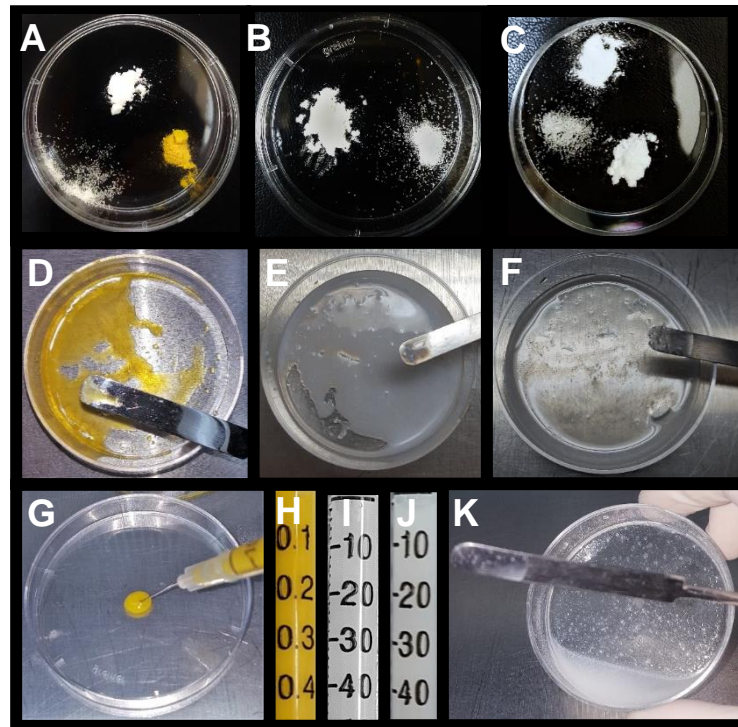
Figura 4 – Preparo da pasta antibiótica - Grupo 3MIX-sol



Legenda: (A) Pesagem ciprofloxacina; (B) Pesagem ciprofloxacina + metronidazol; (C) Pesagem pasta 3Mix para 10 elementos; (D) Pistilo; (E) Pó homogeneizado; (F) Consistência após mistura e calcador para inserção no canal; (G) Forma adequada do medicamento para inserção no canal; (H) Medicamento após inserção no canal; (I) Medicamento após ser calcado no interior do canal.

Fonte: O autor, 2017

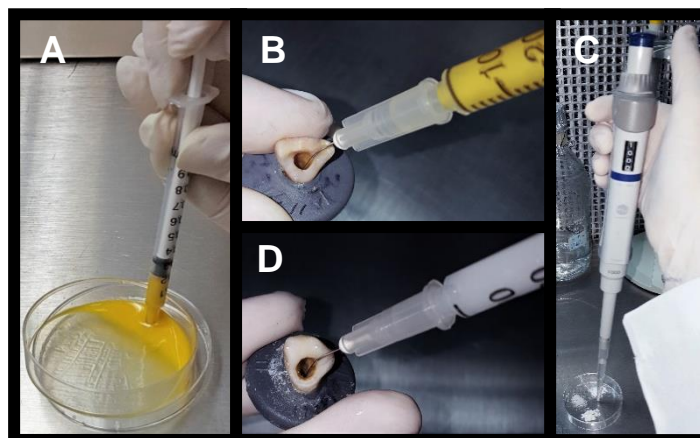
Figura 5 – Comparação entre os três grupos de consistência pastosa



Legenda: (A) Pó do grupo 3MIX-past; (B) Pó do grupo 2MIX-past; (C) Pó do grupo 3MIX-mod-past; (D) Grupo 3MIX-past após mistura, apresentando a consistência mais espessa dos 3 grupos; (E) Grupo 2MIX-past após mistura; (F) Grupo 3MIX-mod-past após mistura, apresentando a consistência mais líquida dos 3 grupos; (G) Consistência da pasta 3MIX ao deixar a agulha; (H) Coloração da pasta 3MIX na seringa; (I) Coloração da pasta 2MIX na seringa; (J) Coloração da pasta 3MIX modificada por clindamicina na seringa; (K) Consistência líquida e coloração não-opaca da pasta triantibiótica modificada por clindamicina.

Fonte: O autor, 2017

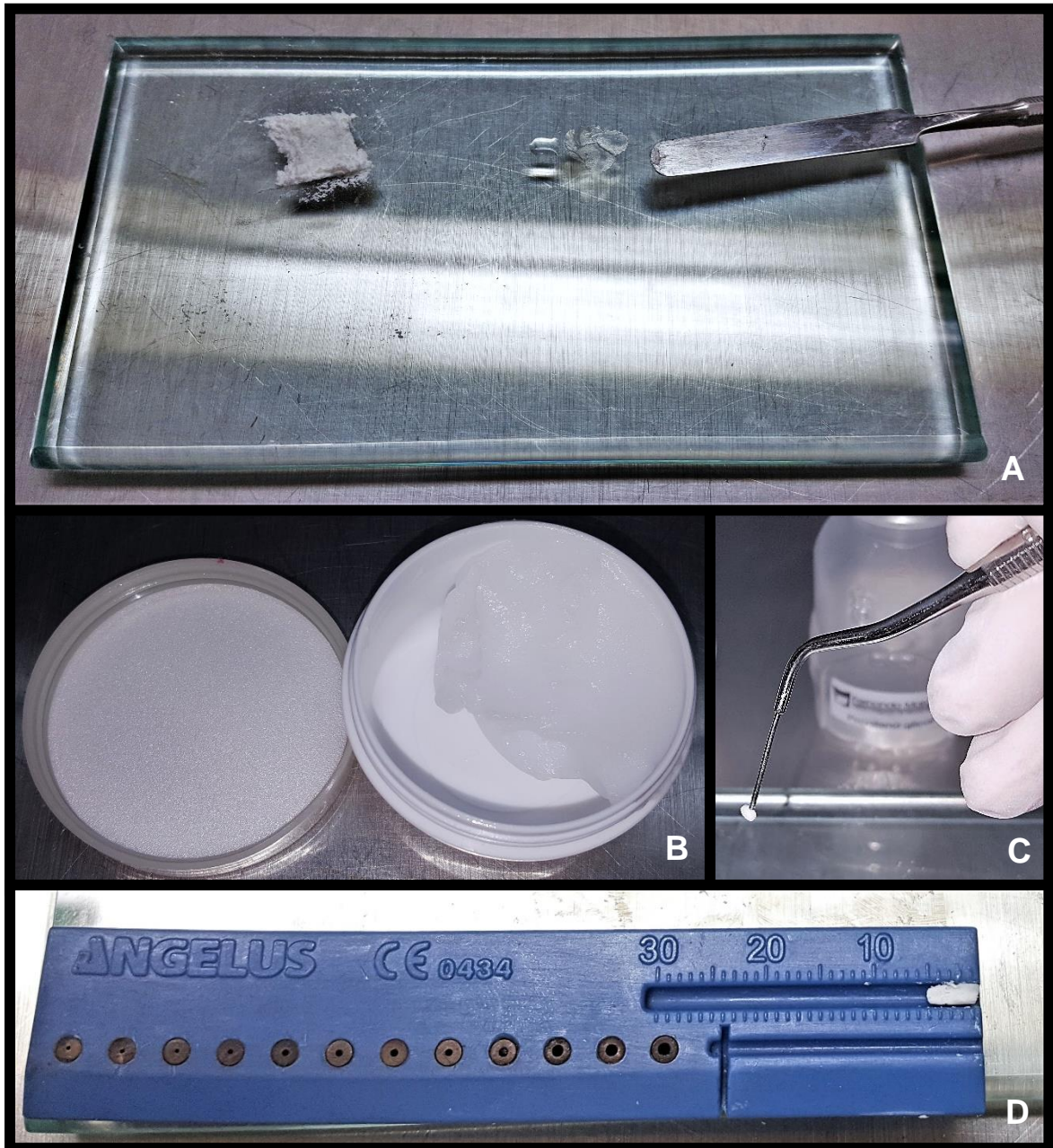
Figura 6 – Colocação das pastas antibióticas nos grupos 3MIX-past e 3MIX-mod-past



Legenda: (A) Colocação da pasta do grupo 3MIX-past na seringa; (B) Colocação da pasta na amostra do grupo 3MIX-past; (C) Pó dos componentes do grupo 3MIX-mod-past antes de serem homogeneizados e pipeta com o veículo propilenoglicol; (D) Aplicação da pasta antibiótica na amostra do grupo 3MIX-mod-past.

Fonte: O autor, 2017

Figura 7 – Modo de preparo dos grupos antibióticos sólidos



Legenda: (A) Pó dos componentes antibióticos homogeneizados e veículos propilenoglicol e macrogol; (B) Consistência do magrogol; (C) Consistência ideal da pasta sólida: Ser capaz de aderir a ponta do calcador; (D) Conformação da pasta sólida, medindo 5mm.

Fonte: O autor, 2017

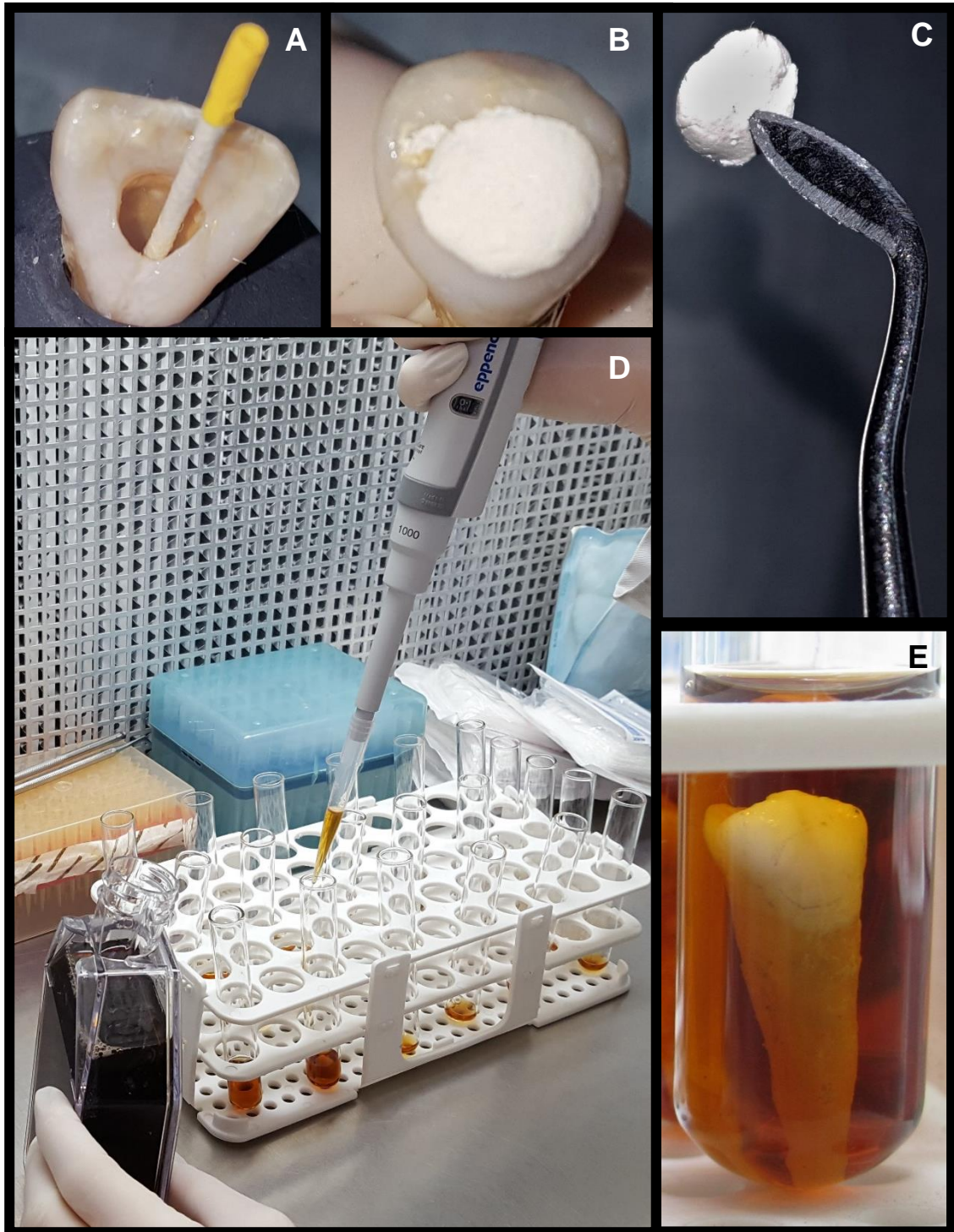
3.7 Avaliação da desinfecção

Os elementos foram submetidos a uma sequência de irrigação para remoção do antibiótico: 20ml de água destilada estéril por cinco minutos, sendo 4 ml por minuto, seguido de 20ml de EDTA a 17% por cinco minutos, sendo 4 ml por minuto, para novamente serem submetidos a irrigação abundante com 20ml de água destilada estéril por cinco minutos, em jato contínuo. Procedeu-se então a secagem dos canais radiculares com ponta de papel absorvente estéreis tipo *cell pack* (Figura 8.A). Após essa etapa, os elementos foram novamente selados com cimento provisório (Figura 8.B) e descontaminados externamente com NaOCl a 2,5%, sendo essa substância neutralizada com tiosulfato de sódio a 1% (Milfórmulas).

O vedamento da câmara pulpar foi então removido com Esculpidor Holleback 3S (SSWhite Duflex, Juíz de Fora, Minas Gerais, Brasil) (Figura 8.C) e os dentes foram submersos em tubos de ensaio estéreis contendo o meio Enterococcosel (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, EUA) livre de vancomicina (seletivo para *enterococcus*) (Figura 8.D-E) e tampados com algodão. Estes foram então colocados em estufa a 37°C por 48h. Depois de transcorrido esse tempo os meios foram plaqueados em alíquotas de 10 μ l em meio mitis salivarius (Difco) de forma concentrada e em diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁵ para que houvesse avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana, com as placas sendo incubadas em estufa a 37°C por 24h (Figura 9.A-C).

A quantificação do crescimento bacteriano nas placas foi realizada por meio da contagem de UFC no microscópio biológico (Opticam Microscopy Technology, São José dos Campos, SP, Brasil) após as placas terem permanecido 24h em estufa a 37°C (Figura 9.D).

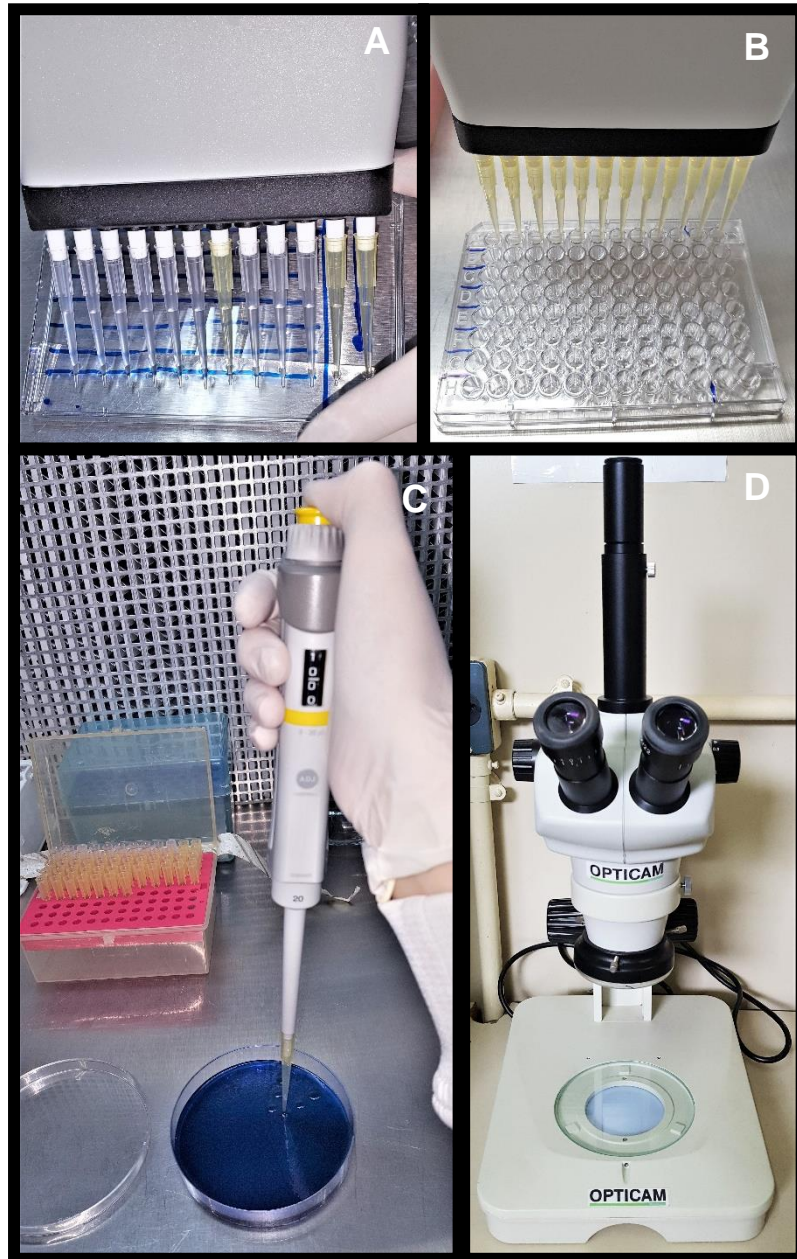
Figura 8 – Preparo para colocação da amostra no meio Enterococcosel



Legenda: (A) Secagem do canal radicular; (B) Vedamento da entrada da câmara pulpar realizado nas amostras; (C) Remoção da restauração provisória em bloco único; (D) Colocação do meio Enterococcosel em tubos de ensaio; (E) Amostra dentro do tubo de ensaio submersa no meio Enterococcosel translúcido por não haver contaminação.

Fonte: O autor, 2017

Figura 9 – Plaqueamento das amostras microbiológicas



Legenda: (A) Preenchimento das pontas da pipeta; (B) Placa de microtitulação sendo pipetadas; (C) Placa sendo pipetada; (D) Microscópio utilizado para a leitura das UFC.

Fonte: O autor, 2017

3.8 Análise estatística

3.8.1 Aferição da coloração

Os dados obtidos foram comparados por meio da diferença de cor em diferentes intervalos de tempo pela ΔE^* da Commission Internationale de l'Eclairage, sendo calculadas a partir da seguinte equação:

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

Em que:

$$\Delta L^* = L^*_{\text{final}} - L^*_{\text{inicial}}$$

$$\Delta a^* = a^*_{\text{final}} - a^*_{\text{inicial}}$$

$$\Delta b^* = b^*_{\text{final}} - b^*_{\text{inicial}}$$

3.8.2 Ação antibacteriana

Como a análise preliminar dos dados revelou uma distribuição normal (teste de normalidade de Shapiro-Wilk), a análise estatística foi realizada usando métodos paramétricos. Os dados foram então analisados estatisticamente usando o teste de ANOVA seguido do teste de Tukey para comparar as diferentes medicações antibióticas quanto a ação antibacteriana e a modificação de coloração. O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da relação entre as medicações antibióticas e alteração da coloração coronária por meio do aparelho VITA Easyshade.

Antes da aplicação da medicação intracanal as amostras de cada grupo tiveram sua coloração coronária aferida por um aparelho digital seletor de cor em um ponto específico devidamente demarcado (Figura 1.A). Essa aferição foi refeita após três semanas no mesmo ponto da coroa.

4.1.1 Grupo Controle

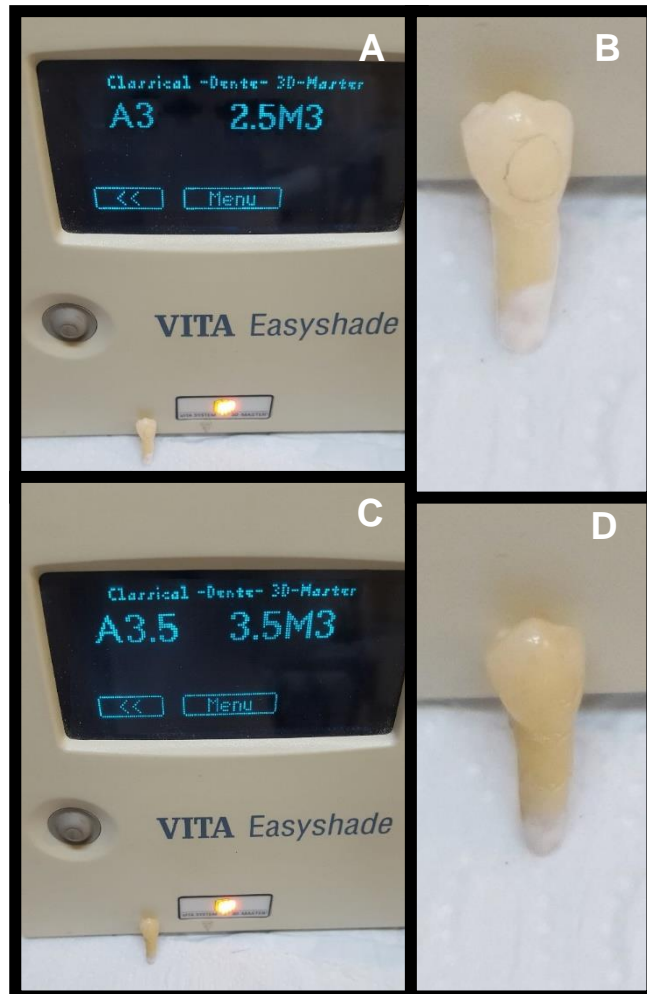
O grupo controle positivo (CP) foi utilizado como grupo controle da alteração de coloração, já que esse grupo não recebeu nenhuma medicação intracanal e ficou imerso no mesmo meio de cultura que as amostras dos grupos experimentais.

O grupo não apresentou nenhuma alteração de cor no intervalo de tempo avaliado ($p < 0,05$) (Tabela 1).

4.1.2 3MIX-sol e 3MIX-past

Os grupos apresentam em sua composição a minociclina. As amostras desses grupos apresentaram mudança de coloração entre a primeira aferição e a aferição após contato antibiótico em comparação com o grupo controle e demais grupos antibióticos ($p < 0,05$) (Figura 10). O grupo 3MIX-past apresentou uma alteração de cor mais acentuada que o grupo 3MIX-sol ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Figura 10 – Avaliação de cor da amostra do grupo 3MIX-past inicialmente e após três semanas



Legenda: (A) Aferição de cor antes da colocação de antibiótico; (B) Elemento dental no momento da aferição; (C) Aferição da cor após 3 semanas; (D) Elemento dentário no momento da aferição após 3 semanas.

Fonte: O autor, 2017

4.1.3 2MIX-sol, 2MIX-past, 3MIX-mod-sol, 3MIX-mod-past

As amostras desses grupos não apresentaram modificação de cor comparando os valores aferidos antes de receber a medicação intracanal e após três semanas da dentina radicular ter sido exposta ao medicamento ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 – ΔE^* de cada grupo avaliado

Grupos avaliados	ΔE^* (média + desvio padrão)
3MIX-sol	4,06±1.07 ^B
3MIX-past	7,15±1.93 ^A
2MIX-sol	1,94±0.81 ^C
2MIX-past	1,64±0.85 ^C
3MIX-mod-sol	1,76±0.79 ^C
3MIX-mod-past	1,90±0.56 ^C
CP - Grupo controle	1,58±0.80 ^C

Diferentes sobrescritos denotam significância estatística ($P < 0,05$).

4.2 Avaliação antimicrobiana das medicações antibióticas sobre biofilme de *E. faecalis*

Após transcorrido o tempo de incubação das diferentes medicações em contato com o biofilme de *E. faecalis* dentro dos elementos dentários, da remoção dessas substâncias de dentro do canal radicular e da colocação destes em meio seletivo Enterococcosel, procedeu-se ao plaqueamento de alíquotas em meio *mitis salivarius*, sendo realizada então a contagem de UFC 48 horas depois.

4.2.1 Grupos Controle

Após 24h o grupo controle negativo (CN) sofreu mudança de coloração, com o meio Enterococcosel passando de marrom-translúcido para marrom escuro opaco (Figura 11). Após 48h este conteúdo foi plaqueado em placas contendo o meio *mitis salivarius* em diluições entre 10^{-1} a 10^{-10} (Figura 12.A). A contagem das UFCs em microscópio biológico foi realizada após as placas de petri ficarem por 24h em estufa a 37°C e em comparação com os outros grupos esse foi o que apresentou maior contaminação ($p < 0,05$) (Tabela 2).

O grupo controle positivo (CP), após 24h submerso em meio Enterococcosel manteve a estabilidade de cor do meio, sem turvamento (Figura 11). Após 48h, ao realizar o plaqueamento do meio no meio *mitis salivarius*, não foi observado nenhum crescimento

bacteriano após 24h em estufa (Figura 12.B). Isso comprovou a ausência de contaminação cruzada durante o experimento e a eficiência da descontaminação externa das amostras. O CP foi semelhante aos grupos em que não houve contaminação ($p>0,05$) e diferente estatisticamente do CN e do grupo 3MIX-mod-past ($p<0,05$).

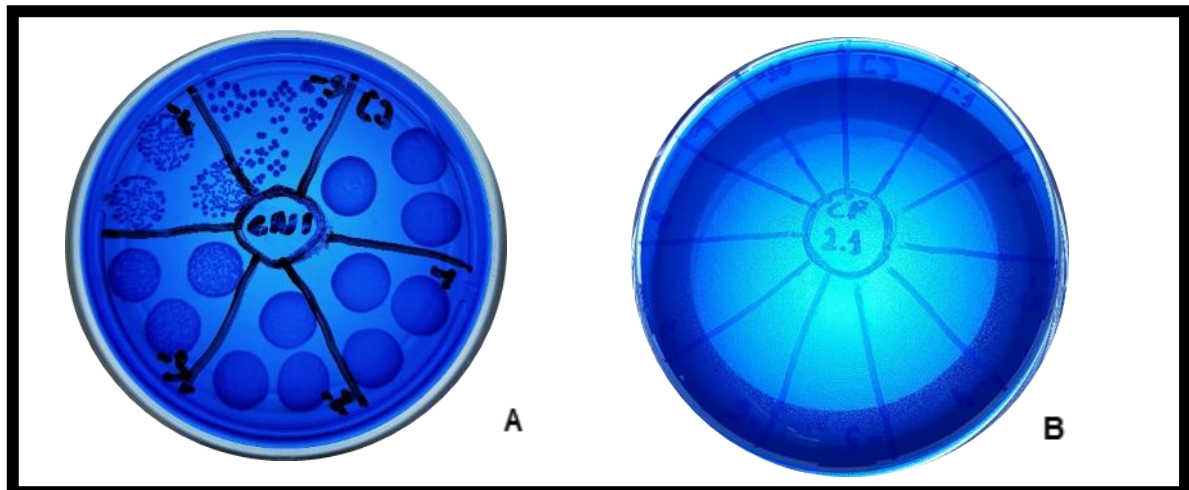
Figura 11 – Avaliação de contaminação dos grupos controle no meio Enterococcosel



Legenda: Grupo CP - controle positivo e meio Enterococcosel sem contaminação e Grupo CN - controle negativo, contaminado, com mudança de coloração.

Fonte: O autor, 2017

Figura 12 – Placas com meio *mitis salivarius* para contagem de UFCs dos grupos CN e CP.



Legenda: (A) Crescimento bacteriano do grupo CN após 24h em estufa a 37°C; (B) Ausência de crescimento bacteriano no grupo CP após 24h em estufa a 37°C.

Fonte: O autor, 2017

4.2.2 3MIX-sol, 3MIX-past, 2MIX-sol, 2MIX-past, 3MIX-mod-sol

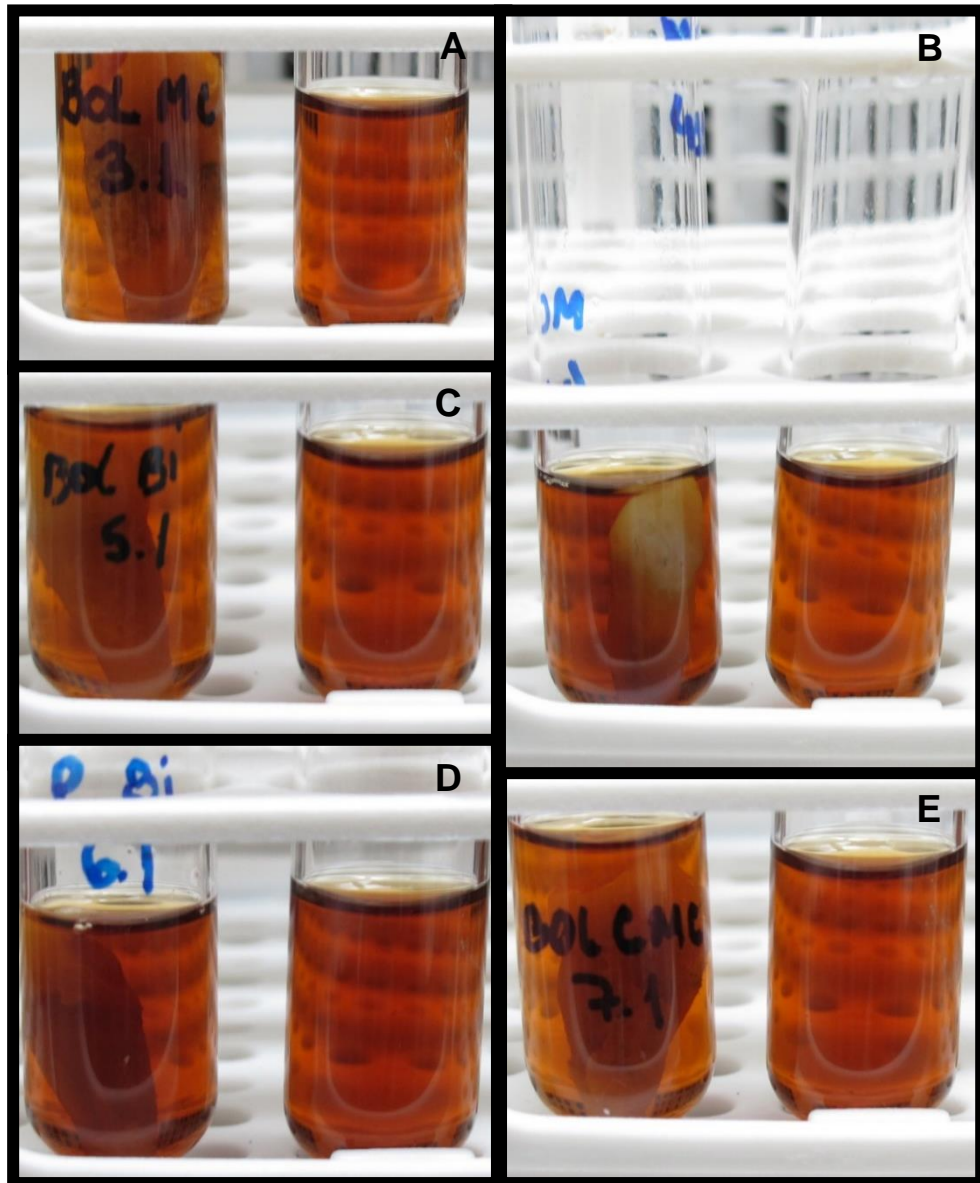
Após 24h e 48h não houve alteração na cor do meio Enterococosele em que as amostras estavam contidas, indicando a ausência de contaminação nesses grupos experimentais (Figuras 13 e 14). Após 48h o conteúdo do meio foi plaqueado e as placas foram incubadas por 24h em estufa a 37°C para confirmar a ausência de crescimento bacteriano. Seu resultado foi semelhante ao CP ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Unidades formadoras de colônia na diluição 10^{-4}

Grupos avaliados	UFC (média + desvio padrão)
3MIX-sol	0±0 ^A
3MIX-past	0±0 ^A
2MIX-sol	0±0 ^A
2MIX-past	0±0 ^A
3MIX-mod-sol	0±0 ^A
3MIX-mod-past	11,6±19 ^B
CP	0±0 ^A
CN	123,6±6,1 ^C

Diferentes sobrescritos denotam significância estatística ($P < 0,05$).

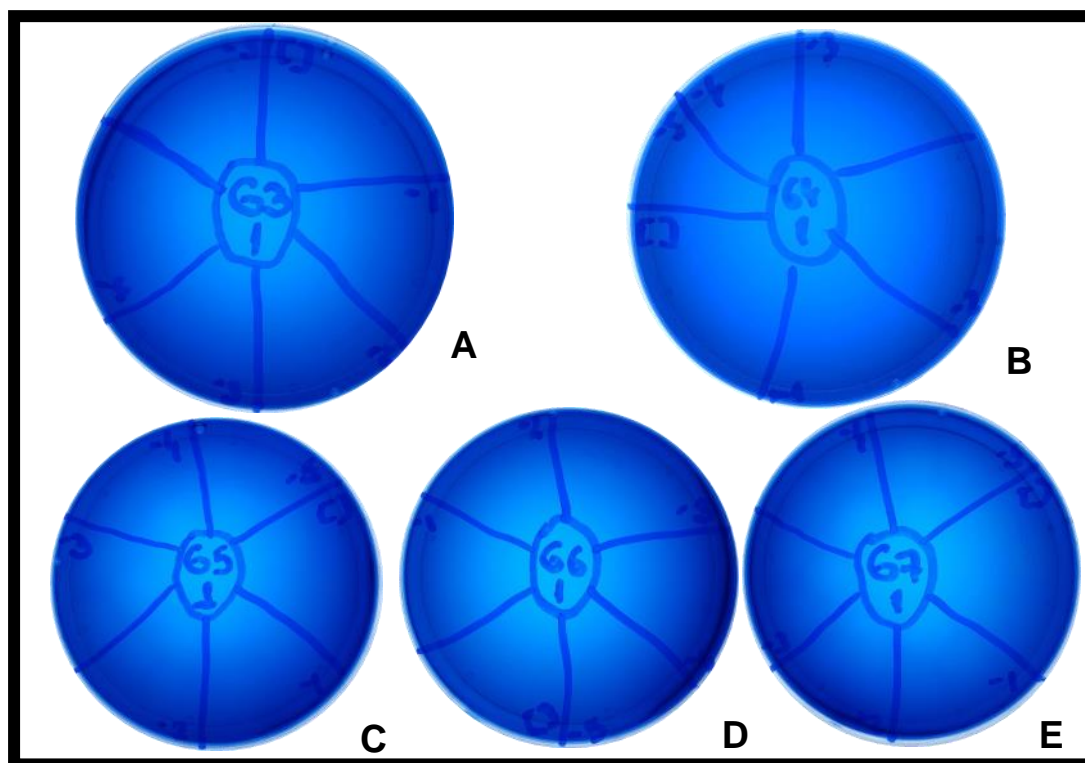
Figura 13 – Amostras 1 dos grupos 3MIX-sol, 3MIX-past, 2MIX-sol, 2MIX-past, 3MIX-mod-sol após 48h.



Legenda: Comparação da amostra 1 dos grupos antibióticos (exceto 3MIX-mod-past) com o meio enterococcosel, atestando ausência de contaminação. (A) 3MIX-sol ; (B) 3MIX-past ; (C) 2MIX-sol; (D) 2MIX-past e (E) 3MIX-mod-sol .

Fonte: O autor, 2017

Figura 14 – Placas com meio *mitis salivarius* dos grupos 3MIX-sol, 3MIX-past, 2MIX-sol, 2MIX-past, 3MIX-mod-sol após 24 horas



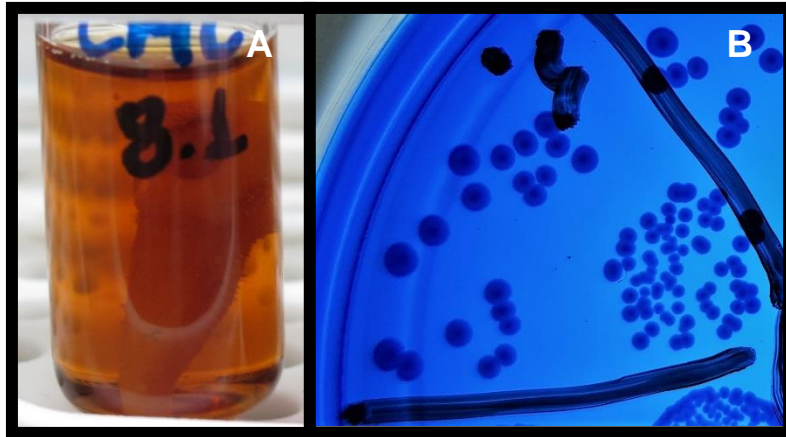
Legenda: (A) 3MIX-sol; (B) 3MIX-past; (C) 2MIX-sol; (D) 2MIX-past; (E) 3MIX-mod-sol após 24h em estufa a 37° C comprovando ausência de crescimento bacteriano.

Fonte: O autor, 2017

4.2.3 3MIX-mod-past

Após 24h e 48h houve alteração na cor do meio Enterococosele em que as amostras estavam contidas, passando de marrom-translúcido para marrom escuro opaco, indicando a presença de contaminação. Após 48h o conteúdo do meio foi plaqueado com uma alíquota diretamente do meio e em diluições entre 10^{-1} a 10^{-5} , no meio *mitis salivarius* e as placas foram incubadas por 24h em estufa a 37°C (Figura 15 e 16). Transcorrido esse período, realizou-se a contagem de UFCs em microscópio biológico, quantificando o crescimento bacteriano (Tabela 2). A partir desses dados comprovou-se estatisticamente a presença de contaminação ($p < 0,05$) em relação ao CP e demais grupos antibióticos e que a medicação antibiótica contendo ciprofloxacina, metronidazol e clindamicina em consistência pastosa promoveu uma redução de carga bacteriana em relação ao CN ($p < 0,05$).

Figura 15 – Grupo 3MIX-mod-past



Legenda: (A) Imagem inicial do grupo 3MIX-mod-past; (B) Crescimento bacteriano em placa contendo meio mitis salivarius na diluição 10^{-4}

Fonte: O autor, 2017

Figura 16 – Grupos antibióticos ao final do experimento



Legenda: Todas as amostras 1 de cada grupo, evidenciando a mudança de coloração do grupo 3MIX-mod-past (seta).

Fonte: O autor, 2017

5 DISCUSSÃO

O uso de combinações de medicações antibióticas como utilizadas atualmente vem do começo da década de noventa (HOSHINO et al., 1996; SATO et al., 1993), tendo como base três pontos fundamentais no que diz respeito ao procedimento de revascularização: descontaminação tecidual utilizando somente substâncias quimicamente ativas, criação de um coágulo sanguíneo e selamento coronário do elemento para que não haja recontaminação (HOSHINO et al., 1996). Entretanto, somente nessa última década, estudos foram desenvolvidos referentes a concentração adequada que as substâncias descontaminantes devem apresentar para propiciar um ambiente ideal para a proliferação celular (ALTHUMAIRY; TEIXEIRA; DIOGENES, 2014; DIOGENES et al., 2014; MARTIN et al. 2014). Os resultados desses estudos mostraram que as concentrações clinicamente preconizadas do NaOCl, das medicações triantibióticas e biantibióticas estavam em níveis citotóxicos para a proliferação das células-tronco da papila apical (ALTHUMAIRY; TEIXEIRA; DIOGENES, 2014; MARTIN et al., 2014; RUPAREL et al., 2012; TREVINO et al., 2011) e das células-tronco da polpa dentária (KIM et al., 2015).

Essa concentração inadequada está principalmente relacionada ao hipoclorito de sódio e as medicações antibióticas, pois segundo Conde et al. (2017) a concentração utilizada em procedimentos de revascularização não segue um padrão e varia entre 0.5% e 6%, quando o valor recomendado pela AAE é de 1,5% (AAE, 2015). No entanto, é sugerido que essa concentração pode não proporcionar níveis adequados de descontaminação (RETAMOZO et al., 2010). Nosso estudo corroborou esse resultado por meio do grupo de Controle negativo (CN), em que somente a irrigação do canal com hipoclorito de sódio a 1,5% fez a descontaminação não ser bem-sucedida. Mesmo utilizando altas concentrações, como por exemplo o NaOCl a 5,25%, pode não ser possível proporcionar uma completa descontaminação do canal radicular (LANA et al., 2009), sendo necessária a utilização da medicação antibiótica na descontaminação do elemento dentário para o processo de revascularização (WINDLEY et al., 2005).

O irrigante final indicado para protocolo de revascularização é o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), pois seu efeito quelante permite a liberação de fatores de crescimento retidos na dentina durante a dentinogênese (GALLER et al., 2015; TOMSON et al., 2007). Não só a sua composição não é citotóxica para as células-tronco (TREVINO et al., 2011), como também promove a adesão, proliferação e diferenciação desse tipo de célula (GALLER

et al. 2011, GALLER et al. 2016; PANG et al. 2014). Além disso, por ser um ácido fraco, seu papel também é importante na primeira sessão do protocolo de revascularização, pois ele reage com a porção inorgânica da dentina, melhorando a penetração da medicação antibiótica e do hipoclorito de sódio (ZEHNDER, 2006).

Já a concentração inadequada da medicação antibiótica está relacionada a consistência pastosa espessa almejada para sua inserção no canal (KIM et al., 2010; LOVELACE et al., 2011; NOSRAT; SEIFI; ASGARY, 2011), elevando a proporção utilizada, que poderia chegar a 1g/ml (ALTHUMAIRY; TEIXEIRA; DIOGENES, 2014; RUPAREL et al., 2012). O aumento da concentração em conjunto com o tempo de uso são os fatores que elevam a citotoxicidade das medicações antibióticas (CHUENSOMBAT et al., 2013). Em vista disso, o tempo máximo de uso foi estabelecido em quatro semanas, com proporção máxima de 1mg/ml (ALTHUMAIRY; TEIXEIRA; DIOGENES, 2014; KIM et al. 2015; MARTIN et al. 2014). Em nosso estudo essa concentração máxima foi utilizada com duração de duas semanas, o que está de acordo com o protocolo estabelecido pela AAE em 2015 (AAE, 2015). Todavia essa nova concentração de acordo com nosso estudo produz uma medicação intracanal de consistência líquido-pastosa, no caso das medicações 3MIX e biantibiótica e de forma líquida no caso da medicação triantibiótica modificada substituindo a minociclina pela clindamicina. Essa diferença de consistência pode ser motivada pela clindamicina ser um pó com granulação de partículas bem menor comparado a substância substituída, podendo esse ser um fator que afeta sua permanência e eficácia dentro do canal radicular (ALGARNI; YASSEN; GREGORY, 2015), o que explicaria o seu baixo desempenho em nosso estudo, sendo o único grupo antibiótico a não apresentar descontaminação do elemento dentário.

Para que a medicação antibiótica não fique tão fluida, o meio utilizado como carreador é um fator que vem sendo analisado para auxiliar na permanência do medicamento no canal. O propilenoglicol além de servir para aumentar a espessura da medicação antibiótica em relação a solução salina ou água destilada, também promove uma melhor penetrabilidade do medicamento tanto em relação a área quanto em relação a profundidade na dentina comparando com a água destilada (CRUZ et al., 2002). Além disso em estudo realizado em ratos por Gomes-Filho et al. (2012), propilenoglicol e macrogol se mostraram biocompatíveis e não interferiram na reação promovida pelos medicamentos. O macrogol foi utilizado em nosso estudo por apresentar uma consistência mais pastosa, sendo o de consistência mais sólida dos carreadores supracitados, resultando na consistência sólida do medicamento. Isso facilita sua inserção sem tocar nas paredes coronárias e faz com que permaneça visivelmente dentro do canal até a segunda sessão. Esse fato pode ter levado ao sucesso do grupo da

medicação triantibiótica modificada por clindamicina nessa consistência, já que McTigue, Subramanian, Kumar (2013) obtiveram sucesso clínico utilizando-a em consistência pastosa, com composição citotóxica de 650 mg de antibiótico, com o meio sendo propilenoglicol.

Além da consistência, o maior controle do local em que o medicamento deve ser posicionado, por ser levado ao canal radicular com um calcador, é um fator que visa diminuir a descoloração coronária causada pela minociclina (REYNOLDS; JOHNSON; COHENCA, 2009). Somado a isso, podemos utilizar um sistema adesivo, que devido a sua penetrabilidade nos túbulos dentinários coronários, diminui a difusão do antibiótico para a coroa (KIM et al., 2010). Esses dois fatores resultaram na diferença de coloração entre os dois grupos da medicação antibiótica 3MIX. O grupo 3MIX-sol em que o meio foi propilenoglicol com macrogol resultou em uma menor mudança de coloração comparando com o grupo 3MIX-past e mesmo nesse grupo, em que somente o propilenoglicol foi utilizado, a pigmentação coronária foi menos agressiva, não havendo pigmentação esverdeada, mas sim um escurecimento da coroa, uma perda de valor, o que está de acordo com Kim et al. (2010).

Para que a colocação de sistema adesivo seja feita corretamente, é necessário que sua aplicação seja realizada de maneira fácil para endodontistas que não tem prática com o protocolo de condicionamento da dentina, pois segundo Giachetti et al. (2011) apesar da força de adesão ser maior em sistemas adesivos de mais passos quando aplicados por pessoas experientes com o procedimento, essa força de adesão diminui quando uma pessoa sem prática efetua o mesmo procedimento. Já o adesivo de passo único OptiBond All-In-One é mais fácil de ser bem aplicado, levando pessoas com ou sem prática a obterem a mesma força de adesão proporcionada pelo sistema adesivo. O OptiBond All-In-One foi selecionado por ter apresentado a maior força de união entre sistemas adesivos de passo único (FU et al., 2017), que possui a vantagem de ser autocondicionante, não sendo necessário a realização de condicionamento ácido da dentina previamente, pois os componentes ácidos incluídos em sua fórmula atuam da mesma forma que ocorre quando se usa um sistema adesivo de condicionamento ácido prévio separado (DIENG-SARR et al., 2011).

Visando evitar comprometimentos estéticos, outras combinações de medicação triantibiótica vem sendo estudadas como a medicação biantibiótica e medicações triantibióticas substituindo a minociclina por outros componentes da família das tetraciclina, cefaclor, amoxicilina e clindamicina. Embora não apresentem alterações tão severas quanto no uso da minociclina, os outros derivados da tetraciclina também causam manchamento (AKCAY et al., 2014; PORTER et al., 2016). Casos clínicos também já estabeleceram pigmentação do dente com o uso do cefaclor (DABBAGH et al., 2012) e da amoxicilina

(KAHLER et al., 2014), o que foi corroborado por estudos *in vitro*, em que as combinações com clindamicina e da medicação biantibiótica não apresentaram mudança de coloração (AKCAY et al., 2014; KAHLER; ROSSI-FEDELE, 2016; THOMSON et al., 2012), apesar de que Dettwiler et al. (2016) encontraram mudança de coloração em sua avaliação de 12 meses na medicação biantibiótica, utilizando uma versão pré-fabricada em capsula com 100g de antibiótico, em um bloco de esmalte e dentina bovinos. Essa diferença de tempo de avaliação, produto e metodologia pode ser a causa da diferença de resultado, contudo a medicação contendo clindamicina não sofreu alteração de cor nesse mesmo estudo. O resultado positivo das medicações biantibiótica e medicação triantibiótica modificada por clindamicina foi corroborado pelo nosso estudo, que teve o mesmo tempo máximo de avaliação de Akcay et al. (2014) e também não encontrou mudança de coloração nas duas combinações, realizando fotografias e utilizando um espectrofotômetro antes e depois da aplicação das substâncias antibióticas. Contudo clinicamente outros fatores podem interferir na mudança de coloração coronária como a deposição de sangue em túbulos dentinários (MCTIGUE; SUBRAMANIAN; KUMAR, 2013) e colocação de MTA acima da junção amelocementária, em direção a coroa, pois apesar do escurecimento ser mais prevalente no MTA cinza, o MTA branco também pode causar alteração de cor no elemento dentário (MOŻYŃSKA et al., 2017).

Apesar de não ser um antibiótico de amplo espectro como o cefaclor e a amoxicilina, a clindamicina já foi utilizada com sucesso em protocolos de revascularização (MCTIGUE; SUBRAMANIAN; KUMAR, 2013). Se mostrou eficaz contra uma variedade de patógenos encontrados em infecções endodônticas (SKUCAITE et al., 2010; GOMES et al., 2011), é uma das substâncias recomendadas pela AAE para substituição da minociclina (AAE, 2015) e apresentou resultado semelhante ao da medicação biantibiótica quando ambas foram estudadas na consistência de gel e contra *E.faecalis* (ALGARNI; YASSEN; GREGORY, 2015), resultado semelhante ao encontrado quando as substâncias estavam em forma sólida dentro do canal radicular em nosso estudo.

Já a medicação biantibiótica obteve também um resultado semelhante ao da medicação triantibiótica, o que é corroborado pelo estudo de Sabrah, Yassen, Gregory (2013) que também utilizaram *E.faecalis*, mas não por Devaraj, Jagannathan, Neelakantan (2016), que utilizaram como metodologia a microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) testando a atividade antimicrobiana de medicamentos intracanal na luz do canal e dentro de túbulos dentinários em duas profundidades contra *E. faecalis*. O biofilme da luz do canal foi completamente rompido quando a medicação 3MIX foi utilizada, o que não foi alcançado

com o uso da medicação biantibiótica e a porcentagem de células mortas dentro dos túbulos dentinários em duas profundidades também foi maior quando a medicação 3MIX foi utilizada em comparação com a medicação biantibiótica, entretanto o meio utilizado por eles foi a água destilada, tornando as combinações líquidas, o que poderia gerar diferenças nos resultados apresentados. Nossa metodologia foi escolhida por não depender da ação de corantes e conseguir demonstrar a eficácia das novas concentrações antibióticas propostas utilizando uma contaminação dentro dos túbulos dentinários, assemelhando-se mais as condições clínicas (LANA et al., 2009).

De acordo com nossos resultados, devem ser utilizados veículos que tenham efeito espessante na consistência do antibiótico, principalmente quando a clindamicina for utilizada, por seu pó ter uma granulação pequena. Além disso, mais estudos antimicrobianos em dentina devem ser realizados para atestar a eficácia bactericida da clindamicina, e se sua ação antibacteriana nas concentrações não-tóxicas é veículo-dependente, antes de ela ser recomendada como uma substituta da minociclina na medicação triantibiótica.

CONCLUSÃO

A partir dos métodos empregados para análise e dos resultados obtidos, parece-nos lícito concluir que:

1. As combinações de ciprofloxacina, metronidazol e minociclina, assim como as combinações de ciprofloxacina e metronidazol associadas ao protocolo de irrigação se mostraram eficientes contra o biofilme *E. faecalis*.

2. Todas as medicações antibióticas em consistência sólida realizaram descontaminação dos canais radiculares. Em consistência pastosa, a medicação triantibiótica modificada com clindamicina permitiu o registro de presença bacteriana no meio Enterococcosel, enquanto as medicações biantibiótica e triantibiótica composta por minociclina obtiveram sucesso em eliminar a infecção.

3. A medicação 3MIX em consistência sólida, com meio macrogol e propilenoglicol, promoveu uma menor alteração de cor do que a medicação 3MIX em consistência pastosa. Já as medicações biantibiótica e triantibiótica modificada por clindamicina não apresentaram alteração de cor no elemento dentário.

REFERÊNCIAS

- AKCAY, M. et al. Spectrophotometric analysis of crown discoloration induced by various antibiotic pastes used in revascularization. *J. Endod.*, Baltimore, v. 40, n. 6, p. 40-46, Jun. 2014.
- ALGARNI, A. A.; YASSEN, G. H.; GREGORY, R. L. Inhibitory effect of gels loaded with a low concentration of antibiotics against biofilm formation by *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis*. *J. Oral Sci.*, Tóquio, v. 57, n. 3, p. 213-218, Sep. 2015.
- ALTHUMAIRY, R. I.; TEIXEIRA, F. B.; DIOGENES, A. Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. *J. Endod.*, Baltimore, v. 40, n. 4, p. 521-525, Apr. 2014.
- AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS. Clinical considerations for a regenerative procedure. Apr. 2015. Disponível em:
<https://www.aae.org/uploadedfiles/publications_and_research/research/currentregenerativeendodonticconsiderations.pdf> Acesso em: 20 set. 2017.
- BACA, P. et al. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. *J. Endod.*, Baltimore, v. 38, n. 7, p. 927-930, Jul. 2012.
- BOSE, R.; NUMMIKOSKI, P.; HARGREAVES, K. A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J. Endod.*, Baltimore, v. 35, n. 10, p. 1343-1349, Oct. 2009.
- CARBAJAL MEJÍA, J. B.; AGUILAR ARRIETA, A. Reduction of viable *Enterococcus faecalis* in human radicular dentin treated with 1% cetrimide and conventional intracanal medicaments. *Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v. 32, n. 4, p. 321-327, Aug. 2016.
- CHUENSOMBAT, S. et al. *Cytotoxic effects and antibacterial efficacy of a 3-antibiotic combination: an in vitro study*. *J. Endod.*, Baltimore, v. 39, n. 6, p. 813-819, Jun. 2013.
- COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ECLAIRAGE. Colorimetry (Official Recommendations of the International Commission on Illumination). *Publication CIE*, no. 15 (E-1.3.1). Paris: Bureau Central de la CIE, 1971.
- COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ECLAIRAGE. Recommendations on Uniform Color Spaces, Color-difference Equations, Psychometric Color Terms. *Publication CIE*, no. 15 (E-1.3.1), suppl. 2. Paris: Bureau Central de la CIE, 1978.
- CONDE, M. C. M. et al. *A scoping review of root canal revascularization: relevant aspects for clinical success and tissue formation*. *Int. Endod. J.*, Oxford, v. 50, n. 9, p. 860-874, Sep. 2017.
- CRUZ, E. V. et al. Penetration of propylene glycol into dentine. *Int. Endod. J.*, Oxford, v. 35, n. 4, p. 330-336, Apr. 2002.
- DABBAGH, B. et al. Clinical complications in the revascularization of immature necrotic permanent teeth. *Pediatr. Dent.*, Chicago, v. 34, n. 5, p. 414-417, Sep./Oct. 2012.

- DETTWILER, C. A. et al. *In vitro* assessment of the tooth staining potential of endodontic materials in a bovine tooth model. *Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v. 32, n. 6, p. 480-487, Dec. 2016.
- DEVARAJ, S.; JAGANNATHAN, N.; NEELAKANTAN, P. Antibiofilm efficacy of photoactivated curcumin, triple and double antibiotic paste, 2% chlorhexidine and calcium hydroxide against *Enterococcus fecalis in vitro*. *Sci. Rep.*, Londres, v. 21, n. 6, p. 24797, Apr. 2016.
- DIENG-SARR, F. et al. Modifications of the organic and mineral fractions of dental tissues following conditioning by self-etching adhesives. *J. Dent.*, Guildford, v. 39, n. 2, p. 141-147, Feb. 2011.
- DING, R. Y. et al. *Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: A clinical study*. *J. Endod.*, Baltimore, v. 35, n. 5, p. 745-749, May. 2009.
- DIOGENES, A.R. et al. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *J. Endod.*, Baltimore, v. 40, n. 4 Suppl, p. S52-57, Apr. 2014.
- FU, J. et al. Effect of air-blowing duration on the bond strength of current one-step adhesives to dentin. *Dent. Mater.*, Washington, v. 33, n. 8, p. 895-903, Aug. 2017.
- GALLER, K.M. et al. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J. Endod.*, Baltimore, v. 37, n. 11, p. 1536-1541, Nov. 2011.
- GALLER, K.M. et al. EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. *Int. Endod. J.*, Oxford, v. 49, n. 6, p. 581-590, Jun. 2016.
- GALLER, K.M. et al. Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *J. Endod.*, Baltimore, v. 41, n. 3, p. 363-368, Mar. 2015.
- GARCIA-GODOY, F.; MURRAY, P. E. Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. *Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v. 28, n. 1, p. 33-41, Feb. 2012.
- GIACHETTI, L. et al. Comparison of experienced and inexperienced operators on bond strengths of total-etch and self-etch bonding systems. *Am. J. Dent.*, San Antonio, v. 24, n. 5, p. 271-276, Oct. 2011.
- GOMES, B. P. et al. Analysis of the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from endodontic infections in Brazil during a period of nine years. *J. Endod.*, Baltimore, v. 37, n. 8, p. 1058-1062, Aug. 2011.
- GOMES-FILHO, J. E. et al. Tissue reaction to a triantibiotic paste used for endodontic tissue self-regeneration os nonvital immature permanente teeth. *J. Endod.*, Baltimore, v. 38, n. 1, p. 91-94, Jan. 2012.
- HOLDEN, D. et al. Clinical outcomes of artificial root-end barriers with mineral trioxide aggregate in teeth with immature apices. *J. Endod.*, Baltimore, v. 34, n. 7, p. 812-817, Jul. 2008.
- HOSHINO, E. et al. *In vitro* antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int. Endod. J.*, Oxford, v. 29, n. 2, p. 125-130, Mar. 1996.

- HOSHINO, E. *Information on LSTR 3Mix-MP Therapy: Lesion sterilization and tissue repair (LSTR) Therapy – LSTR 3Mix-MP Therapy*. 2007. Disponível em: <<http://www.lstr.jp/e/information.html> > Acesso em: 22 out. 2017.
- JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v. 236, n. 2, p. 163-173, Jul. 2004.
- JUNG, I. Y.; LEE, S. J.; HARGREAVES, K. M. *Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: A case series*. *J. Endod.*, Baltimore, v. 34, n. 7, p. 874-887, Jul. 2008.
- KAHLER, B. et al. *Revascularization outcomes: a prospective analysis of 16 consecutive cases*. *J. Endod.*, Baltimore, v. 40, n. 3, p. 333-338, Mar. 2014.
- KAHLER, B.; ROSSI-FEDELE G. A review of tooth discoloration after regenerative endodontic therapy. *J. Endod.*, Baltimore, v. 42, n. 4, p. 563-569, Apr. 2016.
- KIM, J. H. et al. *Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report*. *J. Endod.*, Baltimore, v. 36, n. 6, p. 1086-1091, Jun. 2010.
- KIM, K. W. et al. The effects of radicular dentine treated with double antibiotic paste and ethylenediaminetetraacetic acid on the attachment and proliferation of dental pulp stem cells. *Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v. 31, n. 5, p. 374-379, Jun. 2015.
- KISHEN, A.; GEORGE, S.; KUMAR, R. *Enterococcus faecalis* - mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine *in vitro*. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, Hoboken, v. 77, n. 2, p. 406–415, May 2006.
- LABBAN, N. et al. The direct cytotoxic effects of medicaments used in endodontic regeneration on human dental pulp cells. *Dent Traumatol.*, Copenhagen, v. 30, n. 6, p. 429-434, Dec. 2014.
- LANA, P. E. et al. Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in root canal systems. *Braz. Dent. J.*, Ribeirão Preto, v. 30, n. 6, p. 429-434, Dec. 2009.
- LIU, H. et al. Biofilm formation capability of *Enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. *J. Endod.*, Baltimore, v. 36, n.4, p. 630-635, Apr. 2010.
- LOVE, R. M. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. *Int. Endod. J.*, Oxford, v. 34, p. 399-405, Jul. 2001.
- LOVELACE, T.W. et al. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J. Endod.*, Baltimore, v. 37, n. 2, p. 133–138, Febr. 2011.
- MARTIN, D. E. et al. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *J. Endod.*, Baltimore, v. 40, n. 1, p. 51-55, Jan. 2014.
- MCTIGUE, D. J.; SUBRAMANIAN, K.; KUMAR, A. *Management of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series*. *Pediatr. Dent.*, Chicago, v. 35, n. 1, p. 55-60, Jan./Feb. 2013.

- MENTE, J. et al. *Mineral trioxide aggregate apical plugs in teeth with open apical foramina: a retrospective analysis of treatment outcome. J. Endod.*, Baltimore, v. 35, n. 10, p. 1354-1358, Oct. 2009.
- MOŻYŃSKA, J. et al. *Tooth discoloration induced by different calcium silicate-based cements: a systematic review of in vitro studies. J. Endod.*, Baltimore, v. 43, n. 10, p. 1593-1601, Oct. 2017.
- NOSRAT A, SEIFI A, ASGARY S. *Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. J. Endod.*, Baltimore, v. 37, n. 4, p. 562-567, Apr. 2011.
- ORDINOLA-ZAPATA, R. et al. Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral-infected dentin biofilm model. *J. Endod.*, Baltimore, v. 39, n. 1, p. 115-118, Jan. 2013.
- PANG, N. S. et al. Effect of EDTA on attachment and differentiation of dental pulp stem cells. *J. Endod.*, Baltimore, v. 40, n. 6, p. 811-817, Jun. 2014.
- PORTER, M. L. et al. Effects of novel 3-dimensional antibiotic-containing electrospun scaffolds on dentin discoloration. *J. Endod.*, Baltimore, v. 42, n. 1, p. 106-112, Jan. 2016.
- RAMAMURTHY, N. S. et al. *Inhibition of matrix metalloproteinase-mediated periodontal bone loss in rats: A comparison of 6 chemically modified tetracyclines. J. Periodontol.*, Indianapolis, v. 73, n. 7, p. 726-734, Jul. 2002.
- RETAMOZO, B. et al. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. *J. Endod.*, Baltimore, v. 36, n. 3, p.520-523, Mar. 2010.
- REYNOLDS, K.; JOHNSON, J. D.; COHENCA, N. *Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. Int. Endod. J.*, Oxford, v. 42, n. 1, p. 84-92, Jan. 2009.
- RUPAREL, N. B. et al. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J. Endod.*, Baltimore, v. 38, n. 10, p. 1372–1375, Oct. 2012.
- SABRAH, A. H. A.; YASSEN, G. H.; GREGORY, R. L. Effectiveness of antibiotic medicaments against biofilm formation of *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis*. *J. Endod.*, Baltimore, v. 39, n. 11, p. 1385–1389, Nov. 2013.
- SABRAH, A. H. et al. The effect of diluted triple and double antibiotic pastes on dental pulp stem cells and established *Enterococcus faecalis* biofilm. *Clin. Oral Investig.*, Berlin, v. 19, n. 8, p. 2059-2066, Nov. 2015.
- SATO, T. et al. *In vitro* antimicrobial susceptibility to combinations of drugs on bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth. *Oral Microbiol. Immunol.*, Copenhagen, v. 8, n. 3, p. 172–176, Jun. 1993.
- SHABAHANG, S. et al. A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *J. Endod.*, Baltimore, v. 25, n. 1, p. 1-5, Jan. 1999.
- SHAH, N. et al. *Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: A pilot clinical study. J. Endod.*, Baltimore, v. 34, n. 8, p. 919-925, Aug. 2008.

- SKUCAITE, N. et al. Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis. *J. Endod.*, Baltimore, v. 36, n. 10, p. 1611-1616, Oct. 2010.
- TANASE, S. et al. *Reversed-phase ion-pair chromatographic analysis of tetracycline antibiotics*: application to discolored teeth. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v. 706, n. 2, p. 279-285, Mar. 1998.
- THOMSON, A. D. et al. Tooth discolouration: staining effects of various sealers and medicaments. *Aust. Endod. J.*, Melbourne, v. 38, n. 1, p. 2-9, Apr. 2012.
- TOMSON, P. L. et al. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J. Dent.*, Guildford, v. 35, n. 8, p. 636-642, Apr. 2007.
- TREVINO, E. G. et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J. Endod.*, Baltimore, v. 37, n. 8, p. 1109–1115, Aug. 2011.
- TROPE, M. Regenerative potential of dental pulp. *J. Endod.*, Baltimore, v. 34, n. 7 Suppl, p. S13-17, Jul. 2008.
- WINDLEY, W. et al. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J. Endod.*, Baltimore, v. 31, n. 6, p. 439-443, Jun. 2005.
- WITHERSPOON, D. et al. Retrospective analysis of open apex teeth obturated with mineral trioxide aggregate. *J. Endod.*, Baltimore, v. 34, n. 10, p. 1171-1176, Oct. 2008.
- YAO, J. S. Comparison of doxycycline and minocycline in the inhibition of VEGF-induced smooth muscle cell migration. *Neurochem. Int.*, Oxford, v. 50, n. 3, p. 524-530, Feb. 2007.
- ZEHNDER, M. Root canal irrigants. *J. Endod.*, Baltimore, v. 32, n. 5, p. 389-398, May 2006.