

UNIVERSIDADE DE UBERABA

JOÃO PAULO ALVES DA SILVA
VINÍCIUS MARQUES DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS INTRACANAIIS NO
BIOFILME DE *Enterococcus faecalis*. ESTUDO EX VIVO.

Uberaba – MG
2017

JOÃO PAULO ALVES DA SILVA
VINÍCUS MARQUES DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS INTRACANAIS NO
BIOFILME DE *Enterococcus faecalis*. ESTUDO EX VIVO.

Projeto de pesquisa apresentado ao
Curso de Odontologia da Universidade de
Uberaba, como parte dos requisitos para
a conclusão do curso de Graduação.

Orientador: Prof. Dr. Benito André Silveira
Miranzi

Coorientadora: Prof. Dr^a. Ruchele Dias
Nogueira Geraldo Martins

Uberaba – MG
2017

S38a Silva, João Paulo Alves da.
Avaliação da eficácia de agentes antimicrobianos intracanais no biofilme de *Enterococcus faecalis*: estudo ex vivo / João Paulo Alves da Silva, Vinícius Marques de Souza. – Uberaba, 2017.
22 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso -- Universidade de Uberaba. Curso de Odontologia, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Benito André Silveira Miranzi.

Coorientadora: Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins.

1. Endodontia – Tratamento. 2. *Enterococcus*. 3. Hidróxido de cálcio. 4. Clorexidina. I. Souza, Vinícius Marques de. II. Miranzi, Benito André Silveira. III. Martins, Ruchele Dias Nogueira Geraldo. IV. Universidade de Uberaba. Curso de Odontologia. V. Título.

CDD 617.6342

Ficha elaborada pela bibliotecária Tatiane da Silva Viana CRB6-3171

UNIVERSIDADE DE UBERABA

JOÃO PAULO ALVES DA SILVA
VINÍCIUS MARQUES DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS
INTRACANAIS NO BIOFILME DE *Enterococcus faecalis*. ESTUDO EX VIVO.

Projeto de pesquisa apresentado ao
Curso de Odontologia da Universidade de
Uberaba, como parte dos requisitos para
a conclusão do curso de Graduação.

Orientador: Prof. Dr. Benito André Silveira
Miranzi

Coorientadora: Prof. Dr^a. Ruchele Dias
Nogueira Geraldo Martins

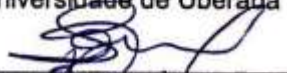
Área de Concentração: Endodontia

Aprovado em: 16/12/2017

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Benito André Silveira Miranzi
Universidade de Uberaba



Prof^a. Dr^a. Renata Oliveira Samuel
Universidade de Uberaba

RESUMO

O objetivo do tratamento endodôntico é o controle microbiano e a prevenção da reinfecção no sistema radicular. Para redução destes é necessário o uso de medicamentos intracanais que penetrem nos túbulos dentinarios e canais acessórios, determinando maior eficiência na neutralização dos microrganismos presentes. Como medicamentos intracanais utilizados rotineiramente na terapia endodôntica temos: Hidróxido de Cálcio, Paramonoclorofenol canforado e Clorexidina (CHX). O Tianfenicol (Glitisol) é um antibiótico de largo espectro que age sobre várias bactérias, tem ação bacteriostática e bactericida, indicado em casos onde o tratamento convencional não obteve sucesso. O objetivo do presente estudo foi realizar uma comparação da atividade antimicrobiana do Hidróxido de Cálcio, Clorexidina, e Tianfenicol (Glitisol) em biofilme intra-radicular de *Enterococcus faecalis*. Para tanto foram utilizados dentes unirradiculares humanos que foram previamente esterilizados. No canal destes dentes foram inseridas culturas microbianas. Os dentes foram divididos em grupos de acordo com os medicamentos. Após 7 dias de incubação, os dentes foram submetidos a medicação. Após período de 14 dias foram coletadas amostras de dentina com auxílio de GG #5 intracanais que foram inseridas em tubo contendo BHI estéril. Após agitação, 10 µl foram plaqueados em placas contendo Meio BHI (Brain Herat Infusion). Estas placas foram incubadas e após 24 horas foram realizadas contagens do número de colônias com auxílio de uma lupa estereoscópica. Os dados foram analisados utilizando o software Bioestat - versão 5.3. Sendo que o teste aplicado foi o Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn. Concluiu-se que a efetividade dos agentes antimicrobianos intracanais no biofilme de *Enterococcus faecalis* obteve resultados significativos com a Clorexidina e o Hidróxido de cálcio e não significativos com o Tianfenicol.

Palavras-chaves: *Enterococcus faecalis*. Hidróxido de cálcio. Tiafenicol (Glitisol). Clorexidina.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
2	OBJETIVO	6
3	MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1	SELEÇÃO E PREPARO DOS DENTES	7
3.2	ANTIMICROBIANOS TESTADOS	8
3.3	SELEÇÃO DA CEPA	8
3.4	CRESCIMENTO E CULTIVO MICROBIANO	9
3.5	INOCULAÇÃO MICROBIANA INTRACANAL E FORMAÇÃO DO BIOFILME	9
3.6	GRUPOS E PROCEDIMENTOS	9
3.7	COLETA DE AMOSTRAS MICROBIOLÓGICAS	9
3.8	ANÁLISES DE DADOS	10
4	RESULTADO	11
5	DISCUSSÃO	13
6	CONCLUSÃO	15
	REFERÊNCIAS	16
	ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	20
	ANEXO B - COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO	21
	ANEXO C - DECLARAÇÃO DO BANCO DE DENTES HUMANOS	22

1 INTRODUÇÃO

Os processos inflamatórios do tecido pulpar determinam alterações vasculares e celulares diminuindo as possibilidades da manutenção da vitalidade. Os agentes microbianos agressores aumentam consideravelmente as possibilidades da infecção deste tecido. Uma vez instalada a necrose pulpar, fonte geradora das patologias perirradiculares, relacionadas diretamente com a presença e persistência das bactérias no sistema de canais radiculares (YADAV *et al.*, 2016). As bactérias formam colônias com alto grau de organização chamados de biofilmes, estes possuem resistência aos procedimentos químicos e mecânicos, devido à complexidade anatômica do conduto radicular, onde encontram-se canais laterais, acessórios, istmo e delta apical (DEVARAJ *et al.*, 2016).

O tratamento endodôntico, de polpas necrosadas é realizado em múltiplas visitas, incluído manobras de preparo do canal radicular e inserção de medicamentos, afim de reduzir ou eliminar biofilmes presentes na infecção intracanal, antes da obturação (SU *et al.*, 2011). Alguns fatores como evolução das técnicas e materiais, conhecimento anatômico e biológico das infecções dos canais radiculares levaram a possibilidade da realização do tratamento em uma única visita. Existem divergências em relação aos resultados produzidos em uma sessão ou duas sessões frente a polpa necrosada (MOREIRA *et al.*, 2017.; RICUCCI *et al.*, 2011).

Card *et al.* (2002) afirmaram que instrumentações realizadas em canais curvos com a lima #35 ou dilatação maior determinam menores contagens de colônias bacterianas.

Os biofilmes presentes e colonizados intracanaís, podem por vezes estar localizados nas paredes dentinárias ou na parte apical do canal principal, no entanto também podem estar presentes em áreas distantes do mesmo, incluindo os túbulos dentinários, istmo, canais laterais e ramificações apicais. Além disso, os biofilmes aderem à superfície apical das raízes, chamados de biofilmes extra radiculares (RICUCCI *et al.*, 2013). A bactéria *Enterococcus faecalis* é um componente desses biofilmes, sendo assim considerada mais resistente e responsável por falhas no tratamento de infecções do conduto radicular (YADAV *et al.*, 2016).

Enterococcus faecalis consiste em uma bactéria Gram-positiva facultativa responsável 80-90% das infecções endodônticas. Costuma ser a única espécie de *Enterococcus* isolada no insucesso resultando em retratamento radicular. Assim o *E. faecalis* possui grande resistência aos medicamentos intracanaís, e alta capacidade de sobreviver no conduto radicular isolado ou em infecções mistas. (BAZVAND *et al.*, 2014).

O preparo químico mecânico juntamente com a modelagem do conduto radicular leva a uma redução significativa dos microorganismos, porém essa redução não é o suficiente em alguns casos devido à complexidade anatômica e a limitação dos irrigantes e instrumentos em atingir os microorganismos. Nos casos em que a infecção endodôntica resiste ao protocolo de tratamento regular, ocorre a presença de exsudado, levando a não conclusão da terapia com sucesso, assim havendo a necessidade de medicação intracanal (BHANDARI *et al.*, 2014).

Um dos medicamentos intracanal mais utilizados e conhecido na endodontia é o hidróxido de cálcio. O mesmo tem propriedade antibacteriana atribuída a um elevado pH, conseguindo penetrar nos túbulos dentinários, levando a morte celular através da liberação de íons hidroxila (SHOKRANEH *et al.*, 2014). Apesar da ação limitada contra *Enterococcus faecalis* (DELGADO *et al.*, 2013).

A clorexidina (CHX) é um medicamento e irrigante intracanal amplamente utilizada durante o tratamento endodôntico (LAKHANI *et al.*, 2017). Possui capacidade de agir por tempo prolongado devido a ligação aos cristais de hidroxiapatita assim ocorrendo ótima efetividade contra os microorganismos. A CHX tem ação bacteriostática, bactericida e boas propriedades antifúngicas e antivirais. A mesma possui efeito inibitório contra os microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos (JAHROMI *et al.*, 2017).

MELO (2017) afirma que o Tianfenicol apresenta redução do biofilme e diminuição do número de células microbianas quando em contato, apresentando inibição de crescimento microbiano satisfatório.

Baseado no que foi exposto o intuito do presente projeto é apresentar a eficácia dos agentes antimicrobianos intracanaís frente ao biofilme de *Enterococcus faecalis*.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve o objetivo de comparar a eficácia antimicrobiana comparando tianfenicol (glitisol), hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2%, em dentes extraídos unirradiculares, infectados pelo microrganismo *Enterococcus faecalis*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO E PREPARO DOS DENTES

Foram selecionados 40 dentes unirradiculares, com ápice maduro extraídos por causas desconhecidas e armazenados em um banco de dentes da Universidade de Uberaba. Os dentes que apresentaram sinal de rachadura foram excluídos. Para realização e utilização dos dentes, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Humano da UNIUBE (anexo 1).

Os dentes obtidos foram colocados em solução de hipoclorito de sódio 2,5% (Asfer, Campinas, SP) durante 2 horas para fins de desinfecção e então foram armazenados em solução salina até serem utilizados para os experimentos.

Os dentes foram preparados baseado no método de Haapasalo e Orstavik (Haapasalo; Orstavik, 1987). As coroas dos dentes e 3 a 4 mm da extremidade das raízes foram removidas com um disco de diamante (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça) obtendo-se amostras de 8 mm de comprimento. O alargador de GG #3 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) foi levado em toda extensão do preparo com o objetivo de preparar o canal radicular com 8 milímetros de comprimento e 0,9 de diâmetro. Após este processo, as raízes foram armazenadas em frascos com solução fisiológica a 0,9% a fim de permanecerem constantemente hidratadas até o início do experimento.

Para eliminação da *smear layer* gerada durante os procedimentos de modelagem, todos os dentes foram submetidos a um banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner, Odontobras) em três ciclos por 10 minutos cada, sendo o primeiro ciclo com Hipoclorito de Sódio 2,5% (Asfer, Campinas, SP), o segundo ciclo com EDTA 17% (Biodinâmica Química e Farmacêutica, Ibiporã, PR) e o terceiro ciclo com solução salina.

Após preparo e padronização dos canais radiculares, os espécimes foram selados com exceção da entrada do canal com esmalte incolor (Risqué, Savoy Industria de Cosméticos, Goiânia, GO). Inicialmente, procedeu-se à secagem das raízes com gaze e cone de papel absorvente. Posteriormente, um cone de papel compatível ao diâmetro do canal foi inserido na sua luz de forma a ocupar este espaço durante todo o processo de impermeabilização, impedindo que o adesivo

adentrasse ao canal. Após o período de secagem do impermeabilizante, os dentes foram estocados em solução fisiológica 0,9%.

Para esterilização dos espécimes, os 40 dentes foram aleatoriamente distribuídos em 5 grupos conforme a (Tabela 3) e acondicionados em tubos com tampas rosqueáveis contendo 10 ml de meio de cultura caldo (BHI). A esterilização procedeu-se em autoclave (Autoclave Manual, Phoenix Lufenco) por 30 minutos a 121 °C e 1 atm. Após a autoclavagem, os dentes foram mantidos por 48 horas na incubadora para confirmar a eficácia do processo de esterilização, que se caracterizou pela ausência de turbidez do meio.

3.2 ANTIMICROBIANOS TESTADOS

Para realização do presente estudo foram testadas várias substâncias (TABELA 1) a fim de avaliar sua efetividade no crescimento e viabilidade de *Enterococcus faecalis*.

Abreviatura/ Grupo	Substâncias	Concentrações	Nome comercial/Marca e Procedência
Tia	Tianfenicol	500mg/L	Glitisol® Zambom- Indianópolis, SP.
CH	Hidróxido de cálcio	35%	Pasta Ultracal XS – Ultradent- Indaiatuba, SP.
Con	Controle	-	-
CHX	Clorexidina	2%	FGM; Joinville, SC.
H2O	Água destilada	-	-

Tabela 1. Substâncias usadas, concentrações, marcas comerciais e procedência:

3.3 SELEÇÃO DA CEPA

A Tabela 2 indica a cepa, e seu registro de ATCC e o meio de cultura empregados para obtenção do inóculo para os testes que serão descritos a seguir:

Micro-organismos	ATCC	Meios de cultura
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	BHI

Tabela 2. Cepa usadas, registro de ATCC e os meios de cultura empregados.

3.4 CRESCIMENTO E CULTIVO MICROBIANO

A cepa foi cultivada em Meio BHI por 24 horas a 37° C em estufa bacteriológica para obtenção de 10⁷ Unidades Formadoras de Colônias UFC/mL de DO 800 nm = 1,0 mensuradas em Espectrofotômetro digital (ThermoScientific).

3.5 INOCULAÇÃO MICROBIANA INTRACANAL E FORMAÇÃO DO BIOFILME

Foram aplicados com auxílio de uma pipeta, 100 microlitros de suspensão microbiana nos tubos rosqueáveis contendo os espécimes e 10 ml de BHI estéril. As amostras foram incubadas a 37 °C durante 7 dias. A cada dois dias foram realizados uma troca de 3 ml de BHI usado por 3 ml de BHI novo.

3.6 GRUPOS E PROCEDIMENTOS

Decorrido o período de formação do biofilme, os dentes foram submetidos aos seguintes procedimentos:

GRUPOS	N	MEDICAÇÃO
Grupo 1	09	CHX 2 % gel
Grupo 2	08	CH
Grupo 3	10	Tianfenicol (Glitisol)
Grupo 4	5	H2O
Grupo 5	5	NÃO

Tabela 3: Grupos de micro-organismos e medicação.

Todos os medicamentos foram levados aos espécimes através de uma lentulo de cor preta (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) por três vezes até o final do conduto e selados com cimento temporário (Coltosol, Altstätten, Suíça). Na sequência os dentes foram colocados em placas de 24 poços estéreis e incubadas a 37 °C por 14 dias.

3.7 COLETA DE AMOSTRAS MICROBIOLÓGICAS

Após o período de incubação, os cimentos temporários foram removidos. As raízes dentárias foram irrigadas por 5 ml de solução salina estéril. A dentina foi removida por GG # 5 e o canal foi irrigado por solução salina normal. Esta remoção da dentina foi repetida por três vezes em todo o comprimento do canal. Os debris de dentina foram inseridos em um tubo estéril contendo 1 mL de BHI estéril. Em seguida, cada tubo foi agitado por 1 minuto em vórtex e então, 25 µL desta solução foi aplicada em uma placa contendo BHI ágar e incubada a 37 °C durante 24 horas. Após o período de incubação foi realizada as contagens do número de unidades formadoras de colônias (CFU) em lupa estereoscópica.

3.8 ANÁLISES DE DADOS

Os dados foram analisados utilizando o software Bioestat - versão 5.3. Sendo que o teste aplicado foi o Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn.

4 RESULTADO

TABELA 4: Resultado da contagem do número de unidades formadoras de colônias (CFU).

Grupo CHX	Grupo CH	Grupo Tia	Grupo H2O	Grupo CON
0	0	16	476	560
0	1	122	526	433
0	0	10	465	342
0	3	102	342	246
0	2	262	321	654
0	1	60		
0	5	78		
0	4	4		
0		193		
		267		

Tabela 4: Dados originais.

Os dados originais foram submetidos a estatística descritiva (TABELA 5).

Tabela 5: Média, desvio padrão e coeficiente de variação da contagem do número de unidades formadoras de colônias (CFU).

Grupos	Média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação
CHX	0	0	0
CH	2	1.85	92.58%
Tia	111.4	99.12	88.98%
H2O	426.0	89.58	21.03%
Con	447.0	163.73	36.63%

Tabela 5: Dados da estatística descritiva.

Tabela 6: Denotam-se amostras heterogêneas, permitindo a adoção do teste Kruskal-Wallis post hoc de Dunn.

H	31.9954
Graus de Liberdade	4
(p) Kruskal – Wallis	0.0000
CHX	6.0000 A
CH	12.5625 BA
Tia	22.5500 CB
H2O	32.3000 C
Con	32.3000 C

Tabela 6: Letras maiúsculas iguais determinam não haver diferenças significantes.

O grupo da CHX não teve diferença em relação ao grupo do CH, mas apresentou diferença em relação aos grupos Tia, H2O e Con, assim tendo resultados positivos contra o microrganismo *Enterococcus faecalis*. O grupo do CH não teve diferença em relação ao grupo Tia, entretanto apresentou diferença em relação aos grupos H2O e Com, apresentando um bom resultado contra *Enterococcus faecalis*. O grupo Tia não apresentou diferença significativa em relação aos grupos Con, H2O e CH, ou seja, não apresentando bons resultados frente ao *Enterococcus faecalis* na atual condição.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo rejeita a hipótese de nulidade devido aos medicamentos testados terem diferenças significativas entre eles e os grupos controles.

Patologias pulpaes a longo prazo levam a uma propagação de microrganismos em toda extensão do sistema de canais radiculares levando a infecções pulpo-periodontais. *Enterococcus faecalis* é frequentemente encontrado em infecções endodônticas persistentes, seja isolado ou em conjunto com outras bactérias (YANG *et al.*, 2016). Durante a fase do preparo químico-mecânico podem ocorrer falhas na eliminação dos microrganismos presentes na dentina ou formando biofilmes. Os patógenos que restaram em áreas inacessíveis a ação mecânica das limas e atuação química das substâncias podem determinar a manutenção da patologia. O uso de medicação intracanal entre sessões proporciona a redução microbiana do sistema de canais radiculares (SIQUEIRA *et al.*, 2007). Desta forma é necessária a utilização de medicação intracanal em caso de necropulpectomia para o melhor controle da população bacteriana.

O modelo experimental utilizado neste estudo foi baseado no ensaio proposto por HAAPASALO e ORSTAVIK (HAAPASALO; ORSTAVIK 1987), para infecção e desinfecção da dentina radicular bovina *in vitro*. Portanto, a dentina radicular bovina tem uma diferença considerável em relação a dentina radicular humana principalmente no diâmetro dos túbulos dentinários, determinando influencia na disponibilidade de nutrientes, penetração dos microrganismos e difusão de substancias antimicrobianas aplicadas como medicação intracanal (KIRSCH *et al.*, 2017.; VATKAR *et al.*, 2017). Partindo desse pressuposto o presente estudo foi realizado com dentes humanos extraídos por causas desconhecidas disponibilizado pelo banco de dentes da Universidade de Uberaba, sendo assim reproduzindo as condições anatômicas encontradas durante o tratamento endodôntico e, conseqüentemente, para obtenção de resultados mais precisos.

A clorexidina é uma bis-biguanida catiônica que adsorve na parede celular dos microrganismos causando vazamento dos componentes intracelulares Lee *et al.* (2009), sendo utilizada como solução irrigante e medicação intracanal durante o tratamento de polpas necrosadas devido à sua atividade antimicrobiana e substantividade (SIQUEIRA *et al.*, 2007). A ação bactericida da Clorexidina em

relação ao *Enterococcus faecalis* é confirmada por Gomes *et al.* (2003) e Portenier *et al.* (2002). Os resultados do presente estudo demonstraram que a clorexidina é eficaz como curativo de demora reduzindo os microrganismos nos túbulos dentinários indo ao encontro dos resultados de Schafer *et al.* (2005).

O hidróxido de cálcio é utilizado amplamente como medicamento intracanal desde a década de 1920 devido a sua ação bactericida efetiva (BAIK *et al.*, 2008). O CH inativa o biofilme de *Enterococcus faecalis* nos túbulos dentinários. Vários estudos relatam a eficiência do CH no controle do crescimento de *Enterococcus faecalis* (BAIK *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2011). Contrariamente existem estudos que relatam a resistência deste microrganismo frente à essa substancia e a alcalinização promovida pelo Hidróxido de Cálcio devido a bomba de protons (EVANS *et al.*, 2001; MOZAYAENI *et al.*, 2014; FLAHAUT *et al.*, 1997). Outros estudos demonstram que a eficiência do CH sobre o *Enterococcus faecalis* ocorre quando associado à outra substância antimicrobiana, como PMCC e Clorexidina. (PODBIELSKI *et al.*, 2003). No presente estudo o hidróxido de cálcio teve resultado significativo.

O tianfenicol não apresentou eficácia frente o *Enterococcus faecalis* nos túbulos dentinários. Portanto Melo (2017) afirmou que o tianfenicol em contato direto com o *Enterococcus faecalis* é eficaz como esclarecido previamente por Neu *et al.* (1980).

Mais estudos devem ser desenvolvidos com maiores números de corpos de provas, pois devido a pequena quantidade utilizada nesse presente estudo podemos ter incorrido no erro tipo 2 (encontrar diferenças significante aonde elas não existem).

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto, os resultados *ex vivo* da efetividade dos agentes antimicrobianos intracanais no biofilme de *Enterococcus faecalis* obteve resultados significativos com a Clorexidina e o Hidróxido de cálcio e não significativos com o Tianfenicol.

REFERÊNCIAS¹

BAIK, Jung Eun; JANG, Kyoung-Soon; KANG, Seok-Seong; YUN, Cheol-Heui; LEE, Kangseok; KIM, Byung-Gee; KUM, KEE-Yeon; Han, Seung Hyun. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* through deacylation of the lipid moiety. **Journal of endodontic**, [S1], v. 37, n. 2, Feb. 2011.

BAIK, Jung Eun; KUM, Kee-Yeon; YUN, Cheol-Heui; LEE, Jin-Kyung; LEE, Kangseok; KIM, Kack Kyun; HAN, Seung Hyun. Calcium Hydroxide Inactivates Lipoteichoic Acid from *Enterococcus faecalis*. **Journal of endodontic**, [S1], v. 34, n. 11, p. 1355-1359, Nov. 2008.

BAZVAND, Leila; AMINOZARBIAN, Mohammad Ghasem; FARHAD, Ali Reza; NOORMOHAMMADI, Hamid; HASHEMINIA, Seyed Mohsen; MOBASHERIZADEH, Sina. Antibacterial effect of triantibiotic mixture, chlorhexidine gel, and two natural materials Propolis and Aloe vera against *Enterococcus faecalis*: An ex vivo study. **Dental research journal**, Isfahan, v.11 (4), p.469-474, July. 2014.

BHANDARI, Sonam; T S, Ashwini; PATIL, Chetan R. An in vitro evaluation of antimicrobial efficacy of 2% chlorhexidine gel, propolis and calcium hydroxide against *enterococcus faecalis* in human root dentin. **Journal of clinical and diagnostic research**, Yadavagiri, v. 8(11), p. 60-63, Nov. 2014.

CARD, Steven J; SIGURDISON, Asgeir; ORSTAVIK, Dag; TROPE, Martin. The effectiveness of increased apical enlargement in reducing intracanal bacteria. **Journal of endodontics**, [S.1.]; v. 28, p. 779-783, Nov. 2002.

DELGADO, Ronan Jacques Rezende; GASPAROTO, Thaís Helena; SIPERT, Carla Renata; RAMOS, Claudia. Antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on intratubular candida albicans. **International journal of oral science**, [S.1.]; v. 5, p. 32-36, Mar. 2013.

DEVARAJ, Sharmila; JAGANNATHAN, Nithya; NEELAKANTAN, Prasanna. Antibiofilm efficacy of photoactivated curcumin, triple and double antibiotic paste, 2% chlorhexidine and calcium hydroxide against *enterococcus faecalis* in vitro. **Scientific reports**, Chennai, v. 6, p. 247-97, Apr. 2016.

EVANS, M; DAVIES, JK; SUNDQVIST; FIGDOR, D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **International endodontic journal**, [S1], v. 35, p. 221-228, July 2001.

FLAHAUT, Sigrid; HARTKE, Axel; GIARD, Jean-Christophe; AUFRAY, Yanick. Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*: adaptation, cross-protection, and changes in protein synthesis. **American society for microbiology**, [S1], v. 63, n. 2, p. 812-814, Feb. 1997.

GOMES, B.P.F.A; SOUZA. S.E.C; FERRAS, C.C.R; TEIXEIRA, F.B; ZALA, A.A, VALDRINGHI, L; SOUZA-FILHO, F.J. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. **International endodontic journal**, [S1], v. 36, p. 267-275, Apr. 2003.

HAAPASALO, H; ORSTAVIK, D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. **Journal of dental research**, [S.1.]; v.66 (8), p. 1375-1379, Aug. 1987.

JAHROMI, Maryam Zane; AREKATAIN, Mehrdad; RAVANBOD, Shirin; RANJBARIAN, Parisa; KOUSEHLAR, Sara. Comparison of endodontic medicaments on bond strength of fiber post to root dentin using resin cement. **Journal of dentistry, shiraz university of medical sciences**, Shiraz, v. 18(1), p. 56-60, Mar. 2017.

JOSE, Jerim; KRISHNAMMA, Shoba; PEEDIKAYIL, Faizal; AMAN, Shiu; TOMY, Nithya; MARIODAN, Jithin Pulickal. Comparative evaluation of antimicrobial activity of Qmix, 2.5% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine, guava leaf extract and aloe vera extract against enterococcus faecalis and candida albicans – an in-vitro study. **Journal of clinical and diagnostic research**, Yadavagiri, v. 10(5), p. 20-23, May. 2016.

KIRSCH, Jasmin; BASCHE, Sabine; NEUNZEHN, Jorg; DEDE, Maria, DANNEMANN, Martins; HANNIF, Christian; WEBER; Marie-Theres. Is it really penetration? Locomotion of devitalized *Enterococcus faecalis* cells within dentinal tubules of bovine teeth. **Archives of oral biology**, [S1], v. 83, p. 289-296, Aug. 2017.

LAKHANI, Ashik Ali; SEKHAR, J S; GUPTA, Pankaj; TEJOLATHA, Bellam; GUPTA, Anjali; KASHYAP, Shruti; DESAI, Veena; FARISTA, Shanim. Efficacy of triple antibiotic paste, moxifloxacin, calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel in elimination of e. Faecalis: an in vitro study. **Journal of clinical and diagnostic research**, Yadavagiri , vol-11(1), p.06-09, Jan. 2017.

LEE, Jin-Kyung; BAIK, Jung Eun; YUN, Cheol-Heui; LEE, Kangseok; HAN Seung Hyun; LEE, WooCheol; BAE, Kwang-Shik; BACK, Seung-Ho; LEE, Yonn; SON, Won-Jun; KUM, Kee-Yeon. Chlorhexidine gluconate attenuates the ability of lipoteichoic acid from enterococcus faecalis to stimulate Toll-like receptor 2. **Journal of endodontic**, [S1]; v. 35, n 2, p. 212-215, Feb. 2009.

LIMA, R.K.P.; GUERREIRO-TANOMARU, J.M.; FARIA-JÚNIOR, N.B.; TANOMARU-FILHO, M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v. 45, p. 311-316, 2011.

MELLO, Paula Rezende Bandeira de. **Avaliação dos efeitos do tianfenicol e agentes antimicrobianos sobre a viabilidade e formação do biofilme de enterococcus faecalia e candida albicans in vitro**. 2017. 47 f. Dissertação: (Mestrado em Clínica Odontológica) - Universidade de Uberaba, Uberaba, 2017.

MOREIRA, Maria Stella; NERES-SANTIAGO, Anuar Sadat; TEDESCO, Tamara; DOS SANTOS, Kerber Marcelo; MORINOTO, Susana. Endodontic treatment in single and multiple visits: a overview of systematic reviews. **Journal of endodontics**, [S.1.]; v. 43, p. 864-870, June. 2017.

MOZAYAENI, M. A.; HAERI, A.; DIANAT, O.; JAFARI, A. R. Antimicrobial effects of four intracanal medicaments on enterococcus faecalis: na in vitro study. **Iran endod j**, v. 9, n. 3, p. 195-8, July 2014.

NEU, H.C; FU, K.P; In vitro activity of chloramphenicol na thiamphenicol analogs. **Antimicrobial agentes and chemotherapy**, v. 18, n. 2, p. 311-316, Aug. 1980.

PODBIELSKI, Andreas; SPAHR, Axel; HALLER, Bernd. Additive antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on common endodontic bacterial pathogens. **Journal of endodontics**, U.S.A, v. 29, n. 5, p. 340-345, May. 2003.

PORTENIER, Isabelle; HAAPASALO, Hanna; ORTAVIK, Dag; YAMAUCHI, Mitsuo; HAAPASALO, Markus. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. **Journal of endodontics**, U.S.A v. 28, n. 5, p. 634-637, Sept. 2002.

RICUCCI, Domenico; LOGHIN, Simona; SIQUEIRA, José. Exuberant biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case. **Journal of endodontics**, [S.1.]; v. 39, n. 5, May. 2013.

RICUCCI, Domenico; RUSSO, José; RUTBERG, M; BURLESON, J A; SPANGBERG, L S. A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: results after 5 years. **Oral surgical oral medicine oral pathology oral radiology endodontic**, [S.1]; v. 112(6), p. 825-842, Dec. 2011.

SCHAFER, Edgar; BOSSMANN, Klaus. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and Two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. **Journal of endodontics**, U.S.A, v. 31, n. 1 p. 53-56, Jan. 2005.

SHOKRANEH, Ali; FARHAD, Ali Reza; FARHADI, Nastaran; SAATCHI, Masoud; HASHEMINIA, Seyed Mohsen. Antibacterial effect of triantibiotic mixture versus calcium hydroxide in combination with active agents against enterococcus faecalis biofilm. **Dental materials journal**, Isfahan, v. 33(6), p. 733-738, May. 2014.

SIQUEIRA, José F. JR; PAIVA, Simone S.M; ROÇAS, Isabela N. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. **Journal of endodontic**, [S1]; v. 33, n 5, p. 541-547, May. 2007.

SU, Yingying; WANG, Chenglin; YE, Ling. Healing rate and post-obturation pain of single- versus multiple- visit endodontic treatment for infected root canals: a systematic review. **Journal of endodontic**, [S.1.]; v. 37, p. 125-132, Feb. 2011.

VATKAR, Niranjan Ashok; HEGDE, Vivek; SATHE, Sucheta. Vitality of *Enterococcus faecalis* inside dentinal tubules after five root canal disinfection methods. **Journal of conservative dentistry**, [S1], v. 19(5) p. 445-449, Oct. 2016.

YADAV, Pankaj; CHAUDHARY, Sarika; SAXENA, Rajendra K; TALWAR, Sangeeta; YADAV, Sudha. Evaluation of antimicrobial and antifungal efficacy of chitosan as endodontic irrigant against enterococcus faecalis and candida albicans biofilm formed on tooth substrate. **Journal clin exp dent**, India, v. 9(3), p. 361-367, Oct. 2016.

YANG, Yan; SHEN, Ya; Wang, Zbejum; Huang, Xiangya; Maezono, Hazuki; MA, Jingzbi; CAO, Yingguang; HAAPASALO, Markus. Evaluation of the susceptibility of multispecies biofilms in dentinal tubules to disinfecting solutions. **JOE**, [S1], v. 42, n. 8, p. 1246-1250, Aug.2016.

¹ As referências foram formatadas de acordo com as novas da ABNT 2015 disponível em: http://www.uniube.br/biblioteca/novo/arquivos/2015/manual_normatizacao2015.pdf

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

plataformabrasil.saude.gov.br/visao/pesquisador/gerirPesquisa/gerirPesquisaAgrupador.jsf

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS INTRACANAIIS NO BIOFILME DE *Enterococcus faecalis*, ESTUDO EX VIVO.
Pesquisador Responsável: BENITO ANDRE SILVEIRA MIRANZI
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 77363317.0.0000.0145
Submetido em: 20/09/2017
Instituição Proponente: SOCIEDADE EDUCACIONAL UBERABENSE
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_965066

DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

LISTA DE CENTROS PARTICIPANTES E COPARTICIPANTES

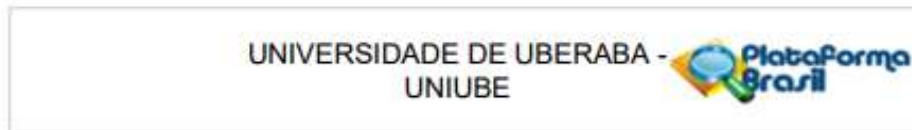
Apreciação	CAAE	Pesquisador Responsável	Comitê de Ética	Instituição	Situação	Tipo	R.C

HISTÓRICO DE TRÂMITES

Apreciação	Data/Hora	Tipo Trâmite	Versão	Perfil	Origem	Destino	Informações
	14/11/2017				Universidade de Uberaba		

Fonte: <http://plataformabrasil.saude.gov.br/visao/pesquisador/gerirPesquisa/gerirPesquisaAgrupador.jsf>

ANEXO B - COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS INTRACANAIS NO BIOFILME DE *Enterococcus faecalis*. ESTUDO EX VIVO.

Pesquisador: BENITO ANDRE SILVEIRA MIRANZI

Versão: 1

CAAE: 77363317.0.0000.5145

Instituição Proponente: SOCIEDADE EDUCACIONAL UBERABENSE

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 112685/2017

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS INTRACANAIS NO BIOFILME DE *Enterococcus faecalis*. ESTUDO EX VIVO. que tem como pesquisador responsável BENITO ANDRE SILVEIRA MIRANZI, foi recebido para análise ética no CEP Universidade de Uberaba - UNIUBE em 25/09/2017 às 09:11.

Endereço: Av. Nene Sabino, 1801
 Bairro: Universitário CEP: 38.055-600
 UF: MG Município: UBERABA
 Telefone: (34)3319-8811 Fax: (34)3314-8910 E-mail: cep@uniube.br

ANEXO C – DECLARAÇÃO DO BANCO DE DENTES HUMANOS



CURSO DE ODONTOLOGIA
BANCO DE DENTES HUMANOS – BDH-UNIUBE

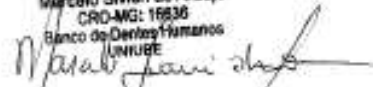
DECLARAÇÃO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Para fins de avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), o Banco de Dentes Humanos do Curso de Odontologia da Universidade de Uberaba (BDH-UNIUBE), compromete-se a auxiliar mais uma vez os pesquisadores na realização de seus projetos de pesquisa.

Sendo assim, após a aprovação do CEP, contribuiremos no fornecimento de 40 dentes uni radiculares (1º ou 2º pré-molares superiores ou inferiores) humanos, para a execução do trabalho de pesquisa intitulado: "AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE AGENTES ANTIMICROBIANOS INTRACANAIS NO BIOFILME DE *Enterococcus faecalis*. ESTUDO EX VIVO", a ser realizado pelo Prof. Dr. Benito André Silveira Miranzi.

Uberaba, 12 de setembro de 2017.

Marcelo Sivieri de Araújo
CRO-MG: 16836
Banco de Dentes Humanos
UNIUBE



Prof. Dr. Marcelo Sivieri de Araújo
Banco de Dentes Humanos (BDH-UNIUBE)
Curso de Odontologia - Universidade de Uberaba
Av. Nenê Sabino n°1801 sala 2D35
Fone: (34) 3319 8978
Uberaba- MG CEP: 38055-550

Fonte: Arquivo pessoal.