

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Odontologia

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação de Mestrado

**Avaliação físico-química e biológica de materiais obturadores de canais
radiculares de dentes decíduos**

Katerine Jahnecke Pilownic

Pelotas, 2015

Katerine Jahnecke Pilownic

Avaliação físico-química e biológica de materiais obturadores de canais radiculares de dentes decíduos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Geraldo Pappen

Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Regina Romano

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P643a Pilownic, Katerine Jahnecke

Avaliação físico-química e biologia de materiais obturadores de canais radiculares de dentes decíduos / Katerine Jahnecke Pilownic ; Fernanda Geraldo Pappen, orientadora ; Ana Regina Romano, coorientadora. — Pelotas, 2015.

75 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Dente decíduo. 2. Canal radicular. 3. Endodontia. 4. Obturação. I. Pappen, Fernanda Geraldo, orient. II. Romano, Ana Regina, coorient. III. Título.

Black : D602

Elaborada por Fabiano Domingues Malheiro CRB: 10/1955

Katerine Jahnecke Pilownic

Avaliação físico-química e biológica de materiais obturadores de canais radiculares
de dentes decíduos

Dissertação apresentada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Odontopediatria, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 30 de março de 2015.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Fernanda Geraldo Pappen

Doutora em Endodontia, pela Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo.

Prof. Dr. Luciano Casagrande

Doutor em Odontologia, área Odontopediatria, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. Fabrício Aulo Ogliari

Doutor em Odontologia, área Dentística, pela Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul.

Profa. Dra. Maria Laura Menezes Bonow

Doutora em Odontologia, área Odontopediatria, pela Universidade de São Paulo, São Paulo (Suplente).

Agradecimentos

Ao **programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia** da Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de realizar o mestrado em um programa com conceito 6 da CAPES e desfrutar de professores competentes, entusiasmados em dividir seus conhecimentos.

À **coordenação do programa** e ao Secretário, **Celaniro Júnior**, pela pronta disponibilidade em ajudar.

À **Prefeitura Municipal de Rio Grande** que me concedeu licença para que eu pudesse dar continuidade a minha qualificação.

Ao **Centro Clínico de Rio Grande**, em especial ao Dr. Alberto Minõ e a minha chefe Debora Simone Garcia pela compreensão da necessidade das trocas de turno, ausências e compensações de horário.

À minha orientadora **Fernanda Pappen** pelas oportunidades que me proporcionaste, pelos conhecimentos transmitidos, pela confiança, pela amizade e por todo carinho. Obrigada por tudo!

À minha co-orientadora **Ana Romano** por dividir comigo suas experiências, por confiar em mim e me proporcionar participar de um projeto que eu adoro fazer parte. O AOMI se tornou uma paixão na minha vida.

A **Luiza Helena Almeida**, que no começo foi obrigada a dividir comigo suas pesquisas e que com o passar do tempo se tornou uma parceira, incentivadora e grande amiga.

Ao Prof.Dr. **Markus Haapasalo** por permitir minha visita a University of British Columbia e realizar alguns experimentos nessa Instituição.

A Profa. Dra. **Melissa Damian**, a Profa. Dra. **Renata Morgental** e a Profa. Dra. **Adriana Etges** pela disponibilidade em me ajudar a realizar os experimentos.

A **Angelus** por me disponibilizar o material obturador de dentes decíduos experimental para realizar os testes e pelos recursos providos.

As professoras da Odontopediatria, **Lisandrea, Gabriela, Maria Laura, Marília, Marina, Vanessa** pelos ensinamentos e pelo acolhimento.

Às minhas colegas da Odontopediatria, em especial a “minha dupla” **Renata Casarin e Leticia Brancher**. Obrigada pela amizade e parceria ao longo desta caminhada.

À equipe do **Biotério da UFPEL**, **Ivana** do laboratório de patologia, **Carmen e Lisangela** do laboratório de microbiologia pela disponibilidade em me ajudar a realizar os experimentos.

Aos amigos **Aline e Fabrício Ogliari** pelo incentivo, pelas oportunidades e pela amizade.

Ao meu marido **Claudio Pilownic** que está sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando. Obrigado por todo cuidado, amor e lealdade.

À minha família por torcerem pelo meu crescimento pessoal e profissional.

Resumo

PILOWNIC, Katerine Jahnecke. **Avaliação físico-química e biológica de materiais obturadores de canais radiculares de dentes decíduos**. 2015.75f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Programa de Pós-graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Este estudo avaliou, a radiopacidade, o pH, a citotoxicidade e o efeito antimicrobiano de um material experimental à base de MTA para obturação de dentes decíduos. Também foram avaliados: Vitapex, Óxido de zinco e eugenol (OZE), e Calen espessado com óxido de zinco. A radiopacidade dos materiais foi comparada a uma escala de alumínio com variação de 0,5 a 5 mm, utilizando sensor digital, com distância focal e tempo de exposição padronizados. A mensuração do pH foi realizada em água deionizada, em períodos entre 1 hora e 30 dias. A viabilidade celular foi avaliada em fibroblastos gengivais humanos, expostos aos materiais por 1, 3 e 7 dias, através do teste de MTT. A atividade antimicrobiana dos materiais foi testada sobre uma cepa de *Enterococcus faecalis*, através do teste de contato direto. Foi realizada ainda, a avaliação do efeito antimicrobiano sobre biofilme de uma pasta de hidróxido de cálcio; iodofórmio; Vitapex; OZE, e Calen espessado com óxido de zinco. Amostras de biofilme misto foram suspensas em BHI e incubadas, em condições anaeróbicas, usando discos de hidroxiapatita como substrato por 21 dias. Os espécimes foram colocados em contato com os materiais em períodos experimentais de 7 e 30 dias. A porcentagem de bactérias mortas no biofilme foi determinada em microscopia confocal de varredura a laser. Os resultados de radiopacidade mostraram que o material experimental apresentou 3,28 mmAl, valor estatisticamente inferior ao apresentado pelos demais materiais ($p < 0,05$). O material experimental e o Calen espessado com óxido de zinco apresentaram valores de pH > 12 enquanto que o cimento de OZE e o Vitapex mostraram valores menores ($p > 0,05$). As células expostas a extratos de Vitapex apresentaram maior viabilidade em todas as concentrações, enquanto que as células expostas aos extratos de OZE apresentaram menor viabilidade ($p < 0,001$). O material à base de MTA e a pasta Calen foram estatisticamente semelhantes ($p = 0,115$). O teste de contato direto revelou que o material experimental à base de MTA eliminou *E. faecalis* após 4 horas de contato. O Vitapex foi o material de maior eficácia sobre o biofilme misto. Após 30 dias, apenas 49.49% do volume do biofilme estava viável. Houve diferença significativa entre os materiais em relação ao efeito sobre o biofilme ($F = 73,073$, $p = 0,00$). Conclui-se que o MTA experimental apresenta propriedades satisfatórias para emprego como material obturador de dentes decíduos.

Palavras-chave: dente decíduo; canal radicular; endodontia; obturação

Abstract

PILOWNIC, Katerine Jahnecke. **Physical-chemical and biological materials shutters of endodontic materials for primary teeth.** 2015.75f. Dissertation (Master Degree in Pediatric Dentistry). Postgraduate Program in Dentistry. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2015.

The aim of this study was to evaluate radiopacity, pH, cytotoxicity and antimicrobial effect of an experimental MTA-based material comparing to zinc oxide eugenol (ZOE) cement, Calen paste thickened with zinc oxide, and Vitapex. The radiopacity of materials was compared to graduated aluminum stepwedge ranging from 0.5 to 5 mm using a digital sensor with standardized focal distance and exposure time. The measurement of pH was performed in deionized water in periods between 1 hour and 30 days. Cell viability was evaluated in human gingival fibroblasts exposed to materials for 1, 3 and 7 days through the MTT assay. Mixed-species biofilm samples were suspended in BHI and incubated in anaerobic conditions using sterile hydroxyapatite disks as substrate for 21 days. The specimens were placed in contact with the tested materials for experimental periods of 7 and 30 days. The percentage of killed bacteria within biofilm was determined by confocal laser scanning microscopy. The antimicrobial activity of the materials was tested on a strain of *Enterococcus faecalis*, through direct contact test. The results of radiopacity showed that the experimental MTA presented 3.28 mmAl but statistically lower than that presented by the other materials ($p < 0.05$). Experimental MTA based material and Calen thickened with zinc oxide had $pH > 12$ while ZOE and Vitapex had lower values ($p > 0.05$). Cells exposed to extracts from Vitapex showed the highest viability rate at all concentrations, whereas cells exposed to ZOE extracts displayed the lowest viability rate ($p < 0.001$). MTA-based material and Calen paste were statistically equivalent ($p = 0.115$). Experimental MTA killed *E. faecalis* effectively after 4 hours of exposure. Vitapex was the most effective material against biofilm. After 30 days of incubation with Vitapex, 49.59% biofilm volume was viable. There were significant differences in the killing ratio between different materials ($F = 73.073$, $p = 0.00$). In conclusion, experimental MTA-based material has satisfactory properties for use as endodontic filling material.

Key-words: primary teeth; root canal; endodontics; root canal obturation

Lista de Figuras

Figura do Artigo 2

Figura 1	Fibroblast cell viability exposed to extracts of different materials at different incubation times	54
----------	--	----

Figura do Artigo 3

Figura1	Scanned ares using a CLSM.....	67
---------	--------------------------------	----

Lista de Tabelas

Tabelas do Projeto de Pesquisa

Tabela 1 Composição dos materiais obturadores testados.....21

Tabela 2 Distribuição dos grupos experimentais.....26

Tabelas do artigo 1

Tabela 1 Mean percentage of *E. faecalis* survival after incubation with the tested materials at different experimental times.....43

Tabela 2 Mean and standard deviation of pH for the materials tested at different experimental periods.....44

Tabela 3 Mean and standard deviation of the radiopacity (mm Al) for the materials tested.....44

Tabela do Artigo3

Tabela 1 Ratio of live bacteria (green color) to the whole bacteria (mean±SD), after the exposure to different root canal filling materials.....68

Lista de Abreviaturas e Siglas

OZE	Óxido de Zinco e Eugenol
MTA	Agregado de Trióxido Mineral
UFC	Unidade Formadora de Colônia
BHI	Brain Heart Infusion
TSA	Trypic Soy Agar
μL	Microlitro
mm	Milímetro
RDM	Radiographic Density of the Material
ISO	Internacional Orgazination of Standardization
ZO	Zinc Oxide
ZOE	Zinc Oxide and Eugenol
DCT	Direct Contact Test
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
KV	Quilovolt
mA	Microampere
MTT	Methyl Thiazol Tetrazolium
DMEM	Dubeco Modified Eagle Medium
OD	Optical Density
ADT	Agar Difusion Test
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
HA	Hydroxyapatite
PBS	Phosfate Buffered Saline

Sumário¹

1 Introdução.....	12
2 Projeto de Pesquisa.....	16
2.1 Antecedentes e Justificativas.....	16
2.2 Objetivos.....	20
2.2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2.2 Objetivos Específicos.....	20
2.3 Metodologia.....	20
2.3.1 Material testados.....	20
2.3.2 Teste antimicrobiano.....	21
2.3.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima	22
2.3.2.2 Avaliação da atividade antibacteriana dos materiais na presença de pó de Dentina.....	23
2.3.3 Teste de determinação de pH.....	23
2.3.4 Teste de liberação de íons hidroxila e difusão em dentina	24
2.3.5 Teste de radiopacidade.....	26
2.4 Orçamento.....	28
2.5 Cronograma de atividades.....	29
3. Relatório de campo.....	30
3.1 Objetivos específicos.....	30
3.2 Material e métodos.....	30
3.3 Metodologias adicionais.....	31
3.4 Cronograma de atividades.....	31

4 Artigos.....	32
4.1 Artigo 1.....	32
4.2 Artigo2.....	45
4.3 Artigo 3.....	55
5 Considerações finais.....	69
Referências Bibliográficas.....	70

¹Apresentação de acordo com o nível de descrição 4 – Estrutura em Artigos do manual de normas da UFPel para teses, dissertações e trabalhos acadêmicos, 2013, p35. Disponível em: <prg.ufpel.edu.br/sisbi/manual.html>.

1 Introdução

A terapia pulpar em dentes decíduos visa à manutenção do elemento dentário assim como a preservação da saúde da criança (GARCIA-GODOY, 1987). Sempre que o tecido pulpar torna-se irreversivelmente infectado, ou quando ocorre necrose, em decorrência de cárie ou traumatismo dental, a terapia pulpar dos dentes decíduos é indicada (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY, 2009). O tratamento endodôntico de dentes decíduos visa o reparo dos tecidos apicais e periapicais, levando a manutenção da integridade do germe dentário permanente (PINTO et al., 2011).

Não há consenso na literatura sobre o melhor material obturador a ser utilizado na endodontia de dentes decíduos e não existe um material único que preencha todos os requisitos desejáveis para um material obturador. Idealmente este material deveria ser reabsorvível, radiopaco, bactericida, promover adequado preenchimento e aderência às paredes dos canais radiculares, ser facilmente removido quando necessário; além de não provocar dano aos tecidos periapicais e ao germe do dente permanente, e tampouco alteração da coloração das estruturas dentárias (FUKS, 2000, KUBOTA; GOLDEN; PENUGONDA, 1992, MASS; ZILBERMAN, 1989, MORTAZAVI; MESBAHI, 2004, PINTO et al., 2011).

A capacidade do material de ser reabsorvível é um dos principais requisitos para a sua indicação como material obturador para dentes decíduos (COULD, 1972, KUBOTA; GOLDEN; PENUGONDA, 1992). A reabsorção do material obturador deve ocorrer simultaneamente à reabsorção radicular durante a esfoliação, permitindo a normal erupção do dente permanente (RANLY, GARCIA-GODOY, 1991). Além disso, em casos de sobre-obturação, o material deve ser reabsorvível e não tóxico aos tecidos periapicais e germe do permanente.

O cimento de óxido de zinco e eugenol (OZE) foi o primeiro material a ser utilizado como obturador de dentes decíduos. Desde então, vários autores têm relatado índices de sucesso moderados a altos na preservação de dentes decíduos tratados endodonticamente com materiais à base de óxido de zinco (MASS, ZILBERMAN, 1989).

Mesmo tendo sido tradicionalmente utilizado como material obturador de canais radiculares de dentes decíduos, o OZE apresenta características indesejáveis como ser irritante aos tecidos periapicais, desencadeando reações inflamatórias de corpo estranho, nos casos de extravasamento. Apresenta baixa capacidade de reabsorção, deixando partículas de óxido de zinco e de eugenol nos tecidos periapicais quando ocorre a reabsorção fisiológica (BARJA-FIDALGO et al., 2011, FUKS; EIDELMAN, 1991, MORTAZAVI; MESBAHI, 2004, PINTO et al., 2011). Alguns autores, afirmam ainda que o OZE tem limitada ação antimicrobiana (COX; HEMBREE; MCKNIGHT, 1978, TCHAOU; TURNG; MINAH; COLL, 1996). Outro inconveniente é que, quando extravasado pelo ápice radicular, existe o risco de deflexão da erupção dos dentes permanentes devido a sua dureza (COLL; SADRIAN, 1996).

Devido à sua biocompatibilidade, natureza hidrossolúvel, e baixa solubilidade (CERQUEIRA; MELLO-MOURA; SANTOS; GUEDES-PINTO, 2008, CHAWLA; SETIA; GUPTA; GAUBA; GOYAL, 2008), as pastas à base de hidróxido de cálcio também são indicadas como material obturador de canais radiculares de dentes decíduos. São também propriedades benéficas do hidróxido de cálcio sua atividade antimicrobiana, devido à dissociação iônica dos íons cálcio e hidroxila (FAVA; SAUNDERS, 1999, QUEIROZ et al., 2009, RANLY; GARCIA-GODOY, 2000), capacidade de indução de formação de tecido mineralizado, ativação da fosfatase alcalina e síntese de colágeno, além da capacidade de produzir a hidrólise da endotoxina bacteriana (DE SOUZA, 2009, MIZUNO; BANZAI, 2008, SILVA et al., 2008, SCHRODER, 1985, QUEIROZ et al., 2009).

Um material à base de hidróxido de cálcio disponível no mercado é a pasta Calen (S.S. White, Artigos Dentários, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), o qual apresenta o polietilenoglicol 400 como veículo. Este veículo viscoso permite a dissociação mais lenta dos íons hidroxila, diminuindo significativamente a velocidade de solubilização da pasta. A pasta Calen tem sido utilizada na dentição permanente, em

procedimentos de apicificação, tratamento de lesões periapicais originadas de canais radiculares infectados, como medicação entre sessões de pulpectomia, em casos de periodontite apical aguda e em retratamentos endodônticos, após falhas de intervenção cirúrgica e não cirúrgica (FAVA; SAUNDERS, 1999). Em dentes decíduos, a pasta Calen é indicada como material obturador devido à sua boa tolerância tecidual, natureza hidrossolúvel (viscoso) e baixa solubilidade (RANLY; GARCIA-GODOY, 2000). Alguns autores têm sugerido a adição de óxido de zinco à pasta Calen, o qual melhora ainda mais a consistência do material, e auxilia na redução da velocidade de fagocitose do material (FAVA; SAUNDERS, 1999, QUEIROZ et al., 2009). Esta propriedade torna-se vantajosa na obturação de dentes decíduos uma vez que a reabsorção do material obturador deve acompanhar a reabsorção fisiológica das raízes dos dentes decíduos (QUEIROZ et al., 2009, SILVA et al., 2010).

As pastas de hidróxido de cálcio vêm sendo utilizadas ainda em associação com iodofórmio, para obturação de dentes decíduos. Diversos estudos têm demonstrado que estes materiais são facilmente reabsorvidos na região periapical em caso de extravasamento, e não causam reação de corpo estranho ou têm qualquer efeito indesejável sobre dentes permanentes (CERQUEIRA; MELLO-MOURA; SANTOS; GUEDES-PINTO, 2008, MATHEWSON; PRIMOSCH, 1995, MCDONALD; AVERY; DEAN, 2000). Além disso, os materiais contendo iodofórmio em sua composição apresentam uma atividade antibacteriana satisfatória (CERQUEIRA; MELLO-MOURA; SANTOS; GUEDES-PINTO, 2008, MATHEWSON; PRIMOSCH, 1995, MCDONALD; AVERY; DEAN, 2000).

Dentre esses, o Vitapex (Neo Dental International Inc., Federal Way, WA, Estados Unidos), material na forma de pré-mistura de hidróxido de cálcio e iodofórmio, é tido como quase ideal para obturação de dentes decíduos (KUBOTA; GOLDEN; PENUGONDA, 1992). No entanto, como desvantagem, apresenta a rápida eliminação de iodofórmio pelo organismo, deixando espaços vazios no interior do canal radicular, o que pode comprometer o sucesso do tratamento endodôntico (KUBOTA; GOLDEN; PENUGONDA, 1992). Além disso, o uso de pastas iodoformadas pode provocar discoloração marrom-amarelada na coroa dentária, comprometendo a estética (GARCÍA-GODOY 1987). O potencial tóxico do iodofórmio, em contato com os tecidos vivos é considerado outra limitação do uso desse material (BARJA-FIDALGO et al., 2011, SILVA et al., 2010).

Atualmente, está sendo desenvolvido um novo material destinado à obturação dos canais radiculares de dentes decíduos. O material experimental à base de MTA (Mineral Trioxide Aggregate), segundo o fabricante, apresenta requisitos desejáveis para um material obturador de dentes decíduos, como ação antibacteriana e anti-inflamatória, é reabsorvível, biocompatível, radiopaco e indutor de calcificação. Além disso, não causa manchas na estrutura dentária e pode ser removido facilmente, se necessário.

Os testes *in vitro* são ensaios preliminares indispensáveis para o desenvolvimento de novos materiais odontológicos, já que buscam simular, em laboratório, condições biológicas mais próximas das reais e fornecem aos pesquisadores, princípios a serem estudados posteriormente. Desta forma, o presente estudo justifica-se por objetivar a avaliação das propriedades deste novo material obturador de dentes decíduos, à base de MTA (Angelus, Londrina, PR, Brasil), a ser em breve, lançado no mercado odontológico.

Assim, considerando a composição do material experimental a base de MTA, com a hipótese de que ele apresenta propriedades físico-química e biológicas superiores aos demais materiais obturadores de canais radiculares de dentes decíduos, serão avaliadas *in vitro*, suas propriedades físico-químicas e biológicas como material obturador de canais radiculares de dentes decíduos comparativamente a outros materiais.

2 Projeto de pesquisa

2.1 Antecedentes e Justificativas

Apesar dos avanços na prevenção da cárie dentária e da melhor compreensão da importância de se manter a dentição decídua hígida, frequentemente, ocorre grande número de lesões cariosas profundas nos dentes decíduos, com comprometimento pulpar. Além disso, lesões traumáticas, principalmente nos dentes anteriores, apresentam uma prevalência elevada. A conservação dos dentes decíduos com alterações pulpares provocadas por lesão de cárie ou por traumatismo é um grande desafio terapêutico (CORRÊA et al., 2011).

A terapia pulpar em dentes decíduos visa à manutenção do elemento dentário assim como a preservação da saúde da criança (GARCIA-GODOY, 1987). Sempre que o tecido pulpar torna-se irreversivelmente infectado, ou quando ocorre necrose, em decorrência de cárie ou traumatismo dental, a terapia pulpar dos dentes decíduos é indicada (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY, 2009). O tratamento endodôntico de dentes decíduos visa o reparo dos tecidos apicais e periapicais, levando a manutenção da integridade do germe dentário permanente (PINTO et al., 2011).

Não há consenso na literatura sobre o melhor material obturador a ser utilizado na endodontia de dentes decíduos e não existe um material único que preencha todos os requisitos desejáveis para um material obturador. Idealmente este material deveria ser reabsorvível, radiopaco, bactericida, promover adequado preenchimento e aderência às paredes dos canais radiculares, ser facilmente removido quando necessário; além de não provocar dano aos tecidos periapicais e ao germe do dente permanente, e tampouco alteração da coloração das estruturas

dentárias (FUKS, 2000, KUBOTA; GOLDEN; PENUGONDA, 1992, MASS; ZILBERMAN, 1989, MORTAZAVI; MESBAHI, 2004, PINTO et al., 2011).

A capacidade do material de ser reabsorvível é um dos principais requisitos para a sua indicação como material obturador para dentes decíduos (COULD, 1972, KUBOTA; GOLDEN; PENUGONDA, 1992). A reabsorção do material obturador deve ocorrer simultaneamente à reabsorção radicular durante a esfoliação, permitindo a normal erupção do dente permanente (RANLY, GARCIA-GODOY, 1991). Além disso, em casos de sobre-obturação, o material deve ser reabsorvível e não tóxico aos tecidos periapicais e germe do permanente.

O cimento de óxido de zinco e eugenol (OZE) foi o primeiro material a ser utilizado como obturador de dentes decíduos. Desde então, vários autores têm relatado índices de sucesso moderados a altos na preservação de dentes decíduos tratados endodonticamente com materiais à base de óxido de zinco (MASS, ZILBERMAN, 1989).

Mesmo tendo sido tradicionalmente utilizado como material obturador de canais radiculares de dentes decíduos, o OZE apresenta características indesejáveis como ser irritante para os tecidos periapicais, desencadeando reações inflamatórias de corpo estranho, nos casos de extravasamento. Apresenta baixa capacidade de reabsorção, deixando partículas de óxido de zinco e de eugenol nos tecidos periapicais quando ocorre a reabsorção fisiológica (BARJA-FIDALGO et al., 2011, FUKS; EIDELMAN, 1991, MORTAZAVI; MESBAHI, 2004, PINTO et al., 2011). Alguns autores, afirmam ainda que o OZE tem limitada ação antimicrobiana (COX; HEMBREE; MCKNIGHT, 1978, TCHAOU; TURNG; MINAH; COLL, 1996). Outro inconveniente é que, quando extravasado pelo ápice radicular, existe o risco de deflexão da erupção dos dentes permanentes devido a sua dureza (COLL; SADRIAN, 1996).

Devido à sua biocompatibilidade, natureza hidrossolúvel, e baixa solubilidade (CERQUEIRA; MELLO-MOURA; SANTOS; GUEDES-PINTO, 2008, CHAWLA; SETIA; GUPTA; GAUBA; GOYAL, 2008), as pastas à base de hidróxido de cálcio também são indicadas como material obturador de canais radiculares de dentes decíduos. São também propriedades benéficas do hidróxido de cálcio sua atividade antimicrobiana, devido à dissociação iônica dos íons cálcio e hidroxila (FAVA;

SAUNDERS, 1999, QUEIROZ et al., 2009, RANLY; GARCIA-GODOY, 2000), capacidade de indução de formação de tecido mineralizado, ativação da fosfatase alcalina e síntese de colágeno, além da capacidade de produzir a hidrólise da endotoxina bacteriana (DE SOUZA, 2009, MIZUNO; BANZAI, 2008, SCHRODER, 1985, SILVA et al., 2008, QUEIROZ et al., 2009).

Um material à base de hidróxido de cálcio disponível no mercado é a pasta Calen (S.S. White, Artigos Dentários, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), o qual apresenta o polietilenoglicol 400 como veículo. Este veículo viscoso permite a dissociação mais lenta dos íons hidroxila, diminuindo significativamente a velocidade de solubilização da pasta. A pasta Calen tem sido utilizada na dentição permanente, em procedimentos de apicificação, tratamento de lesões periapicais originadas de canais radiculares infectados, como medicação entre sessões de pulpectomia, em casos de periodontite apical aguda e em retratamentos endodônticos, após falhas de intervenção cirúrgica e não cirúrgica (FAVA; SAUNDERS, 1999). Em dentes decíduos, a pasta Calen é indicada como um material obturador devido à sua boa tolerância do tecido, natureza hidrossolúvel (viscoso) e baixa solubilidade (RANLY; GARCIA-GODOY, 2000). Alguns autores têm sugerido a adição de óxido de zinco à pasta Calen, o qual melhora ainda mais a consistência do material, e auxilia na redução da velocidade de fagocitose do material (FAVA; SAUNDERS, 1999, QUEIROZ et al., 2009). Esta propriedade torna-se vantajosa na obturação de dentes decíduos uma vez que a reabsorção do material obturador deve acompanhar a reabsorção fisiológica das raízes dos dentes decíduos (QUEIROZ et al., 2009, SILVA et al., 2010).

As pastas de hidróxido de cálcio vêm sendo utilizadas ainda em associação com iodofórmio, para obturação de dentes decíduos. Diversos estudos têm demonstrado que estes materiais são facilmente reabsorvidos na região periapical em caso de extravasamento, e não causam reação de corpo estranho ou têm qualquer efeito indesejável sobre dentes permanentes (CERQUEIRA; MELLO-MOURA; SANTOS; GUEDES-PINTO, 2008, MATHEWSON; PRIMOSCH, 1995, MCDONALD; AVERY; DEAN, 2000). Além disso, os materiais contendo iodofórmio em sua composição apresentam uma atividade antibacteriana satisfatória (CERQUEIRA; MELLO-MOURA; SANTOS; GUEDES-PINTO, 2008, MATHEWSON; PRIMOSCH, 1995, MCDONALD; AVERY; DEAN, 2000).

Dentre esses, o Vitapex (Neo Dental International Inc., Federal Way, WA, Estados Unidos), material na forma de pré-mistura de hidróxido de cálcio e iodofórmio, é tido como quase ideal para obturação de dentes decíduos (KUBOTA; GOLDEN; PENUGONDA, 1992). No entanto, como desvantagem, apresenta a rápida eliminação de iodofórmio pelo organismo, deixando espaços vazios no interior do canal radicular, o que pode comprometer o sucesso do tratamento endodôntico (KUBOTA; GOLDEN; PENUGONDA, 1992). Além disso, o uso de pastas iodoformadas pode provocar discoloração marrom-amarelada na coroa dentária, comprometendo a estética (GARCÍA-GODOY 1987). O potencial tóxico do iodofórmio, em contato com os tecidos vivos é considerado outra limitação do uso desse material (BARJA-FIDALGO et al., 2011, SILVA et al., 2010).

No Brasil a pasta iodoformada denominada Pasta Guedes-Pinto, tem sido o material obturador de escolha de grande parte das Faculdades de Odontologia (Kramer et al. 2000). A pasta Guedes-Pinto consiste na associação de Rifocort, Paramonoclorofenol e Iodofórmio. A correta proporção deve ser: 23.8% de Rifocort, 7.0% de Paramonoclorofenol e 69.2% de iodofórmio (MELLO-MOURA et al., 2011). Segundo Cerqueira et al. (2008) a pasta Guedes-Pinto é biocompatível, bem tolerada pelos tecidos periapicais e possui efeito bactericida e bacteriostático. A manipulação do material é uma das suas desvantagens, pois alterações na proporção dos componentes podem provocar modificações nas propriedades biológicas, além de aumentar toxicidade do material (MELLO-MOURA et al., 2011).

Atualmente, está se desenvolvendo um material à base de MTA (Mineral Trioxide Aggregate), para obturação dos canais radiculares de dentes decíduos. O MTA Kids encontra-se pronto para o uso, e segundo o fabricante, apresenta requisitos desejáveis para ser considerado um material obturador de dentes decíduos. Possui ação antibacteriana e anti-inflamatória, é reabsorvível, biocompatível, radiopaco e indutor de calcificação. Além disso, não causa manchas na estrutura dentária e pode ser removido facilmente, se necessário.

O presente estudo justifica-se por objetivar a avaliação das propriedades deste novo material obturador de dentes decíduos, à base de MTA, a ser em breve, lançado no mercado odontológico. Os testes *in vitro* são ensaios preliminares indispensáveis para o desenvolvimento de novos materiais odontológicos, já que buscam simular, em laboratório, condições biológicas mais próximas das reais, fornecendo aos pesquisadores, princípios a serem estudados posteriormente.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

Avaliar propriedades físico-químicas e biológicas de um novo material obturador de canais radiculares de dentes decíduos (MTA Kids, Angelus, Londrina, PR, Brasil) comparativamente a outros materiais obturadores de dentes decíduos.

2.2.2 Objetivos específicos

2.2.2.1 Avaliar “in vitro” a atividade antimicrobiana dos materiais sobre uma cepa de *Enterococcus faecalis*, através do teste de contato direto;

2.2.2.2 Avaliar “in vitro” as alterações de pH dos materiais obturadores de dentes decíduos com e sem a adição de dentina em pó;

2.2.2.3 Avaliar “in vitro” a liberação de íons hidroxila e a difusão em dentina do MTA Kids;

2.2.2.4 Avaliar “in vitro” a radiopacidade dos materiais obturadores de dentes decíduos.

2.3 Metodologia

2.3.1 Materiais a serem testados

Os materiais obturadores utilizados nesse estudo serão: cimento de óxido de zinco e eugenol, Pasta Calen espessada com óxido de zinco, Pasta Guedes-Pinto, Vitapex' e MTA Kids. Os materiais serão manipulados de acordo com as instruções dos fabricantes. A composição dos materiais está descrita na (Tabela 1).

Tabela 1- Composição dos materiais obturadores testados

Material	Fabricante	Composição
Cimento de óxido de zinco e eugenol	Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil	Pó: Óxido de Zinco Líquido: Eugenol, ácido acético glacial
Pasta Calen espessada com óxido de zinco	S.S. White, Artigos Dentários, Rio de Janeiro, RJ, Brasil	2.5 g Hidróxido de cálcio, 0.5 g Óxido de zinco, 0.05 g Colofônia, e 1.75 ml Polietilenoglicol 400 (veículo).A pasta Calen será espessada misturando 1.0 g da pasta com 1.0 g de óxido de zinco sobre uma placa de vidro.
Vitapex	Neo Dental International Inc,Federal Way, WA, Estados Unidos	30% Hidróxido de cálcio, 40.4% Iodofórmio, 22.4% Óleo de silicone, 6.9% inerte.
Pasta Guedes-Pinto		23.8% de Rifocort®, 7.0% de Paramonoclorofenol e 69.2% de iodofórmio
MTA Kids	Angelus, Londrina, PR, Brasil	Trióxido Mineral Agregado (MTA), Tungstato de Cálcio, Polietilenoglicol, Glicerina, Óxido de Silício e Silicone.

2.3.2 Teste antimicrobiano

A avaliação do potencial antimicrobiano dos materiais obturadores será baseada na metodologia proposta por Quah et al. (2012). Todas as etapas experimentais serão realizadas nos Laboratórios de Microbiologia da Universidade Federal de Pelotas. Os procedimentos microbiológicos serão realizados sempre em condições assépticas, em capela de fluxo laminar previamente desinfetada com Isopropanol 17,2%.

A avaliação da ação antibacteriana das soluções por meio do teste de contato direto será feita utilizando-se uma cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC29212). O *E. faecalis* é um microrganismo anaeróbio facultativo, facilmente cultivado, de alta relevância clínica e com capacidade de se estabelecer e sobreviver na ausência de outras bactérias e sobre stress. A escolha do *E. faecalis* ocorreu uma vez que este é um microrganismo comumente isolado em infecções endodônticas resistentes ao tratamento endodôntico. O *E. faecalis* é isolado com frequência em culturas puras, em casos de dentes com necrose pulpar e lesão periapical persistente. Além disso, diversos estudos têm demonstrado a resistência

do *E. faecalis* ao hidróxido de cálcio, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, além de maior resistência que outras espécies a agentes antibacterianos como o hipoclorito de sódio (MOLANDER et al., 1998, SIQUEIRA; RÔÇAS, 2004, SEDGLEY et al., 2006). Para os experimentos, serão utilizadas subculturas de *E. faecalis* em placas de TSA (Tryptic Soy Agar, Difco, MI, EUA) resgatadas após pernoite. A cultura será realizada em estrias para obtenção de colônias isoladas e para verificação da pureza do material será realizada cultura em meio bili-esculina-agar, específico para *E. faecalis*.

No momento do teste de susceptibilidade do *E. faecalis* (ATCC 29212) aos materiais, será preparada uma suspensão bacteriana em água filtrada e esterilizada, com concentração igual a $3,2 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de suspensão. O ajuste será feito por meio da leitura da densidade óptica da suspensão em um espectrofotômetro (Sp22 – 325 a 1000 nm, Bioespectro, Curitiba, PR, Brasil), com comprimento de onda de 405nm. A suspensão bacteriana será sempre utilizada no prazo máximo de 60 min após o ajuste da concentração.

2.3.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima

Para realização dos testes, será preparada uma suspensão dos materiais em caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Sigma) a uma concentração de 200mg/ml. A concentração inibitória mínima será determinada usando o caldo de microdiluição. Em uma placa de cultura de células de 96 poços (Nunc, Rochester, NY, Estados Unidos), contendo 100µL da suspensão dos materiais em diluição seriada, será acrescentado 100µL da suspensão bacteriana com concentração de $3,2 \times 10^7$ unidades formadoras de colônias.

A placa de cultura celular será então selada com parafilme, e incubada a 37°C por 24h, 48h, 72h e 7 dias. Será avaliada a presença de turbidez, indicativa de crescimento bacteriano, até 7 dias, quando então, 7µL de BHI de cada poço será plaqueado em Tryptic Soy Agar (TSA) com o objetivo de confirmar a leitura visual dos resultados. Como controle será utilizado água filtrada e esterilizada pura.

2.3.2.2 Avaliação da atividade antibacteriana dos materiais na presença de pó de Dentina

Dentes anteriores bovinos extraídos serão usados para a obtenção da dentina em pó. A porção cervical e apical das raízes será removida com discos de diamante, de forma a obtermos blocos de dentina com aproximadamente 5mm de comprimento. Após serem autoclavados, será utilizada uma broca largo de diâmetro #2, de forma a evitar a incorporação de restos pulpare e restos necróticos ao estoque de dentina em pó. A partir deste momento, serão utilizadas sequencialmente, brocas Largo de diâmetros #3, #4 e #5, para coleta do pó de dentina dos canais radiculares. O pó de dentina será autoclavado, e 28mg de pó será suspensa em 100µL da suspensão de materiais obturadores (Portenier et al. 2001).

As suspensões dos materiais a serem testados serão preparadas e pré-incubadas com pó de dentina por 2h antes da inoculação com a suspensão de *E. faecalis*. Após este período, 100µL de suspensão de *E. faecalis* será adicionada às suspensões de materiais contendo dentina.

A placa de cultura celular será então selada com parafilme, e incubada a 37°C por 24h, 48h, 72h e 7 dias. Será avaliada a presença de turbidez, indicativa de crescimento bacteriano, até 7 dias, quando então, 7µL de BHI de cada poço será plaqueado em TSA com o objetivo de confirmar a leitura visual dos resultados.

2.3.3 Teste de determinação de pH

A determinação do pH dos materiais será baseada na metodologia proposta por Agrafioti, Tzimpoulas e Kontakiotis, (2013), onde os testes serão realizados com e sem a presença de dentina.

Previamente à realização dos testes, a vidraria e equipamentos do laboratório serão tratados com ácido nítrico a 10% (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), evitando qualquer interferência nos resultados.

A obtenção do pó de dentina para realização do experimento será conduzida utilizando a mesma metodologia descrita para o teste antimicrobiano. A porção

cervical e apical das raízes será removida com discos de diamante, de forma a obtermos blocos de dentina com aproximadamente 5mm de comprimento. Após serem autoclavados, será utilizada uma broca largo de diâmetro #3, de forma a evitar a incorporação de restos pulpares e restos necróticos ao estoque de dentina em pó. A partir deste momento, serão utilizadas sequencialmente, brocas Largo de diâmetros #4, #5 e #6, para coleta do pó de dentina dos canais radiculares. Os materiais obturadores serão manipulados e misturados ao pó de dentina previamente autoclavado. Um total de 28mg de pó de dentina será suspenso em 100µL da suspensão de materiais obturadores (Portenier et al. 2001).

O pH será determinado em 1mL de suspensão, armazenado em tubos tipo Eppendorf plásticos e utilizando água deionizada obtida a partir de um sistema de purificação Direct – Q3 (Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos), com resistividade de 18,3 MΩ cm. Durante todo o período experimental as amostras permanecerão a 37°C em estufa incubadora (NT 705, Nova Técnica, São Paulo, Brasil). A mensuração dos valores de pH será realizada imediatamente após o preparo das suspensões, após 24h, 7 dias e 14 dias.

A determinação do pH será realizada por meio de um pHmetro (Q 400^a, Quimis®, Diadema, São Paulo, Brasil), previamente calibrado com soluções de pH conhecido (pH = 4, 7, e 14). Os testes serão realizados em triplicata.

2.3.4 Teste de liberação de íons hidroxila e difusão em dentina

A metodologia proposta por Guerreiro-Tanomaru et al. (2012) será utilizada para determinação da capacidade de liberação de íons hidroxila e difusão do material através da dentina.

Sessenta dentes bovinos serão selecionados para este estudo. As coroas serão removidas utilizando um disco de diamante. As raízes serão imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% à temperatura ambiente durante 48h e, em seguida, transferidas para a água destilada. Os canais radiculares serão preparados um milímetro aquém do comprimento radicular, com limas tipo K (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) até o diâmetro #110. O terço cervical dos canais radiculares (até 10 mm) será preparado com uma broca Gates-Glidden de diâmetro #5 (Dentsply-

Maillefer, Ballaigues, Suíça). Os canais radiculares serão irrigados durante todo o preparo biomecânico com 5 ml de solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (Instituto de Química, Araraquara, UNESP - Brasil), sendo utilizados 2ml de solução a cada troca de lima. Para a remoção da smear layer, EDTA 17% (Odahcam Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) será aplicado nos canais radiculares durante três minutos, ao final do preparo. Em seguida, os canais radiculares serão irrigados com 5ml de soro fisiológico.

Uma cavidade com 4mm de comprimento, 2mm de largura e 0,5mm de profundidade será preparada na superfície proximal de cada raiz entre 5mm e 9mm do ápice da raiz, com uma broca #1052 (KG Sorensen Ind. e Com. Ltda., São Paulo, Brasil) acionada em alta-rotação. Cada raiz será radiografada e as cavidades medidas, para assegurar que todas as amostras tenham uma espessura semelhante da dentina entre o preparo da cavidade e a parede do canal radicular.

Antes do preenchimento dos canais com os materiais obturadores, os dentes serão armazenados em um frasco contendo água destilada por 14 dias a 37°C para verificar possíveis mudanças iônicas da estrutura dental. Após este período, as amostras serão removidas dos frascos e secas, e em cada superfície externa de raiz se tornará impermeável e para tal, será aplicada uma camada de resina epóxi (Brascola, Joinville, SC, Brasil) complementado com esmalte de unhas, exceto na cavidade preparada.

Nas amostras do grupo 6 (controle) as raízes serão impermeabilizadas como nos grupos experimentais, porém os canais radiculares não serão preenchidos com material obturador. As amostras no grupo 7 (controle) receberão impermeabilização completa, inclusive na cavidade preparada e serão preenchidas com cimento de óxido de zinco e eugenol. Após a secagem da camada de impermeabilização, as raízes serão aleatoriamente divididas em cinco grupos e os canais radiculares serão preenchidos com os materiais obturadores para canais radiculares de dentes decíduos conforme (Tabela 2).

A partir do preenchimento dos canais radiculares, as cavidades coronárias serão seladas com material restaurador provisório (Coltosol, cimento de óxido de zinco provisório, Vigo-dente, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e serão impermeabilizadas seguindo os procedimentos já descritos. As amostras serão imersas em frascos com

tampa (JProlab, São José dos Pinhais, PR, Brasil) contendo 10 ml de água destilada, que serão selados e mantidos a 37°C. Após períodos de 1, 3, 7, 14, 21, 30, e 60 dias, o pH da água contida em cada frasco será medido com um pHmetro (Q 400^a, Quimis®, Diadema, SP, Brasil), previamente calibrado com soluções de pH conhecido (pH = 4, 7, e 14). Os testes serão realizados em triplicata.

Tabela 2- Distribuição dos grupos experimentais

Grupo	n	Material	Fabricante
I	10	MTA Kids	Angelus®, Londrina, PR, Brasil
II	10	Pasta Calen espessada com óxido de zinco	(S.S. White Art. Dent. Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil)
III	10	Vitapex	Neo Dental International Inc, Federal Way, WA, Estados Unidos
IV	10	Cimento de óxido de zinco e eugenol	Biodinâmica, Ibiaporã, PR, Brasil
V	10	Pasta Guedes-Pinto	
VI	5	Controle, sem material obturador	
VII	5	Completamente impermeabilizado, e preenchido com o mesmo material utilizado no grupo IV	

2.3.5 Teste de radiopacidade

Após o preparo dos materiais, conforme instruções do fabricante, os materiais obturadores serão acomodados em um molde de polycarbonato (10mm de diâmetro e 1mm de espessura). Um bloco de dentina bovina servirá como controle de forma que haja a clara distinção entre material e o tecido circundante em situações clínicas (MOHN et al., 2010).

Todos os espécimes serão radiografados, e aqueles com bolhas (materiais obturadores), ou linhas de fratura (blocos de dentina), serão descartados e substituídos. Os espécimes serão então posicionados sobre um filme radiográfico oclusal (Insight; Eastman-Kodak Co, Rochester, NY, Estados Unidos) e expostos juntamente com uma escala de alumínio com espessura variada, de 2 a 16mm, com incrementos de 2mm. Será utilizada uma unidade de raio-X (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil), operando a 60 kV, 10 mA, com 0,3 segundos de exposição e

distância focal de 30cm. Após o processamento radiográfico, as radiografias serão digitalizadas em scanner radiográfico (ScanMaker, 9800XL, 48 bits; 3200×1600 dpi; 12"×17" tabloid size; USB & SCSI-2, Microtek, USA) e as imagens serão importadas para o software Digora for Windows versão 1.51 (Orion Corporation Soredex, Helsinki, Finlândia).

O valor da radiopacidade será determinado em densidade radiográfica, que será convertida em milímetros de alumínio (mm Al). A conversão será realizada determinando-se a densidade radiográfica correspondente a cada milímetro de alumínio, de acordo com cada intervalo entre os milímetros, isto é, entre 1 e 2, 2 e 3, 3 e 4, etc. Para se obter o valor de cada material, será observado em qual intervalo ele estava, ou seja, se o valor da sua densidade estava entre, por exemplo, o intervalo 4 e 5, 5 e 6, etc. A cada intervalo o 1 mm corresponde a valores distintos; por exemplo, a diferença entre o 4 e 5 é $16,83 (5) = 162,07 - (4) = 145,24$ e entre 5 e 6 é $14,39 (6) = 176,46 - (5) = 162,07$. Assim se, por exemplo, quando a densidade do material apresentar o valor entre 5 e 6, o cálculo será realizado da seguinte maneira: do valor da densidade do material será subtraído o valor correspondente a 5mm de alumínio, essa diferença será convertida em milímetros de alumínio utilizando-se para o cálculo a fórmula proposta por Duarte et al., (2009):

$$A \times 2/B + \text{mmAl imediatamente abaixo RDM}$$

A = densidade radiográfica do material (RDM) – densidade radiográfica do passo do alumínio imediatamente abaixo RDM;

B = densidade radiográfica do passo do alumínio imediatamente acima da RDM – densidade radiográfica do passo do alumínio imediatamente abaixo RDM;

2 = 2-mm incremento entre um passo e outro do alumínio.

Em conformidade com a especificação da ISO 6876 (2001), a radiopacidade do material deverá ser igual ou superior a radiopacidade de 3 mm de alumínio.

2.4 Orçamento

Material	Quantidade	Valor Unitário	Valor total
Luva	3 cx	R\$15, 00	R\$45,00
Gorro	1 cx	R\$7,79	R\$7,79
Máscara	1 cx	R\$11,99	R\$11,99
Pasta Calen	5 un	R\$43,90	R\$219,5
Vitapex	5 un	R\$100,00	R\$500,00
Óxido de zinco 50g	2 un	R\$ 5,23	R\$10,46
Eugenol	2 un	R\$ 10,92	R\$21,84
Hipoclorito de sódio 2,5%	1 l	R\$13,30	R\$13,30
EDTA 17%	1 un	R\$8,08	R\$8,08
Ácido nítrico 10%	1 un	R\$43,00	R\$43,00
Limas tipo K	1 un	R\$ 35,00	R\$35,00
Meio de cultura BHI – Brain Heart Infusion	1 un	R\$209,00	R\$209,00
Isopropanol 17,2%	1 l	R\$17,75	R\$17,75
Meio de cultura TSA- Tryptic Soy Agar	1 un	R\$209,70	R\$209,70
Meio de cultura - Bili- esculina- agar	1 un	R\$376,60	R\$376,60
Rolo de parafilme	1 un	R\$83,75	R\$83,75
Disco de diamante	1 un	R\$25,00	R\$25,00
Gates Glidden (#1, #2, #3, #4)	1 un	R\$ 68,77	R\$68,77
Broca largo (#1, #2, #3, #4)	1 un	R\$10,48	R\$10,48
Película radiográfica	1 cx	R\$166,22	R\$166,22
Soro fisiológico	1 l	R\$1,15	R\$1,15
Vidraria	-	R\$250,00	R\$250
Placa de cultura células 96 poços	10 un	R\$4,90	R\$49,00
Ponteiras para pipeta(diversos tamanhos)	-	R\$200,00	R\$200,00
Broca 1052	2 un	R\$4,90	R\$9,80
Coltosol	1 un	R\$17,23	R\$17,23
TOTAL			R\$2.610,41

3 Relatório do Trabalho de campo

Neste capítulo estão relatadas as complementações e as mudanças ocorridas no planejamento e execução dos experimentos desta pesquisa.

3.1 Objetivos específicos

3.1.1 A avaliação da alteração de pH dos materiais obturadores de dentes decíduos foi realizada apenas sem a adição de pó de dentina, pela dificuldade de obtenção de dentina de dentes decíduos seguindo as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPel.

3.1.2 O teste de liberação de íons hidroxila e difusão em dentina do material experimental à base de MTA não foi realizado conforme acordado durante o exame de qualificação, onde os professores da banca sugeriram que esta metodologia não apresenta reprodutibilidade adequada, e não fornece resultados precisos.

3.2 Material e métodos

3.2.1 No teste de radiopacidade não se utilizou o cálculo proposto por Duarte et al. 2009 para a medição da densidade dos materiais e sim a metodologia proposta por Carvalho et al. (2007).

3.2.2 No teste antimicrobiano foram realizadas alterações nas quantidades pipetadas da suspensão de materiais e da suspensão bacteriana. Os tempos experimentais foram 1h, 4h, 12h e 24h. Além disso, a atividade antibacteriana dos materiais na presença de pó de dentina não foi avaliada pela dificuldade de obtenção de dentina de dentes decíduos seguindo as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPel.

3.2.3 A mensuração dos valores de pH foi realizada nos seguintes tempos: 1h, 4h, 12h, 24h, 3d, 7d, 15d, 30d.

3.2.4 A pasta Guedes-Pinto não foi incluída nos testes devido a dificuldade de se encontrar um dos componentes da pasta (Rifocort®) no mercado. Além disso,

este se trata de um material utilizado exclusivamente no Brasil, não sendo amplamente divulgado em publicações internacionais. O grupo de pesquisadores envolvidos neste projeto está realizando, em paralelo, ensaios físico-químicos e biológicos apenas com materiais nacionais utilizados para obturação de dentes decíduos.

3.2.5 Na redação da dissertação passamos a denominar o MTA Kids de material experimental a base de MTA, já que esse nome é considerado provisório pelo fabricante e ainda não houve lançamento deste material no mercado, pela empresa Angelus.

3.2.6 A biocompatibilidade dos materiais obturadores de canais radiculares de dentes decíduos em tecido subcutâneo de ratos foi sugerida pela banca durante a qualificação, no entanto, não foi concluída. O estudo está na fase de análise histológica, não sendo possível incluir este artigo na dissertação final.

3.3 Metodologia adicionais

3.3.1 A biocompatibilidade dos materiais obturadores de canais radiculares de dentes decíduos foi avaliada usando o teste de citotoxicidade com ensaio MTT, por ser um teste primário importante para avaliação de materiais.

3.3.2 Foi avaliado o efeito antimicrobiano dos materiais obturadores de canais radiculares de dentes decíduos sobre biofilmes mistos, adicionalmente ao teste do contato direto, por representar uma metodologia que simula as condições in vivo de forma mais adequada.

3.3.3 No teste em que se avaliou o efeito antimicrobiano dos materiais obturadores de canais radiculares de dentes decíduos sobre o biofilme misto, não foi possível incluir o material experimental à base de MTA. Após o contato durante os períodos experimentais, o material ficou grudado no biofilme e ao realizarmos a remoção, acabou-se removendo o biofilme mecanicamente. Não foi possível repetir essa metodologia, pois sua execução foi realizada na University of British Columbia (Vancouver, Canadá) e não houve tempo hábil.

3.4 Cronograma de atividades

Houve alteração na data da defesa da dissertação devido à falta de uma disciplina obrigatória.

4 Artigos

4.1 Artigo 1

TITLE PAGE

TITLE

Antimicrobial effect, pH and radiopacity of a new experimental MTA-based endodontic filling material for primary teeth¹

Katerine Jahnecke Pilownic^{*}; Luiza Helena Silva Almeida^{*}; Renata Dornelles Morgental^{**}; Ana Regina Romano^{**}, Fernanda Geraldo Pappen^{**}

^{*} Postgraduate student, Dental School, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

^{**}Department of Semiology and Clinics, Faculty of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author:

Katerine Jahnecke Pilownic

Address: Graduate Program in Dentistry – Federal University of Pelotas
– R. Gonçalves Chaves, 457, 5th floor, Pelotas, RS, Brasil. CEP: 96015-560.

Phone./Fax: +55-53-3222-6690 r. 135

E-mail: katerinejahnecke@yahoo.com.br

Summary

Background A new experimental ready-to-use MTA- based root filling material for primary teeth has been developed. The main properties of dental materials must be tested in vitro before being considered for clinical use.

Aim The aim of this study was to evaluate radiopacity, pH and antimicrobial effect of an experimental MTA- based material.

Design Zinc oxide and eugenol cement (ZOE); Vitapex; Calen paste thickened with zinc oxide were evaluated comparing with experimental MTA-based material. The radiopacity of materials was compared to graduated aluminum stepwedge ranging from 0.5 to 5 mm using a digital sensor with a standardized focal distance and exposure time. The measurement of pH was performed in experimental periods of 1h, 4h, 12h, 24h, 3d, 7d, 15d and 30d. The antimicrobial capacity of the materials was assessed using the direct exposure test against *Enterococcus faecalis*. Bacteria and material suspensions were mixed in equal volumes. After incubation for 1 h, 4 h, 12 h and 24 h, droplets from ten-fold serial dilutions were cultured on agar plates, and the number of CFU/ml was calculated. All experiments were performed in triplicate.

Results The results showed that the experimental MTA presented 3.28 mmAl, but was statistically lower than the values presented by the other materials ($p < 0.05$). Experimental MTA- based material and Calen thickened with zinc oxide had pH > 12 while the ZOE and Vitapex had lower values. After 4 hours of exposure, experimental MTA- based material killed *E. faecalis* effectively. All materials had significantly lower bacterial counts when compared to the control group in all experimental times, indicating substantial antimicrobial efficacy of the root filling materials.

Conclusion It was concluded that experimental MTA-based material exhibits acceptable pH, radiopacity and antimicrobial activity.

Key-words: Primary teeth. Root canal. Endodontics. Root canal obturation.

Introduction

The antimicrobial activity of endodontic filling materials is an essential property of filling materials to avoid contamination during the manipulative phase of endodontic therapy and to inhibit the growth of microorganisms and thus prevent failure of root canal therapy. The ideal biomechanical endodontic treatment for the root canals of primary teeth is hard to achieve due to their fenestrated and tortuous nature. Therefore, in this case, endodontic filling materials must be strongly antiseptic.^{1,2} An ideal root canal filling material for primary teeth have to attend criteria other such as to resorb in the same velocity of the physiological resorption, and to flow in to the complex anatomy of primary root canals³.

Zinc oxide (ZO) and zinc oxide eugenol (ZOE) have been widely used in the primary dentition.^{1,2} Nevertheless, due to their irritating potential^{4,5} and low resorption capacity⁵ the use of these materials have been substituted by iodoform containing materials, or calcium hydroxide pastes, because of their recognized antibacterial activity, biocompatibility and easy resorption.^{4,5,6} It also have been suggested the use of associations of zinc oxide and calcium hydroxide^{7,8} as well as calcium hydroxide and iodoform^{4,6}, in order to improve the rates of success in root canal therapy of primary teeth.

Recently, a new experimental ready-to-use MTA-based root filling material for primary teeth has been developed (Angelus, Londrina, PR, Brazil). According to the manufacturer, the experimental material has in its composition mineral trioxide aggregate (MTA), calcium tungstate, polyethylene glycol, glycerin, silicate oxide e silicon.

This study was undertaken to evaluate the radiopacity, the pH and the antimicrobial capacity of this experimental MTA-based material, in comparison to other root canal filling materials for primary teeth.

Material and Methods

Root filling material

The materials tested were the new experimental ready-to-use MTA based root filling material (Angelus, Londrina, PR, Brazil); zinc oxide and eugenol cement (ZOE) (S.S.White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brazil); Vitapex (Neo Dental International Inc, Federal Way, WA, USA) a premixed calcium hydroxide and iodoform paste; 1.0 g of Calen (S.S.White Artigos Dentários Ltda.), a premixed calcium hydroxide and polyethylene glycol-based paste thickened with 1.0 g zinc oxide (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Ibiporã, PR, Brazil). Suspensions of materials in sterile water were prepared at concentrations of 100mg/mL.

Bacteria

A strain of *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) was used. It was cultured and overnight incubated in air at 37°C on Tryptic Soy Agar (TSA; Becton, Spark, MD, USA) plates for the experiments. After checking for purity, *E. faecalis* was suspended in sterile water and adjusted to a density of $3,2 \times 10^7$ colony-forming units (CFU)/mL by using a spectrophotomete (Sp22 – 325 a 1000 nm, Bioespectro, Curitiba, PR, Brasil) at 405 nm. The bacterial suspension was used within 60 min after concentration adjustment.

Antimicrobial efficacy of root filling materials.

The direct contact test (DCT) was used to assess the antimicrobial effect of the root filling materials. Bacterial suspensions were mixed with materials suspensions in equal volumes (500 µl). Sterile water without any material served as a positive control. After incubation at room temperature for 1 hour, 4 hours, 12 hours and 24 hours, the mixtures were five-fold serial diluted. Droplets of 20µl from the mixtures were cultured on TSA plates. The survival of the bacteria in solutions was assessed after incubation for 24 hours at 37 °C, when colonies on the plates were counted and the CFU/ml was calculated. ANOVA e Tukey tests were applied ($p = 0.05$). All experiments were performed in triplicate.

pH level Measurement

Suspensions of materials were prepared at a concentration of 100 mg/mL. The pH was determined in 4 mL of the suspension stored in a 10ml BD Falcon test tube with stopper using deionized water (Nalgene®, Brand Products, Rochester, NY, USA). Samples were stored in closed tubes for eliminating the effects of environmental factors until the measurement time. Before measurements, the suspensions were mixed by vortexing for 30 seconds. The pH values were assed immediately after preparation of materials, 1h, 4h, 12h, 24h, 3d, 7d, 15d, and 30d. The pH value was measured with a pHmeter (Symphony SB7OP VWR Internacional, Radnor, Pensylvania, USA) previously calibrated with pH 4.0, 7.0 e 10.0 standard solutions. Distilled water was used as control. All measurements were performed in triplicate.

Digital radiography

Acrylic plates (2.2 cm x 4.5 cm x 1 mm), containing wells measuring 1 mm in depth and 5 mm in diameter were used to standardize the materials samples. Each of the wells was filled with one of the materials. Thereafter, the specimens were placed on a digital radiographic sensor (Vista Scan Plus, Dür Dental AG, Bietigheim-Bissingen, Germany) next to a graduated aluminum stepwedge with thickness ranging from 0,5 to 5mm (in 0,5 mm-increments) and exposed using a Timex 70C x-ray unit (Gnatus Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brazil) operating at 70 kv, 8 mA. The exposure time used was 0.2 s, and focus-film distance of 40 cm. The obtained images were imported into the Adobe Photoshop 12.0.4 software (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA).

The radiographic density values obtained were converted into mmAl. The equal-density tool of this software was used to identify areas of equal density, allowing comparison between the radiographic density of materials and the radiopacity of different thicknesses of the aluminum step-wedge. The area corresponding to the specimen was selected in each radiographic image and the software determined which thickness of the aluminum step-wedge was equivalent to the specimen's radiographic density. This assessment determined the radiopacity of the selected material compared to a particular thickness of aluminum, measured in millimeters. Results were analyzed by calculating the means of 5 measurements *per* sample. Data were submitted to statistical analysis using ANOVA and Tukey ($p = 0.05$).

Results

The results of the DCT are shown in Table 1. Experimental MTA killed *E. faecalis* effectively after 4 hours of exposure. After 24 hours of exposure, all the tested materials eliminated more than 98% of *E. faecalis*.

The pH of the experimental MTA was similar to the Calen paste thickened with zinc oxide ranging from 12.8 to 11.2 in different moments. The Vitapex showed the least variation ranging from 8.4 to 7.9. The ZOE pH levels increased with time increased. After 30 days, experimental MTA had the high pH level and Vitapex had the lowest pH level. Table 2 shows the average pH values according to the experimental periods for each material tested.

The radiopacity values are presented in Table 3. Vitapex and ZOE presented the highest radiopacity values among the tested materials ($p < 0.05$), equivalent to 8.85 mm Al and 8.64 mm Al, respectively. Experimental MTA presented the lowest radiopacity values ($p < 0.05$), ranging from 3.07 to 3.45 mmAl.

Discussion

The use of endodontic filling materials with antibacterial activity is considered beneficial in the effort to further reduce the number of remaining microorganisms in the endodontic space. The ideal biomechanical endodontic treatment for the root canals of primary teeth is hard to achieve due to their anatomical features and to difficulties in obtaining a good radiographic view of the apex for determining the working length.³ This study evaluated some

properties that should be considered for a suitable endodontic material for primary teeth.

Several studies have evaluated the antimicrobial efficacy of primary root canal filling materials, however most of them still apply the agar diffusion test (ADT).^{1,2,9} Frequently, the results of such studies are not reliable, since the inhibition zones may be more related to the materials' solubility and diffusibility in agar than to their actual efficacy against the microorganisms.¹⁰ On the contrary, the DCT measures the effect of direct and close contact between the organisms and the material.¹¹ In the present study, the DCT method was based on the study of Zhang et al. 2009 in such a way that plating was done immediately after each time of contact.¹² This modification, together with controls for carryover, makes it possible to measure the bactericidal effect instead of bacteriostatic effect of the materials. It also allows calculating the exact numbers of surviving bacteria after each contact time.

Enterococcus faecalis is often used in research that aims to evaluate the antimicrobial properties of endodontic materials because of its resistance to some medicaments and its ability to survive conventional root canal therapy.^{12,13} *E. faecalis* can compete with other microorganisms and adapt to adverse conditions, such as nutritional deprivation.¹⁴ Byström et al. 1985 reported that *E. faecalis* is a resistant bacterium in root canals, surviving at pH 11.5, but being killed at pH 12.5. In this way, a high pH value is desired for a long time period to achieve antibacterial effect.¹⁵

The present study indicates that the experimental MTA-based material has strong antibacterial effect. Calcium in its hydroxide form is the main chemical compound released by MTA.¹⁶ The antimicrobial action of

experimental MTA- based material is affected by the liberation of hydroxyl ions, given the high pH. Despite the highest value of pH for Calen thickened with zinc oxide, it showed low antimicrobial action on DCT comparing others materials. Evaluation of the pH values and the effectiveness in killing *E. faecalis*, indicate that there are factors other than pH that are more important for their antibacterial activity.¹² The traditional root filling material, ZOE presented good antibacterial effect against *E. faecalis*. These results contradict those found by using ADT.^{1,9}

Endodontic filling materials should have sufficient radiopacity to allow for a clear distinction between the materials and surrounding anatomic structures and for facilitate the evaluation of the quality of the root filling materials.¹⁷ Several studies use radiographic assessment to consider the effectiveness of root filling materials.^{4,18,19} The ISO 6876/2001 requires a minimal radiopacity equivalent to 3 mmAl for root materials (Standardization 2001).²⁰ In this study, all materials showed radiopacity above this limit. The radiopacifying agent of MTA based material is calcium tungstate and even though presenting the lowest radiopacity, it is in accordance to ISO 6876/2001.

Conclusion

Based on the results obtained from this study the experimental MTA based material showed suitable physicochemical properties although further studies evaluating the biological properties must be conduct to confirm its endodontic use for primary teeth.

References

1. Reddy S, Ramakrishna Y. Evaluation of antimicrobial efficacy of various root canal filling materials used in primary teeth: a microbiological study. *J Clin Pediatr Dent* 2007; 31:193-198.
2. Hegde S, Lala PK, Rao B D, AB S. An in vitro evaluation of antimicrobial efficacy of primary root canal filling materials. *J Clin Pediatr Dent* 2012; 37: 59-64.
3. Özalp N, Saroglu I, Sönmez H. Evaluation of various root canal filling materials in primary molar pulpectomies: an in vivo study. *Amer J Dent*.2005;18:347-350.
4. Mortazavi M, Mesbahi M. Comparison of zinc oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 2004; 14: 417–424.
5. Ranly DM, Garcia-Godoy F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. *J Dent* 2000; 28: 153–161.
6. Huang TH, Ding SJ, Kao CT. Biocompatibility of various formula root filling materials for primary teeth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;80:486-90.
7. Chawla HS, Mathur VP, Gauba K, Goyal A. A mixture of Ca(OH)₂ paste and ZnO powder as a root canal filling material for primary teeth: a preliminary study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2001; 19: 107-109.
8. Queiroz AM, Nelson-Filho P, Silva LA, Assed S, Silva RA, Ito IY. Antibacterial activity of root canal filling materials for primary teeth: zinc oxide and eugenol cement, Calen paste thickened with zinc oxide, Sealapex and EndoREZ. *Braz Dent J* 2009; 20:290-296.
9. Tchaou WS, Turng BF, Minah GE, Coll JA. Inhibition of pure cultures of oral bacteria by root canal filling materials. *Pediatr Dent* 1996; 18:444-449.
10. Editorial Board of the Journal of Endodontics. Wanted: a base of evidence. *J Endod*. 2007; **33**:1401-1402.

11. Weiss E, Shahlav M, Fuss Z. Assessment of antimicrobial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endod Dent Traumatol* 1996;12:179–184.
12. Zhang H, Shen Y, Ruse D, Haapasalo M, Antibacterial Activity of Endodontic Sealers by Modified Direct Contact Test Against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2009; 35:1051-1055.
13. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson, TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006;32: 93–98.
14. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Oral Biol Med* 2004;15: 308–320.
15. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985; 1:170-175.
16. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005;31:97-100.
17. Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, et al. Radiopacity of root filling materials using digital radiography. *Int Endod J* 2007; 40:514–520.
18. Trairatvorakul C, Chunlasikaiwan S. Success of pulpectomy with zinc oxide-eugenol vs calcium hydroxide/iodoform paste in primary molars: a clinical study. *Pediatric Dentistry* 2008; 30: 303–308.
19. Pinto DN, Sousa DL, Rocha RB et al. Eighteen-month clinical and radiographic evaluation of two root canal-filling materials in primary teeth with pulp necrosis secondary to trauma. *Dent Traumatol* 2011; 27: 221–224.
20. International Organization for Standardization. ISO 6876: Dental Root Canal Sealing Materials. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization;2001.

Table 1 – Mean percentage and standard deviation of *E. faecalis* survival after incubation with the tested materials at different experimental times.

Material	1h	4h	12h	24h
Calen+ZO	15.49±6.77 ^a	15.36±1.82 ^{ab}	13.85±18.49 ^b	1.79±.020 ^d
Experimental MTA	27.20±4.96 ^{ab}	0.03±0.02 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
ZOE	44.67±2.35 ^{bc}	45.53±5.61 ^{bc}	1.89 ±2.25 ^a	0.21±0.02 ^b
Vitapex	62.34±32.70 ^c	48.77±20.78 ^c	8.92±6.69 ^b	1.40±0.18 ^c

Different letters indicate statistically significant difference between materials within experimental times. Sterile water without any material was used as control (100%).

Table 2. Mean and standard deviation of pH for the materials tested at different experimental periods.

	1h	4h	12h	1 day	3 days	7 days	15 days	30 days
MTA Kids	12,76 ± 0.10 ^c	12,80 ± 0.14 ^c	12,56 ± 0.21 ^c	12,44 ± 0.14 ^c	12,44 ± 0.45 ^c	12,30 ± 0.62 ^c	11,90 ± 1.02 ^c	11,22 ± 1.54 ^b
Calen+ZO	12,72 ± 0.05 ^c	12,75 ± 0.02 ^c	12,46 ± 0.19 ^c	12,31 ± 0.07 ^c	11,70 ± 0.49 ^b	11,30 ± 0.81 ^b	11,38 ± 0.51 ^{bc}	10,67 ± 0.91 ^b
Vitapex	8,48 ± 0.34 ^a	8,42 ± 0.42 ^a	8,21 ± 0.48 ^a	8,13 ± 0.39 ^a	8,23 ± 0.48 ^a	8,34 ± 0.45 ^a	7,98 ± 0.33 ^a	8,08 ± 0.33 ^a
ZOE	10,76 ± 0.22 ^b	10,86 ± 0.20 ^b	10,98 ± 0.16 ^b	11,53 ± 0.23 ^b	11,63 ± 0.50 ^b	11,45 ± 0.50 ^b	11,05 ± 0.72 ^b	10,85 ± 0.98 ^b

Same letters within the same period of time (column) indicate statistically similar results for the materials ($P > .05$).

Table 3. Mean and standard deviation of the radiopacity (mm Al) for the materials tested.

Material	Mean	Std. deviation	Minimum	Maximum
Calen+ ZO	7.22 ^b	.46	6.69	7.84
Experimental MTA	3.28 ^c	.12	3.07	3.45
Vitapex	8.85 ^a	.51	8.24	9.53
ZOE	8.64 ^a	.54	8.00	9.34

Different small letters indicate statistically significant difference between materials.

4.2 Artigo 2

TITLE PAGE

TITLE

Evaluation of cytotoxicity of endodontic materials for primary teeth²

Katerine Jahnecke Pilownic^{*}; Zhe Jun Wang^{**}; Ana Regina Romano^{*}; Markus Haapasalo^{**}; Fernanda Geraldo Pappen^{*}

^{*}Department of Semiology and Clinics, Faculty of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

^{**}Faculty of Dentistry, University of British Columbia, Vancouver, Canada

Corresponding author:

Katerine Jahnecke Pilownic

Address: Graduate Program in Dentistry – Federal University of Pelotas
– R. Gonçalves Chaves, 457, 5th floor, Pelotas, RS, Brasil. CEP: 96015-560.

Phone/Fax: +55-53-3222-6690 r. 135

E-mail: katerinejahnecke@yahoo.com.br

2. Formatado para o periódico *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*

Abstract: This study evaluated the cytotoxicity effect of the experimental MTA based material, and compared it with different materials used in primary root canal fillings: Zinc oxide and eugenol (ZOE); Vitapex; and Calen paste thickened with Zinc Oxide. Cell viability was accessed in human gingival fibroblasts exposed to materials for 1, 3 and 7 days using the MTT assay using the Cell Titer 96 Assay kit. The results were analyzed using Univariate Analysis of Variance and T test, at a significance level of 95%. Fibroblast cell viability was significantly associated with the different root canal filling materials tested ($p < 0.001$), but it was not correlated with incubation time or extracts concentrations ($p > 0.05$). Cells exposed to extracts from Vitapex showed the highest viabilities at all extract concentrations, whereas cells exposed to ZOE extracts displayed the lowest viabilities ($p < 0.001$). MTA-based material and Calen paste were statistically equivalent ($p = 0.115$). The results demonstrated that Vitapex was the most biocompatible material tested. The MTA experimental based material presented adequate cytotoxicity, similar of Calen paste thickened with Zinc Oxide.

Key Words: primary teeth; biocompatibility; cytotoxicity; endodontics; root canal filling materials.

Introduction

An ideal root canal filling material for primary teeth must have several properties, such as resorption at a rate similar to that of the primary root, be harmless to the periapical tissues and permanent tooth germ, readily resorb if pressed beyond the apex, and be a strong antiseptic.^{1,2}

Zinc oxide (ZO) and zinc oxide eugenol (ZOE) have been widely used in the primary dentition as endodontic filling material.^{3,4} The adverse effects of ZOE include being irritating for the tissues and triggering inflammatory and foreign-body reactions if extruded into the periapical spaceness.^{1,2} Zinc oxide eugenol presents limited antimicrobial action and it tends to resorb at a slower rate than the roots of the primary teeth.^{3,5} When forced beyond the apex, there is a risk of deforming the eruption of teeth substitutes due to its hard.⁶

Nevertheless, the use of these materials has been substituted by iodoform containing materials, or calcium hydroxide pastes. Other studies have also suggested the use of association of zinc oxide and calcium hydroxide as well as calcium hydroxide and iodoform in order to improve the chances of success in root canal therapy of primary teeth.^{2,7-9} Iodoform pastes have better resorbability than ZOE and cause no foreign body reaction; besides it have potent germicidal properties.^{2,10} Among the beneficial properties of calcium hydroxide are its biocompatibility, antibacterial activity, induction of mineralized tissue formation and easy resorption.^{2,8,9,11,12}

Recently, a new experimental ready-to-use MTA-based root filling material for primary teeth has been developed (Angelus, Londrina, PR, Brazil). According to the manufacturer, the experimental material has in its composition mineral trioxide aggregate (MTA), calcium tungstate, polyethylene glycol, glycerin, silicate oxide e silicon.

The purpose of the present study was access in vitro the cytotoxicity of the experimental MTA-based material, by using MTT assay and to compare it with different materials used in primary root canal fillings.

Materials and methods

Materials

The materials tested were the experimental MTA- based root canal filling (Angelus, Londrina, PR, Brazil); Zinc Oxide and Eugenol cement (ZOE) (S.S.White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brazil); Vitapex, a premixed calcium hydroxide and iodoform paste (Neo Dental International Inc, Federal Way, WA, USA); Calen, a premixed calcium hydroxide and polyethylene glycol-based paste (S.S.White Artigos Dentários Ltda.), thickened with zinc oxide (ZO) (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Ibiporã, PR, Brazil) (1:1).

Cell culture preparation

Human gingival fibroblasts were obtained from previously established stocks cultured from healthy patients who underwent oral surgery.¹³ Fibroblasts of the seventh to eighth passage were used in this study. Standard protocols were followed in establishing and maintaining the cultures. The cell culture medium Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY) was supplemented with 100 µg/mL penicillin G, 50 µg/mL streptomycin, 0.25 µg/mL Fungizone, and 10% fetal bovine serum (Gibco).

Cytotoxicity Assay

The root canal filling materials specimens were prepared under aseptic conditions. Rubber molds were used to shape the samples into disks of 10 mm in diameter and 3 mm thick. Three samples of each material were prepared and exposed to ultraviolet light for 20 minutes on each surface to ensure sterility and transferred into 24 well tissue culture plates containing 1 mL DMEM per well. The surface area to volume ratio used for extract preparation was about 250 mm²/mL in accordance with ISO standard 10993-5. One milliliter of extract was drawn from each well after incubation at 37°C and 100% relative humidity for 24 hours. Each extract was divided into 6 aliquots to obtain 5 parallel experimental groups and 1 background group. Extracts were serially diluted 1:1 with DMEM to achieve a total of 5 concentrations of each extract. DMEM without the materials incubated for 24 hours was used as control.

Human gingival fibroblasts suspension (110 µL/well) was seeded to 96 well flat bottomed tissue culture plates (Nunc, Roskilde, Demark) at a density of 5×10^3 cells/100 µL and incubated for 24 hours to achieve attachment of the cells before adding the extracts. After incubation for 1, 3 and 7 days with the materials extract, cell viability was determined by methyl-thiazol-tetrazolium (MTT) assay by using a CellTiter 96 Assay kit (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. Cell viability was calculated by using the following formula: $100(a-b)/c$, where a and b were optical density (OD) values from test wells and background wells, respectively, and c was the mean OD value from control wells. The background absorbance was subtracted from

values. The results were subjected to univariate analysis of variance or t test, when necessary, at a significance level of 95%.

Results

Fibroblast cell viability was significantly associated with the different root canal filling materials tested ($p < 0.001$), but it was not correlated with incubation time or extracts concentrations ($p > 0.05$). Viability of fibroblasts from the control groups was higher than those from the experimental groups ($p < 0.05$).

The viability of cells incubated with the lowest concentrations of experimental MTA extracts (1:8 dilution) were higher after 1 and 3 days of incubation in comparison with 7 days of incubation ($p = 0.006$). However, when Vitapex, ZOE or Calen+ZO extracts were used, the fibroblast viability was not different within the incubation times ($p > 0.05$).

Cells exposed to extracts from Vitapex showed the highest viabilities at all extract concentrations, whereas cells exposed to ZOE extracts displayed the lowest viabilities ($p < 0.001$). MTA-based material and Calen+ZO were statistically equivalent ($p = 0.115$) (Fig 1).

Discussion

Materials used in endodontics should be harmless to the periapical tissues. This is particularly desirable in primary teeth due to the physiological root resorption process. The root canal filling materials used in primary teeth should be biocompatible to the periapical tissues and permanent teeth germ.² The experimental MTA-based material tested in the present study has been developed to be used as a primary teeth endodontic filling; therefore it is important to assess its possible cytotoxic effects that might compromise the clinical outcomes.

The first step to screen a new experimental material should be a series of in vitro cytotoxicity assays, prior to in vivo tests. The MTT colorimetric assay is widely used as a standard assay for evaluating the cytotoxicity of new material,

and has been routinely used to test dental and endodontic filling materials in cell culture systems.^{9,14,15} The results of in vitro cytotoxicity tests may not totally correlate with in vivo data. However, if a test material consistently induces a strong cytotoxicity reaction in a cell culture, it will probably induce toxicity to living tissues. Besides being suitable for the evaluation of basic biological aspects relative to biocompatibility, in vitro cytotoxicity assays have the advantages of being simple, reproducible and cost-effective.¹⁶

Our results showed that fibroblasts viability was higher when the cells were exposed to extracts of Vitapex. This finding is in agreement with Huang et al.⁹ and Chen et al.¹⁵ The high biocompatibility of Vitapex may occur due to the calcium ions, which are coated with silicon oil reducing its leaching out. Contrary to our findings, it was reported by Wright et al.¹⁷ that iodoform containing materials can cause considerable tissue necrosis, presenting higher cytotoxicity than ZOE. Nevertheless, the Kri paste used in such study, contains iodoform 80.8%, while Vitapex has only 40.4%. Also, it is advocated that materials which have strong antibacterial properties, tend to present high cytotoxicity too.⁹ However, Vitapex, presented high biocompatibility some studies have been showed its antimicrobial effectiveness.¹⁸

The irritating potential of the ZOE is currently attributed to the eugenol.^{3,17} In this study, ZOE demonstrates higher cytotoxicity than all the other tested materials. In primary teeth, the biocompatibility of the endodontic filling material is especially important, since it may be the one of the main factors affecting alteration of the eruption path of permanent teeth.¹⁵ Despite this, the success rates of ZOE in endodontic treatment of necrotic primary teeth is elevated.^{2,6,20} One possible explanation for the high success rates of ZOE, may be the fact that this material does not easily flow into the narrow and tortuous root canals of primary teeth, and it is not frequently extruded to the periapical tissues.

Mineral trioxide aggregate have been widely used for direct pulp capping and pulpotomy in primary teeth.^{19,22} The major benefits of MTA is a biocompatible, antimicrobial action, and it promotes regeneration of tissues when it is placed in contact with the dental pulp or periradicular tissues^{19,21,22} but it never been used in the composition of an endodontic filling material for

primary teeth. The major components of experimental material tested are mineral trioxide aggregate, calcium tungstate, polyethylene glycol, glycerin, silicate oxide and silicon.

Our results showed a similar behavior related to the biocompatibility of both, experimental MTA-based material and Calen+ZO. It can be explained once calcium in its hydroxide form is the main chemical compound released by MTA.¹⁹ The Calen+ZO has been used as endodontic filling material because of its antibacterial activity, biocompatibility, hydrosoluble nature (viscous), and low solubility, and the addition of ZO to the Calen paste is indicated in order to reduce the velocity of paste phagocytosis.^{8,11,12} The high clinical success rate of Calen+ZO (87.5%) confirm the capacity of this material of preventing and restrain root resorptions and inducing new bone formation.²³

Even the experimental MTA-based material was not the most cytotoxicity material tested; to be considered a safe material to be used in endodontics, other in vitro and also in vivo assays must be performed.

Conclusion

In conclusion, human gingival fibroblasts showed similar response to extracts from MTA-based material and Calen paste thickened with zinc oxide as measured by cytotoxicity assay. Vitapex was the most biocompatible material tested.

References

1. Kubota K, Golden BE, Penugonda B. Root canal filling materials for primary teeth: A review of the literature. *J Dent Child* 1992; 58:225–227.
2. Mortazavi M, Mesbahi M. Comparison of zinc oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. *Int J Paediatr Dent* 2004;14:417– 424.
3. Reddy S, Ramakrishna Y. Evaluation of antimicrobial efficacy of various root canal filling materials used in primary teeth: a microbiological study. *J Clin Pediatr Dent* 2007; 31:193-198.

4. Hegde S, Lala PK, Rao B D, AB S. An in vitro evaluation of antimicrobial efficacy of primary root canal filling materials. *J Clin Pediatr Dent* 2012; 37: 59-64
5. Fuks AB, Eidelman E. Pulp therapy in the primary dentition. *Curr Opin Dent* 1991;1: 556 –563.
6. Coll JA, Sadrian R. Predicting pulpectomy success and its relationship to exfoliation and succedaneous dentition. *Pediatr Dent* 1996; 18: 57– 63.
7. Chawla HS, Mathur VP, Gauba K, Goyal A. A mixture of Ca(OH)₂ paste and ZnO powder as a root canal filling material for primary teeth: a preliminary study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2001;19:107-109.
8. Queiroz AM, Nelson-Filho P, Silva LA, Assed S, Silva RA, Ito IY. Antibacterial activity of root canal filling materials for primary teeth: zinc oxide and eugenol cement, Calen paste thickened with zinc oxide, Sealapex and EndoREZ. *Braz Dent J* 2009; 20:290-296.
9. Huang TH, Ding SJ, Kao CT. Biocompatibility of various formula root filling materials for primary teeth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*2007; 80:486-90.
10. Garcia-Godoy F. Evaluation of an iodoform paste in root canal therapy in infected primary teeth. *J Dent Child* 1987; 54:30 –34.
11. Ranly DM, Garcia-Godoy F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. *J Dent* 2000; 28:153–161.
12. Fava LRG, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications: review *Int Endod J* 1999; 32:257–282.
13. Ma J, Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Biocompatibility of two novel root repair materials. *J Endod.* 2011; 37: 793-798.
14. Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ, Li L, Zheng YF, Häkkinen L, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod.* 2013; 39: 478-483.
15. Chen CW, Huang TH, Kao CT. Comparison of the biocompatibility between 2 endodontic filling materials for primary teeth *Chin Dent J* 2005; 24: 28-34.
16. Balto H, Al- Nazhan S. Attachment of human periodontal ligament fibroblasts to three different root-end filling materials: scanning electron

- microscope observation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2003; 95:222-227.
17. Wright KJ, Barbosa SV, Araki K, Spangberg LS. In vitro antimicrobial and cytotoxic effects of Kri 1 paste and Zinc oxide-eugenol used in primary tooth pulpectomies. *Pediatr Dent* 1994; 16: 102–106.
 18. Han GY, Park SH, Yoon TC. Antimicrobial activity of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ containing pastes with enterococcus faecalis in vitro. *J Endod*. 2001; 27: 328-332.
 19. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005; 31:97-100.
 20. Trairatvorakul C, Chunlasikaiwan S. Success of pulpectomy with zinc oxide-eugenol vs calcium hydroxide/iodoform paste in primary molars: a clinical study. *Pediatric Dentistry* 2008; 30: 303–308.
 21. Anthonappa RP, King NM, Martens LC. Is there sufficient evidence to support the long-term efficacy of mineral trioxide aggregate (MTA) for endodontic therapy in primary teeth? *Int Endod J* 2013; 46: 198-204.
 22. Naik S, Hegde AH. Mineral trioxide aggregate as a pulpotomy agent in primary molars: an in vivo study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2005;23:13-16.
 23. Pinto DN, Sousa DL, Rocha RB et al. Eighteen-month clinical and radiographic evaluation of two root canal-filling materials in primary teeth with pulp necrosis secondary to trauma. *Dent Traumatol* 2011; 27: 221–224.

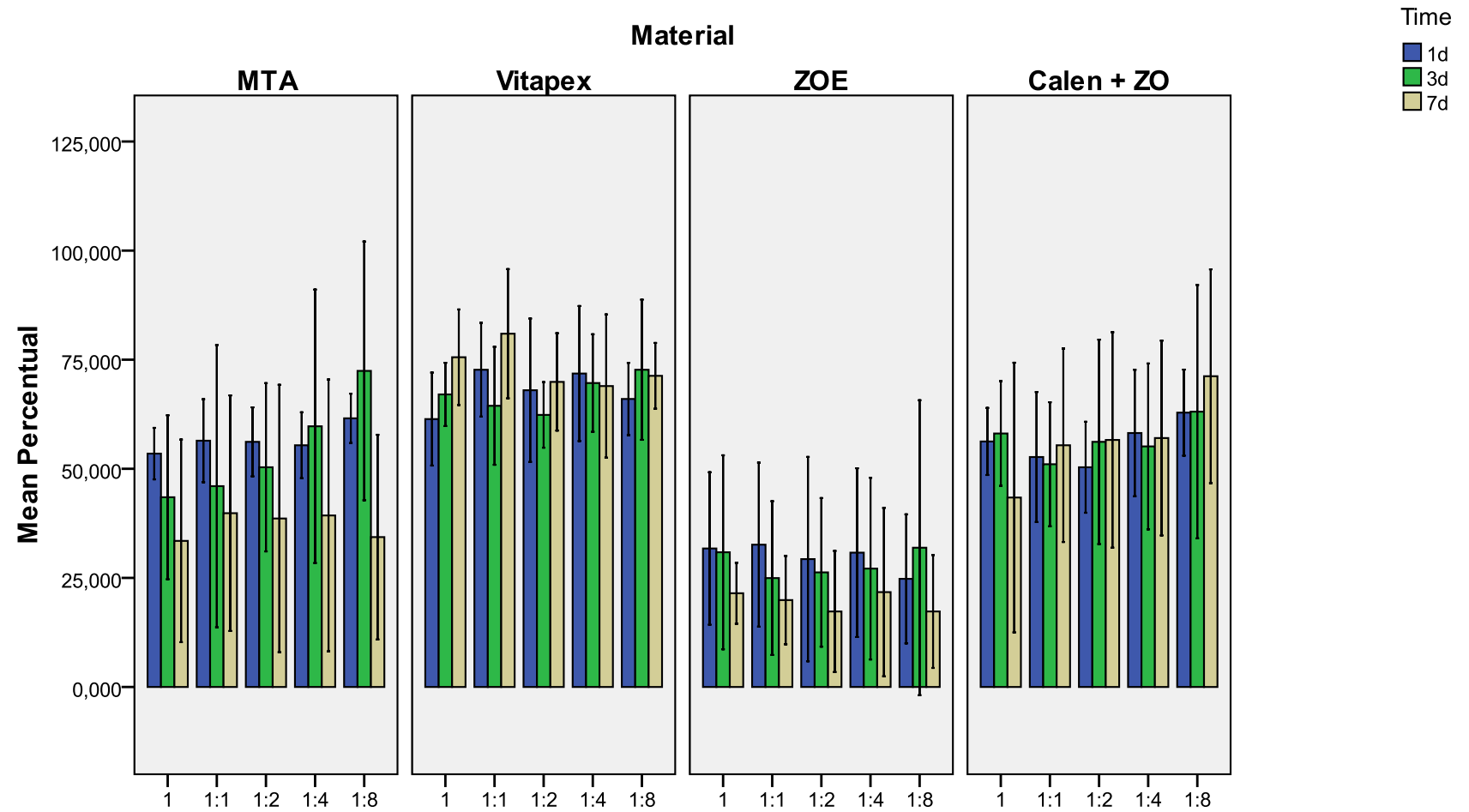


Figure 1. Fibroblast cell viability exposed to extracts of different materials at different incubation time.

4.3 Artigo 3

TITLE PAGE

TITLE

Antibiofilm activity of different endodontic filling material used in primary teeth³

Katerine Jahnecke Pilownic^{*}; Ceci Nunes Carvalho^{**}; Ana Regina Romano^{*}, Ya Shen^{***}; Markus Haapasalo^{***}; Fernanda Geraldo Pappen^{*}

^{*} Faculty of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil;

^{**}School of Dentistry, University Center of Maranhão-UniCeuma, São Luís, MA, Brazil;

^{***}Faculty of Dentistry, University of British Columbia, Vancouver, Canada.

Corresponding author:

Katerine Jahnecke Pilownic

Address: Graduate Program in Dentistry – Federal University of Pelotas

– R. Gonçalves Chaves, 457, 5th floor, Pelotas, RS, Brasil. CEP: 96015-560.

Phone/Fax: +55-53-3222-6690 r. 135

E-mail: katerinejahnecke@yahoo.com.br

3. Formatado para o periódico *International Journal of Paediatric Dentistry*

Summary

Background The antimicrobial activity of endodontic filling materials is an essential property of filling materials for primary teeth due to the root canal morphology with many lateral canals and accessory canals in the primary teeth.

Aim This study evaluated the effect of endodontic materials for primary teeth on mixed-species biofilms.

Design Zinc oxide and eugenol cement; Vitapex; Calen paste thickened with zinc oxide; Calcium hydroxide mixed sterile water and Iodoform were evaluated. Sterile water was used as a control solution. Mixed-species biofilm was suspended in BHI and incubated using sterile hydroxyapatite disks as substrate. The disks were incubated in anaerobic conditions (AnaeroGen; OXOID, Hampshire, UK) for 21 days. The specimens were placed in contact with the tested materials for experimental periods of 7 and 30 days. The percentage of killed biofilm bacteria was determined by using LIVE/DEAD BacLight Stain (Molecular Probes, Europe BV) in confocal laser scanning microscopy. The cell viability ratio was performed using Imaris 5.0 software. The results were analyzed using ANOVA and Tukey tests (SPSS 17.0, SPSS Inc, Chicago, IL).

Results. In the control group, more than 93% of biofilm cells were viable within the experimental periods. There was a statistically significant difference between groups within the experimental times ($F=73,073$, $p = 0,00$). After 30 days, 49.59% of biofilm remained viable in contact with Vitapex and 31.41%, when Iodoform was used. ZOE cement allowed a viability ratio of 66.19% of biofilm. Calen + ZO and CaOH₂ were the least effective materials against biofilms, since they left 73.73% and 81.44% of biofilms still viable after 30 days.

Conclusion. The results showed that Vitapex and Iodoform presented the best antimicrobial effect against mixed-species biofilms among the root canal filling materials for primary teeth tested.

Key Words: primary teeth; root canal filling; biofilm; antibacterial; Endodontics.

Introduction

Several materials have been used for endodontic filling in primary teeth. Zinc oxide (ZO) and zinc oxide eugenol (ZOE) have been widely used in the primary dentition.^{1,2} Nevertheless, due to their irritating potential^{3,4} and low resorption capacity⁴ the use of these materials have been substituted by iodoform containing materials, or calcium hydroxide pastes, because of their antibacterial activity, biocompatibility and easy resorption.^{1,3-5} Other studies have also suggested the use of association of zinc oxide and calcium hydroxide^{6,7} as well as calcium hydroxide and iodoform^{3,5} in order to improve the chances of success in root canal therapy of primary teeth.

The root canal morphology of a primary tooth is different from a permanent tooth. With many lateral canals and accessory canals in the primary teeth, the cleaning of an infected primary tooth root canal, using mechanical instruments, is a challenge to endodontic therapy. Thus, the antimicrobial activity of endodontic filling materials is an essential property of filling materials. Agar diffusion test (ADT) has been extensively used to assess this property of endodontic materials^{1,2,8} despite its well-known limitations. The inhibition zone is directly influenced by the solubility and diffusibility of the material in the culture medium, and by the chemical interactions between the media and the disinfecting agents. The buffering capacity of the agar plate can also influence the growth inhibition zone of materials which have the antimicrobial effect based on the pH effect.^{9,10} Thus, it is important to evaluate the antimicrobial activity of the root filling materials for primary teeth using appropriated methodology.

Bacteria in the root canal grow mostly in sessile forms and the success of endodontic treatment will depend on the effective elimination of biofilms.¹¹ Bacteria

growing in biofilms are responsible for diverse persistent infections^{12,13}, and while planktonic microorganisms can be eliminated more readily by a variety of methods, the removal of sessile biofilm bacteria from root canals remains a major challenge.^{11,14} The increased resistance of biofilms to antimicrobial agents that can be 100 to 1,000 fold greater for a species in a mature biofilm relative to that same species grown planktonically.^{12,15}

Thus, to provide valuable results, it is imperative to evaluate the capacity of endodontic materials to eliminate biofilm bacteria from the root canals using multispecies biofilm models. The aim of the present study was to measure the biofilm effect of traditionally used endodontic materials for primary teeth using confocal laser scanning microscopy (CLSM).

Methods

Tested endodontic materials

The materials tested were zinc oxide and eugenol cement (ZOE) (S.S.White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brazil); a premixed calcium hydroxide and iodoform paste (Vitapex) (Neodental International Inc, Federal Way, WA, USA); 1.0 g of a commercial calcium hydroxide and polyethylene glycol-based paste (Calen) (S.S.White Artigos Dentários Ltda.), thickened with 1.0 g zinc oxide (ZO) (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Ibiporã, PR, Brazil); 1.0 g Calcium hydroxide mixed with 1mL sterile water (CaOH + H₂O) and 1.0 g Iodoform . Sterile water was used as a control solution.

Biofilm development

Thirty six sterile hydroxyapatite (HA) disks (0.38-inch diameter by 0.06- inch thickness; Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA) were used as substrate to grow biofilms. The HA disks were coated with bovine dermal collagen type I (10 mg/mL collagen in 0.012 N HCl in water) (Cohesion, Palo Alto, CA).¹² The subgingival plaque on the first or second upper molars of each of three healthy volunteers was collected and suspended in brain heart infusion broth (BHI) (Becton Dickinson, Sparks, MD). The disks were incubated in BHI under anaerobic conditions (AnaeroGen; OXOID, Hampshire, UK) for 3 weeks.

Bacterial viability assay on Biofilm

At 3 weeks of biofilm growth, specimens were put in contact with 0,1g of root filling material. The specimens were placed in the incubator for experimental periods of 7 and 30 days (n=3).

The material on each one of the discs was gently washed three times with a phosphate buffered saline (PBS) solution, then stained using the BacLight LIVE/DEAD KIT L7012 (bacterial viability kit) for quantitative and microscopic analysis (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) following the manufacturer's instruction.

Live bacteria were stained with SYTO 9 (green fluorescence), while bacteria with impaired membranes were stained with propidium iodide to produce red fluorescence.

The mounted discs were viewed immediately using a confocal laser scanning microscope (Nikon Eclipse C1; Nikon Canada, Mississauga, Ontario, Canada) with a

10 × magnifying lens. The confocal laser scanning microscopic images of 512×512 pixels were captured using v EZ-C1 3.40 camera and constructed in the 691 software program (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Five randomly selected areas on the disc surface of each specimen were scanned (1.2 mm × 1.2 mm for each area) by confocal laser scanning microscopy. For each group and period, three specimens were assigned, totaling 15 measurements per group.

Twenty-micrometer-deep scans (0.5 µm step size, 40 slices/scan) of each sample were performed to standardize the area and volume of the biofilm scanned.

Live/dead ratios of HA disks were analyzed using the Imaris 7.2 software (Bitplane Inc, St Paul, MN). The volume ratio of red fluorescence to green and red fluorescence indicated the proportion of killed cells. The proportions of dead cell volume after exposure to different root dental material were subjected to ANOVA and Tukey test using SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Results

A total of 180 scanned areas from were analyzed (Figure 1). There were significant differences in the killing ratio between different materials ($F = 73.073$, $p = 0.00$). The proportion of killed bacteria was dependent on the exposure time. In the control group, 93% and 94% of the bacterial cells were viable within the experimental periods. Vitapex and Iodoform were the most effective materials against the biofilm. After 30 days of incubation with Vitapex, 49.59% biofilm volume was viable, while 31.41% of biofilm were viable after the use of iodoform. Vitapex and Iodoform were followed by ZOE which allowed 66.19% of viable. Calen + ZO and CaOH₂ were the least effective against biofilm bacteria. After 30 days in contact with Calen+ZO and CaOH₂+H₂O, 73.73% and 81.44% of the bacteria were viable (Table 1).

Discussion

Considering the inherent difficulties in pulp therapy of primary teeth, the sanitization process requires the use of root filling materials with properties such as antimicrobial activity. Antibacterial effect of endodontic filling materials might help to eliminate residual microorganisms that have survived the chemomechanical instrumentation and thereby improve the success rate of endodontic treatment.

Several studies have evaluated the antimicrobial efficacy of primary root canal filling materials, however most of them still apply the Agar diffusion test.^{1,2,8} Frequently, the results of such studies are not reliable, since the inhibition zones may be more related to the materials' solubility and diffusibility in agar than to their actual efficacy against the microorganisms.^{9,10} It occurs because in some peculiarities should be taken into consideration when applying this method: the weight, size and molecular shape of the antimicrobial agent; the agar gel texture; the loading and concentration of the tested material and the contact between the tested material and the agar.¹⁶

Once bacteria organized as biofilms are known to be present in inaccessible areas of the root canal system, and the microbes organized in communities generally have a low metabolic rate and tend to be resistant to antimicrobial agents^{12,13}, the endodontic filling materials should be tested for their antimicrobial capacity using multispecies biofilm models. Confocal laser scanning microscopy (CLSM), and the two-component BacLight staining has been used because of its several advantages. It is rapid and easy to apply this test, and it income both viable and total counts in one step. The two stains differ in their ability to penetrate normal and damaged bacterial cells. Thereby, live bacteria with intact membranes fluoresce green (SYTO9), whereas dead bacteria fluoresce red, when their membrane is damaged.

So, penetration of the propidium iodine stain is allowed, which is responsible for the red fluorescence.¹³ The antimicrobial effect endodontic filling materials has been studied in planktonic bacteria, but little is known about the behavior of these materials in contact with endodontic biofilms.

The small effect of calcium hydroxide against biofilm may be explained by the difficulty of maintaining high concentration of hydroxyl ions that changes the bacterial enzyme activity and promote its inactivation. The antimicrobial action of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ depends on its high pH which depends on release and diffusion of hydroxyl ions.¹⁷ Bacterial tolerance to pH changes may be because of activation of specific proton pumps, specific enzymatic systems and/or buffering devices, which help to keep the internal pH practically constant [18]. In addition to these mechanisms, some bacterial products generated during growth may help bacteria to neutralize the environmental pH.¹⁷

Although the vehicle of Calen paste, polyethylene glycol 400, is a viscous material and permits slower ion dissociation, and the addition of ZO presents antibacterial activity there was no significant improvement in the results found when comparing Calen+ZO with $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Regarding, viscous vehicles promote a lower solubility of the paste in comparison to aqueous vehicles. Oily vehicles promote the lowest solubility and diffusion of calcium hydroxide pastes.¹⁹ Thereby, pastes containing an oily vehicle, particularly those with an antibacterial substance (i.e., iodoform) have shown more favorable results than more soluble pastes, when used as a endodontic filling material in primary teeth.¹⁷

The present study indicates ZOE exhibited medium inhibitory effect against biofilm. Several studies showed strong antimicrobial effect exhibited by ZOE^{2,20}, although, in others, ZOE presented limited antimicrobial action.^{1,8} The difference of

results could be explained by the variation in diffusion of the endodontic filling materials through the Agar and the different strains of bacteria used in these studies. The antimicrobial effects of ZOE have been attributed to eugenol.^{1,21} ZOE is not particularly antibacterial once it has set.²¹ On account of this, the constancy of the effectiveness of ZOE in different experimental times occurs in our findings.

Vitapex and Iodoform were the most effective endodontic filling materials against biofilm. The main ingredients of Vitapex are iodoform 40.4%, calcium hydroxide 30.3% and silicone 22.4%. The two main components of Vitapex (calcium hydroxide and iodoform) are responsible for its higher antibacterial properties by comparing ZOE.³ Even some studies^{1,2,8,20} demonstrate CA(OH)₂+ iodoform present weak antibacterial activity, high clinical and radiographic success rates of Vitapex in root canal therapy for primary teeth have been reported.^{3,22} In vitro studies that demonstrate the low antimicrobial effect of calcium hydroxide associated to iodoform, usually apply the agar diffusion test, which present several failures.

The high level of clinical and radiographic success of pulpectomy with Vitapex in primary teeth may be related to its antibacterial properties and the material's distinctive property of rapid resorption from periapical tissue.²² Our results suggest, as well as in other studies, the good performance of Vitapex occurred due to the presence of iodoform, since iodoform alone promoted the elimination of almost 70% of biofilms. The iodoform's action occurs from releasing iodine, which gives it high reactivity by precipitating proteins and oxidizing essential enzymes.²³

Conclusion

In conclusion, the results of this study show that Vitapex and Iodoform were the most effective materials against the biofilm. Although the antimicrobial efficacy of

a root canal filling material may be vital to achieving success in endodontic therapy, it is not the only property desired of an ideal material.

References

1. Reddy S, Ramakrishna Y. Evaluation of antimicrobial efficacy of various root canal filling materials used in primary teeth: a microbiological study. *J Clin Pediatr Dent* 2007; **31**:193-198.
2. Hegde S, Lala PK, Rao B D, AB S. An in vitro evaluation of antimicrobial efficacy of primary root canal filling materials. *J Clin Pediatr Dent* 2012; **37**: 59-64.
3. Mortazavi M, Mesbahi M. Comparison of zinc oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. *Int J Paediatr Dent*, 2004; **14**: 417–424.
4. Ranly DM, Garcia-Godoy F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. *J Dent* 2000; **28**: 153–161.
5. Huang TH, Ding SJ, Kao CT. Biocompatibility of various formula root filling materials for primary teeth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomat* 2007; **80**:486-90.
6. Chawla HS, Mathur VP, Gauba K, Goyal A. A mixture of Ca(OH)₂ paste and ZnO powder as a root canal filling material for primary teeth: a preliminary study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2001; **19**:107-109.
7. Queiroz AM, Nelson-Filho P, Silva LA, Assed S, Silva RA, Ito IY. Antibacterial activity of root canal filling materials for primary teeth: zinc oxide and eugenol cement, Calen paste thickened with zinc oxide, Sealapex and EndoREZ. *Braz Dent J* 2009; **20**:290-296.

8. Tchaou WS, Turng BF, Minah GE, Coll JA. Inhibition of pure cultures of oral bacteria by root canal filling materials. *Pediatr Dent* 1996; 18:444-449.
9. Editorial Board of the Journal of Endodontics. Wanted: a base of evidence. *J Endod*. 2007; **33**:1401-1402.
10. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Garrido FD, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *J Endod* 2002; **28**:758-761.
11. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 2010; **36**:1277–1288.
12. Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. *J Endod* 2013; **39**:473-477.
13. Shen Y, Stojicic, S, Haapasalo M. Bacterial Viability in Starved and Revitalized Biofilms: Comparison of Viability Staining and Direct Culture, *J Endod* 2010; **36**:1820-1823.
14. Haapasalo M, Endal U, Zandi H, et al. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Topics* 2005; **10**:77–102.
15. Ceri H, Olson ME, Stremick C, et al. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999; **37**:1771–1776.
16. Tanomaru JMG, Pappen FG, Tanomaru Filho M, Spolidorio DMP, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of different gutta-percha points and calcium hydroxide pastes. *Braz Oral Res* 2007; **21**:35-39.

17. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int End J* 1999; **32**: 361-369.
18. Padan E, Zilberstein D, Schuldiner S. PH homeostasis in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1981; **650**: 151-166.
19. Fava LRG, Saundres WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int End J* 1999; **32**: 257-282.
20. Pabla T, Gulati MS, Mohan U. Evaluation of antimicrobial efficacy of various root canal filling materials for primary teeth. *J Ind Soc Pedod PrevDent* 1997; **15**: 134-140.
21. Wright KJ, Barbosa SV, Araki K, Spangberg LS. In vitro antimicrobial and cytotoxic effects of Kri paste and zinc oxide eugenol used in primary tooth pulpectomies. *Pediatr Dent* 1994; **16**: 102-106.

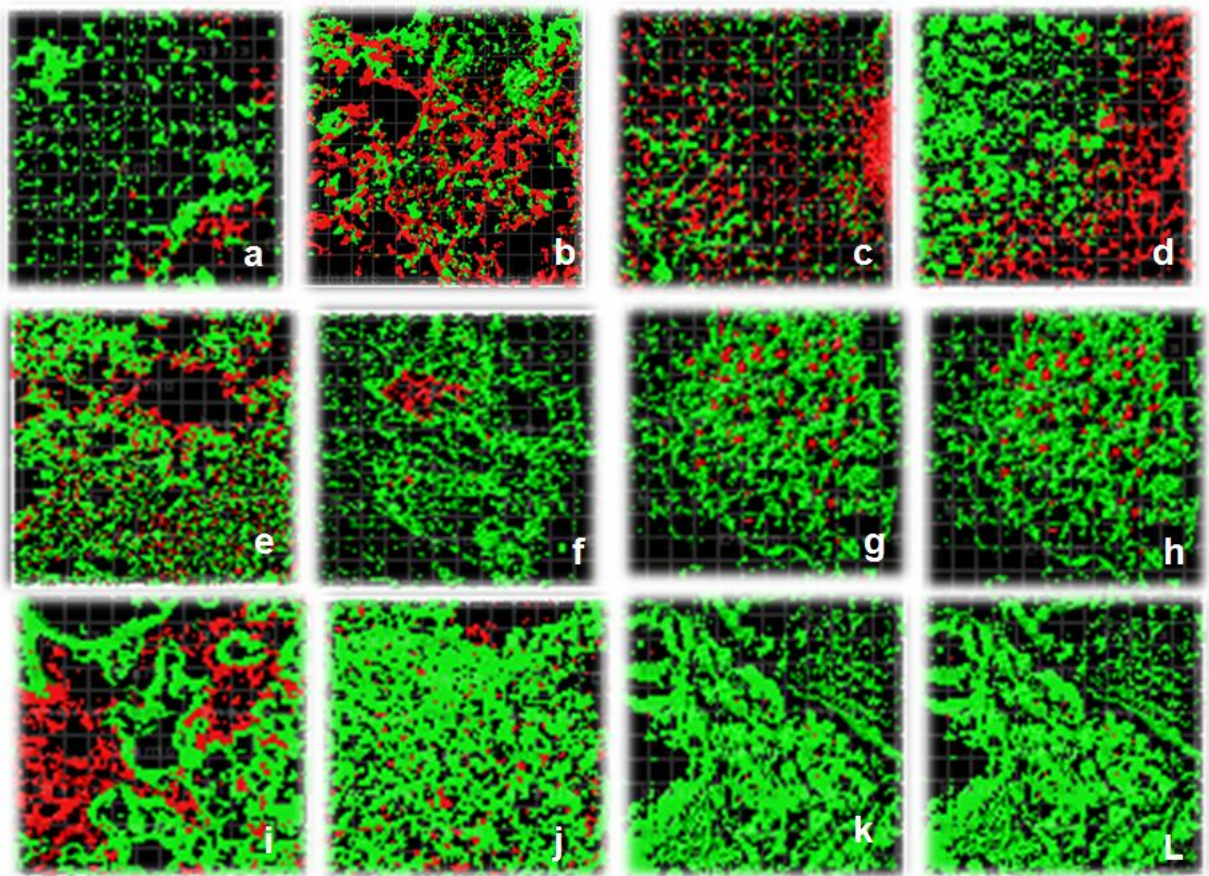


Figure 1. Scanned areas using a CLSM **a)** Vitapex 7 days: 54% bacterial cells viable in green **b)** Vitapex 30 days: 49% bacterial cells viable in green **c)** Iodoform 7 days: 59% bacterial cells viable in green **d)** Iodoform 30 days: 31% bacterial cells viable in green **e)** ZOE 7 days: 65% bacterial cells viable in green **f)** ZOE 30 days: 66% bacterial cells viable in green **g)** CaOH₂+H₂O 7 days: 84% bacterial cells viable in green **h)** CaOH₂+H₂O 30 days: 81% bacterial cells viable in green **i)** Calen + ZO 7 days: 91% bacterial cells viable in green **j)** Calen + ZO 30 days: 73% bacterial cells viable in green **k)** Control 7 days: 93% bacterial cells viable in green **l)** Control 30 days: 94% bacterial cells viable in green.

Table1. Ratio of live bacteria (green color) to the whole bacteria (mean $\pm$ SD), after the exposure to different root canal filling materials.

Material	7 days	30 days
Vitapex	0.53 $\pm$ 0.17 ^a	0.49 $\pm$ 0.14 ^b
Iodoform	0.59 $\pm$ 0.10 ^{ab}	0.31 $\pm$ 0.12 ^a
Zinc Oxide Eugenol	0.65 $\pm$ 0.64 ^b	0.66 $\pm$ 0.08 ^c
Calcium Hydroxide	0.84 $\pm$ 0.83 ^c	0.81 $\pm$ 0.10 ^d
Calen + ZO	0.91 $\pm$ 0.53 ^c	0.73 $\pm$ 0.67 ^{cd}
Control	0.92 $\pm$ 0.32 ^c	0.94 $\pm$ 0.04 ^e

Different small letters indicate statistically significant difference between materials within experimental times.

5 Considerações Finais

Com base nas metodologias utilizadas neste estudo experimental conclui-se:

5.1 A radiopacidade apresentada pelo material experimental à base MTA atende ao mínimo recomendado pela ISO 6876/2001. O material possui um pH alcalino e demonstra considerável atividade antimicrobiana, além de ser biocompatível.

5.2 O material experimental à base de MTA apresenta propriedades físico-químicas e biológicas satisfatórias, podendo ser indicado como material obturador de canais radiculares de dentes decíduos.

Referências Bibliográficas

1. AGRAFIOTI, A.; TZIMPOULAS, N.E.; KONTAKIOTIS, E.G. Influence of dentin from the root canal walls and the pulp chamber floor on the pH of intracanal medicaments. **Journal of Endodontics**, v.39, n.5, p.701-703, 2013.
2. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY, Guideline on pulp therapy for primary and young permanent teeth. **Pediatric Dentistry**, vol. 31, n. 6, p.179–186, 2009.
3. ANTHONAPPA R.P.; KING N.M.; MARTENS L.C. Is there sufficient evidence to support the long-term efficacy of mineral trioxide aggregate (MTA) for endodontic therapy in primary teeth? **International Endodontic Journal**, v.46, n.3,p.198-204, 2013.
4. BALTO H.; AL- NAZHAN S. Attachment of human periodontal ligament fibroblasts to three different root-end filling materials: scanning electron microscope observation. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v.95, n.2, p.222-227, 2003.
5. BARJA-FIDALGO, F. ; MOUTINHO-RIBEIRO, M.; OLIVEIRA, M.A.; DE OLIVEIRA B.H. A systematic review of root canal filling materials for deciduous teeth: is there an alternative for zinc oxide-eugenol? **ISRN Dentistry**, v.2011, p.1-7, 2011.
6. BYSTRÖM A.; CLAEISSON R.; SUNDQVIST G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Dental Traumatology**, v.1, n.5, p.170-175,1985.
7. CARVALHO-JUNIOR J.R; CORRER-SOBRINHO L; CORRER A.B., et al. Radiopacity of root filling materials using digital radiography. **International Endodontic Journal**, v.40, p.514–520, 2007.
8. CERI H.; OLSON M.E; STREMICK C.; et al. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.6, p.1771–1776, 1999.
9. CERQUEIRA, D.F.; MELLO-MOURA, A.C.; SANTOS, E.M.; GUEDES-PINTO, A.C. Cytotoxicity, histopathological, microbiological and clinical aspects of an endodontic iodoform-based paste used in pediatric dentistry: a review. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v.32, p.105-110, 2008.
10. CHAWLA H.S.; MATHUR V.P.; GAUBA K.; GOYAL A. A mixture of Ca(OH)₂ paste and ZnO powder as a root canal filling material for primary teeth: a preliminary study. **Journal of Indian Society Pedodontics and Preventive Dentistry**, v.19, n.3, p.107-109, 2001.
11. CHAWLA, H.S.; SETIA, S.; GUPTA, N.; GAUBA, K.; GOYAL, A. Evaluation of a mixture of zinc oxide, calcium hydroxide, and sodium fluoride as a new root canal

- filling material for primary teeth, **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v.26, n.2, p.53-58, 2008.
12. CHEN C.W.; HUANG T.H.; KAO C.T. Comparison of the biocompatibility between 2 endodontic filling materials for primary teeth. **Chinese Dental Journal**, V.24, n.1, p.28-34, 2005.
 13. COLL, J.A.; SADRIAN, R. Predicting pulpectomy success and its relationship to exfoliation and succedaneous dentition. **Pediatric Dentistry**, v.18, n.1, p.57–63, 1996.
 14. CORREA, M.S.P.et al. Odontopediatria na primeira infância. 3.ed.,1.reimp.São Paulo: Santos, 2011.611p.
 15. COULD, J.M. Root canal therapy for infected primary molar teeth—Preliminary report. **ASDC Journal of Dentistry for Children**, v.39, p.269– 273, 1972.
 16. COX, S.T.; HEMBREE, J.H.; MCKNIGHT, J.P. The bactericidal potential of various endodontic materials for primary teeth. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v.45, p.947–954, 1978.
 17. DARTE, M. A.H.; DE OLIVEIRA, E. K.; GUÂNIARA, et al. Radiopacity of portland cement associated with different radiopacifying agents. **Journal of Endodontics**, v. 35, n.5, p.737-740, 2009.
 18. DE SOUZA, R.S.; DE SOUZA, V.; HOLLAND, R. et al Effect of calcium hydroxide-based materials on periapical tissue healing and orthodontic root resorption of endodontically treated teeth in dogs. **Dental Traumatology**, v.25, n.2, p.213- 218, 2009.
 19. Editorial Board of the Journal of Endodontics. Wanted: a base of evidence. **Journal of Endodontics**, v. 33, p.1401-1402, 2007.
 20. FAVA, L.R.G.; SAUNDERS, W.P. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications: review. **International Endodontic Journal**, v.32, n.4, p.257–82, 1999.
 21. FUKS, A.B. Pulp therapy for the primary and young permanent dentitions. **Dental Clinics of North America** v.44, n.3, p.571-96, 2000.
 22. FUKS, A.B.; EIDELMAN, E. Pulp therapy in the primary dentition. **Current Opinion in Dentistry**, v.1, p.556–563, 1991.
 23. GARCIA-GODOY F. Evaluation of an iodoform paste in root canal therapy in infected primary teeth. **Journal of Dentistry for Children**, v.54, n.1, p.30 –34, 1987.
 24. GARCIA-GODOY, F. Evaluation of an iodoform paste in root canal therapy for infected primary teeth. **ASDC Journal of Dentistry for Children**, vol. 54, n. 1, p. 30–34, 1987.

25. GOMES, B.P.F.A.; FERRAZ, C.C.R.; GARRIDO, F.D., et al. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. **Journal of Endodontics**, v.28, n.11, p.758-761, 2002.
26. GUERREIRO-TANOMARU, J.M. et al. Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. **Dental Traumatology**, v.38, n.4, p.320-323, 2012.
27. HAAPASALO, M.; ENDAL, U.; ZANDI, H. et al. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. **Endodontic Topics**, v.10, n.1, p.77-102, 2005.
28. HAN, G.Y.; PARK, S.H.; YOON, T.C. Antimicrobial activity of Ca(OH)₂ containing pastes with *enterococcus faecalis* in vitro. **Journal of Endodontics**, v. 27, p.328-332, 2001.
29. HEGDE, S.; LALA, P.K.; RAO, B. D.; AB, S. An in vitro evaluation of antimicrobial efficacy of primary root canal filling materials. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v.37, n.1, p.59-64, 2012.
30. HUANG, T.H.; DING, S.J.; KAO, C.T. Biocompatibility of various formula root filling materials for primary teeth. **Journal of Biomedical Materials Research part B: Applied Biomaterials**, v.80, n.2, p.486-90, 2007.
31. KAYAOGLU, G, ØRSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Critical reviews Oral Biology Medicine**, v.15, n.5, p. 308-320, 2004.
32. KRAMER, P.F.; FARACO JUNIOR, I.M.; FELDENS, C.A. Current status of pulp therapy in the Brazilian Universities - Pulpotomy and Pulpectomy Technique in primary teeth. **Jornal Brasileiro de Odontopediatria e Odontologia do Bebê**, v.3, p.222-229, 2000.
33. KUBOTA, K.; GOLDEN, B.E.; PENUGONDA, B. Root canal filling materials for primary teeth: a review of the literature. **ASDC Journal of Dentistry for Children**, v.59, n.3, p.225-7, 1992.
34. MA J.; SHEN Y.; STOJICIC S.; HAAPASALO M. Biocompatibility of two novel root repair materials. **Journal of Endodontics**, v.37, n.6, p.793-798, 2011.
35. MASS, E.; ZILBERMAN, U.L. Endodontic treatment of infected primary teeth, using Maisto's paste. **ASDC Journal of Dentistry for Children**, v.56, n.2, p.117-20, 1989.
36. MATHEWSON, R.J.; PRIMOSCH, R.E. Fundamentals of Paediatric Dentistry, 3rd edn. Chicago, IL: **Quintessence Publishing**, p.257-280, 1995.
37. MCDONALD, R.E.; AVERY, D.R.; DEAN, J.A. Treatment of deep caries, vital pulp exposure, and pulpless teeth. In: McDonald RE, Avery DR (eds). **Dentistry for the Child and Adolescent**, 7th ed. St Louis, MO: Mosby, p.413-437, 2000.

38. MELLO-MOURA, A.V.; FANARO, J.; NICOLETTI, M.A.; MENDES, F.M.; WANDERLEY, M.T.; GUEDES-PINTO, A.C. Variability in the proportion of components of iodoform-based Guedes-Pinto paste mixed by dental students and pediatric dentists. **Indian Journal of Dental Research**, v.22, n.6, p.781-5, 2011.
39. MIZUNO, M.; BANZAI, Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. **International Endodontic Journal**, v.41, n.11, p.933-938, 2008.
40. MOHN et al. Radiopaque nanosized bioactive glass for potential root canal application: evaluation of radiopacity, bioactivity and alkaline capacity. **International Endodontic Journal**, v. 43, n.3, p.210–217, 2010.
41. MOLANDER, A.; REIT, C.; DAHLN, G.; KVIST, T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v.31, n.1, p. 1–7, 1998.
42. MORTAZAVI, M.; MESBAHI, M. Comparison of zinc oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v.14, n.6, p.417–424, 2004.
43. NAIK, S.; HEGDE, A.H. Mineral trioxide aggregate as a pulpotomy agent in primary molars: an in vivo study. **Journal of Indian Society of Pedodontics Preventive Dentistry**, v.23, n.1, p.13-16, 2005.
44. ÖZALP, N.; SAROGLU, I.; SÖNMEZ, H. Evaluation of various root canal filling materials in primary molar pulpectomies: an in vivo study. **American Journal of Dentistry**, v.18, n.6, p.347-350, 2005.
45. PABLA, T.; GULATI, M.S.; MOHAN, U. Evaluation of antimicrobial efficacy of various root canal filling materials for primary teeth. **Journal of Indian Society of Pedodontics Preventive Dentistry**, v.15, n.4, p.134-140, 1997.
46. PADAN, E.; ZILBERSTEIN, D.; SCHULDINER, S. PH homeostasis in bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 650, p.151-166, 1981.
47. PINTO, D.N. SOUSA D.L; ROCHA, R.B et al. Eighteen-month clinical and radiographic evaluation of two root canal-filling materials in primary teeth with pulp necrosis secondary to trauma. **Dental Traumatology**, v.27, n.3, p.221–224, 2011.
48. PORTENIER, I.; HAAPASALO, H.; RYE, A.; WALTIMO, T.; ØRSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. **International Endodontic Journal**, v.34, n.3, p.184–188, 2001.
49. QUAH, S.Y. et al. N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of enterococcus faecalis. **Journal of Endodontics**, v.38, n.1, p.81-87, 2012.
50. QUEIROZ, A.M.; NELSON-FILHO P.; SILVA L.A. et al. Antibacterial activity of root canal filling materials for primary teeth: zinc oxide and eugenol cement, Calen

- paste thickened with zinc oxide, Sealapex and EndoREZ. **Brazilian Dental Journal**, v.20, n.4, p.290–296, 2009.
51. RANLY, D.M.; GARCIA-GODOY F. Reviewing pulp treatment for primary teeth. **Journal of the American Dental Association**, v.122, n.9, p.83–85, 1991.
 52. RANLY, D.M.; GARCIA-GODOY, F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. **Journal of Dentistry**, v. 28, n.3, p.153–161, 2000.
 53. REDDY, S.; RAMAKRISHNA, Y. Evaluation of antimicrobial efficacy of various root canal filling materials used in primary teeth: a microbiological study. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v.31, n.3, p.193-198, 2007.
 54. RICUCCI, D.; SIQUEIRA, J.F. Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. **Journal of Endodontics**, v. 36, n.8 p.1277–1288, 2010.
 55. SARKAR, N.K.; CAICEDO, R.; RITWIK, P.; MOISEYEVA, R.; KAWASHIMA, I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v.31, n.2, p.97-100, 2005.
 56. SCHRODER, V. Effects of calcium hydroxide containing pulp capping agents on pulp cell migration, proliferation and differentiation. **Journal of Dental Research**, v.64, p.541-548, 1985.
 57. SEDGLEY, C.; NAGEL, A.; DAHLN, G.; REIT, C.; MOLANDER, A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. **Journal of Endodontics**, v.32, n.3, p.173–7, 2006.
 58. SHEN, Y.; STOJICIC, S.; HAAPASALO, M. Bacterial Viability in Starved and Revitalized Biofilms: Comparison of Viability Staining and Direct Culture, **Journal of Endodontics**, v.36, n.11, p.1820-1823, 2010.
 59. SILVA, L.A.B. et al. Histopathological evaluation of root canal filling materials for primary teeth. **Brazilian Dental Journal**, v.21, n.1, p.38–45, 2010.
 60. SILVA, L.A.B.; SILVA, R.A.B.; BRANCO, L.G.; NAVARRO, V.P.; NELSON-FILHO, P. Quantitative radiographic evaluation of periapical bone resorption in dog's teeth contaminated with bacterial endotoxin (LPS) associated or not with calcium hydroxide. **Brazilian Dental Journal**, v.19, n.4, p.296-300, 2008.
 61. SIQUEIRA, J.F. JR.; LOPES, H.P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **International Endodontic Journal**, v.32, p.361-369, 1999.
 62. SIQUEIRA, J.F.; RÔÇAS, I.N. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.97, n.1, p.85–94, 2004.

63. STOJICIC, S.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. **Journal of Endodontics**, v.39, n.4, p.473-477, 2013.
64. STUART, C.H.; SCHWARTZ, S.A.; BEESON, T.J.; OWATZ, C.B. Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **Journal of Endodontics**, v.32, n.2, p. 93–98, 2006.
65. TANOMARU, J.M.G.; PAPPEN, F.G.; TANOMARU FILHO M. et al. In vitro antimicrobial activity of different gutta-percha points and calcium hydroxide pastes. **Brazilian Oral Research**, v.21, n.1, p.35-39, 2007.
66. TANOMARU-FILHO, M. et al. Evaluation of pH and calcium ion release of root-end filling materials containing calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 35, n.10, p.1418-1421, 2009.
67. TCHAOU, W.S.; TURNG, B.F.; MINAH, G.E.; COLL, J.A. Inhibition of pure cultures of oral bacteria by root canal filling materials. **Pediatric Dentistry**, v.18, n.7, p.444–449, 1996.
68. TRAIRATVORAKUL, C.; CHUNLASIKAIWAN, S. Success of pulpectomy with zinc oxide-eugenol vs calcium hydroxide/iodoform paste in primary molars: a clinical study. **Pediatric Dentistry**, v.30, n.4, p.303–308, 2008.
69. WEISS, E.; SHAHLAV, M.; FUSS, Z. Assessment of antimicrobial activity of endodontic sealers by a direct contact test. **Endodontic Dental Traumatology**, v.12, n.4, p.179–184, 1996.
70. WRIGHT, K.J.; BARBOSA, S.V.; ARAKI, K.; SPANGBERG, L.S. In vitro antimicrobial and cytotoxic effects of Kri paste and zinc oxide eugenol used in primary tooth pulpectomies. **Pediatric Dentistry**, v.16, n.2, p.102-106, 1994.
71. ZHANG, H.; SHEN, Y.; RUSE, D. HAAPASALO, M. Antibacterial Activity of Endodontic Sealers by Modified Direct Contact Test Against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v.35, n.7, p.1051-1055, 2009.
72. ZHOU, H.M.; SHEN, Y. WANG, Z.J. et al. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. **Journal of Endodontics**, v.39, n.4, p.478-483, 2013.