

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina Dentária



UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Comparação da eficácia antimicrobiana de pastas de medicação
intracanal na eliminação de *Enterococcus faecalis***

Ana Margarida Martins de Sousa

Orientadores:

Professor Doutor António Manuel Pinto Ginjeira

Professora Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de Oliveira

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2022

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina Dentária



UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Comparação da eficácia antimicrobiana de pastas de medicação
intracanal na eliminação de *Enterococcus faecalis***

Ana Margarida Martins de Sousa

Orientadores:

Professor Doutor António Manuel Pinto Ginjeira

Professora Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de Oliveira

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2022

Dissertação formatada de acordo com as normas de publicação da Revista Portuguesa de
Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial

Agradecimentos

Ao Professor Doutor António Ginjeira pela disponibilidade, pela paciência, pelo acompanhamento incansável, pelos ensinamentos ao longo destes meses e por toda a boa disposição.

À Professora Doutora Manuela Oliveira pela simpatia, pela orientação, pela preocupação e por me fazer sempre sentir acolhida na sua instituição.

À Professora Doutora Eva Cunha pela constante disponibilidade, pelo carinho e pela ajuda prestada em todas as etapas laboratoriais.

Aos meus pais por nunca duvidarem de mim e por me ajudarem desde o primeiro dia a conquistar os meus sonhos, sem vocês nada seria possível!

Aos meus avós e familiares pelo apoio e pelo amor.

Ao meu namorado pela compreensão nos momentos mais exaustivos, pelo companheirismo, pela motivação e pelo apoio em todas as minhas decisões.

Aos meus queridos amigos, em especial à Inês Fernandes e ao Nuno Souto, pelas infindáveis horas de estudo, pela motivação, pela amizade e por nunca me deixarem ser vencida pelo cansaço, um obrigado não chega por terem percorrido este caminho ao meu lado.

Ao Jory pela atenção demonstrada, pela motivação e pela persistência em procurar sempre uma solução.

Serei sempre eternamente grata!

Resumo

Objetivo: Comparar *in vitro* e *ex vivo*, a eficácia antimicrobiana de diferentes pastas de medicação intracanal na eliminação de *Enterococcus faecalis*.

Métodos: Recolheram-se 48 dentes humanos unirradiculares, que foram sujeitos a uma preparação químico-mecânica. As amostras foram divididas pelos seguintes grupos: A – Calasept Plus; B – UltraCal XS; C – Hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] puro; D – Pasta bi-antibiótica (ciprofloxacina e metronidazol); E – Controlo negativo; F – Controlo positivo. Avaliou-se preliminarmente a atividade antimicrobiana de cada pasta medicamentosa recorrendo à técnica *spot-on-lawn*. Inocularam-se o interior dos canais radiculares com a estirpe de referência *E. faecalis* ATCC 51299, e incubaram-se as amostras a 37°C durante 24h. Aplicou-se a respetiva pasta e incubaram-se novamente as amostras durante 1 semana. Após esse período, retirou-se a medicação e avaliou-se a presença ou ausência de multiplicação bacteriana às 24, 48 e 72h, segundo um método qualitativo de turvação. Os dados foram analisados através do teste exato de Fisher, sendo o valor de $p < 0,05$ considerado como estatisticamente significativo.

Resultados: Na avaliação *in vitro*, a pasta bi-antibiótica apresentou um melhor halo de inibição, aquando da comparação com as pastas à base de Ca(OH)₂. Nos resultados *ex vivo*, é possível observar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos A, B e C e o grupo D, demonstrando que as pastas à base de Ca(OH)₂ são ineficazes numa correta eliminação de *E. faecalis*, contrastando com a pasta bi-antibiótica.

Conclusão: A melhor eficácia antimicrobiana foi demonstrada pela pasta bi-antibiótica. Contudo, é sempre necessário avaliar individualmente o benefício da utilização de qualquer uma destas pastas medicamentosas.

Palavras-Chave: Eficácia antimicrobiana, *Enterococcus faecalis*, Hidróxido de Cálcio, Medicação Intracanal, Pasta Bi-Antibiótica.

Abstract

Objective: Compare *in vitro* and *ex vivo*, the antimicrobial efficacy of different intracanal medication pastes in eliminating *Enterococcus faecalis*.

Methods: 48 single rooted human teeth were collected and subjected to chemo-mechanical preparation. The samples were divided into the following groups: A – Calasept Plus; B – UntraCal XS; C – Pure calcium hydroxide [Ca(OH)₂]; D – Double antibiotic paste (ciprofloxacin and metronidazole); E – negative control; F – positive control. The antimicrobial activity of each intracanal medication was preliminarily evaluated using spot-on-lawn technique. The root canals were inoculated with the reference strain *E. faecalis* ATCC 51299 and the samples were incubated at 37°C for 24h. The respective paste was applied and the samples were incubated again for 1 week. After this period, the medication was removed and the presence or absence of bacterial multiplication was evaluated at 24, 48 and 72h according to a qualitative turbidity method. Data were analyzed using Fisher's exact test, with a p-value of <0.05 considered as statistically significant.

Results: In the *in vitro* evaluation, the double antibiotic paste showed a better halo of inhibition when compared to the Ca(OH)₂ based pastes. In the *ex vivo* results, it is possible to observe statistically significant differences between groups A, B and C and group D, demonstrating that the Ca(OH)₂ based pastes are ineffective in correctly eliminating *E. faecalis*, in contrast to the double antibiotic paste.

Conclusion: Best antimicrobial efficacy was shown by the double antibiotic paste. However, it is always necessary to evaluate individually the benefit of using any of these intracanal medication.

Keywords: Antimicrobial efficacy, *Enterococcus faecalis*, Calcium Hydroxide, Intracanal Medication, Double antibiotic paste.

Índice

Resumo.....	vii
Abstract	ix
Índice de Tabelas.....	xii
Índice de Gráficos	xii
Índice de Figuras	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
1. Introdução.....	1
2. Materiais e Métodos	3
2.1 Preparação da amostra.....	3
2.2 Preparação da cultura bacteriana.....	4
2.3 Preparação das pastas	4
2.4 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana (<i>in vitro</i>)	4
2.5 Contaminação das amostras	5
2.6 Protocolo de tratamento das amostras infetadas	5
2.7 Análise do tratamento com medicação intracanal.....	5
2.8 Análise Estatística	5
3. Resultados	6
3.1 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana (<i>in vitro</i>)	6
3.2 Avaliação do potencial antimicrobiano (<i>ex vivo</i>).....	6
4. Discussão.....	9
5. Conclusão	11
Referências Bibliográficas	12

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Distribuição dos dentes amostrados pelos diferentes grupos experimentais e de controle.....	3
Tabela 2 - Comparação dos resultados obtidos para os cones de papel sujeitos aos vários grupos de medicação intracanalar	8

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Representação da ocorrência ou ausência de multiplicação bacteriana nos grupos de estudo, comparando os resultados dos cones de papel com os resultados dos dentes.	7
--	---

Índice de Figuras

Figura 1 - Avaliação preliminar (A- Calasept Plus; B- UltraCal XS; C- Ca(OH) ₂ puro; D- Pasta bi-antibiótica) (Original)	6
Figura 2 - Avaliação do potencial antimicrobiano através da visualização da turvação em cones de papel. À esquerda, sem turvação e à direita, com turvação. (Original).....	6
Figura 3 - Avaliação do potencial antimicrobiano através da visualização da turvação em dentes. À esquerda, sem turvação e à direita, com turvação. (Original)	7

Lista de Abreviaturas

% – Por cento

°C – Grau Celsius

BHI – *Brain Heart Infusion*

Ca(OH)₂ – Hidróxido de Cálcio

cm³ – Centímetro cúbico

E. faecalis – *Enterococcus faecalis*

g – Grama

h – Horas

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

n – Amostra

NaCl – Solução salina estéril

NaOCl – Hipoclorito de sódio

1. Introdução

Durante o processo do tratamento endodôntico, as bactérias presentes no canal radicular são o principal fator etiológico no desenvolvimento, propagação e reinfeção de lesões pulpares e peri-apicais. ⁽¹⁾ Considerando a complexa anatomia do canal radicular e a impossibilidade de uma preparação mecânica adequada que permita a completa remoção dos microrganismos, recomenda-se a utilização complementar de agentes antimicrobianos para ajudar na sua remoção e desinfecção. ⁽²⁻⁴⁾

Enterococcus é conhecido por ser intrinsecamente resistente a vários antimicrobianos, tendo a capacidade de adquirir uma resistência adicional aos antibióticos através de elementos genéticos móveis e da formação de biofilmes, constituindo um grande desafio para uma terapêutica antimicrobiana eficaz. ⁽⁵⁾ De facto, a Organização Mundial de Saúde classificou as estirpes de *Enterococcus faecium* como de prioridade elevada para o desenvolvimento de novas estratégias antimicrobianas. ⁽⁶⁾

A preexistência dos microrganismos em apical do canal radicular é a principal causa do insucesso do tratamento endodôntico, sendo *Enterococcus faecalis* a espécie bacteriana mais comumente encontrada, devido à sua capacidade de invasão dos túbulos dentinários bem como os seus mecanismos de defesa. ^(1,2,7,8)

Sabe-se que se o canal permanecer vazio entre consultas, as bactérias replicam-se e a sua concentração aumenta, podendo chegar ao número presente no início do tratamento. ^(9,10) Posto isto, a colocação de medicação intracanal entre consultas contribui para a eliminação eficaz dos microrganismos, promovendo o sucesso do tratamento endodôntico. ^(7,8)

A medicação intracanal tem como principal papel auxiliar na desinfecção dos canais radiculares, tendo um papel secundário nas fases de *cleaning* e *shaping*, não as substituindo. Para justificar a escolha da medicação intracanal a sua atividade antibacteriana tem de ser significativamente superior à sua citotoxicidade, numa concentração adequada permitindo um elevado espectro de atividade. ⁽⁹⁾

Atualmente, a medicação intracanal mais utilizada na prática clínica é o hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂], devido à sua atividade antimicrobiana, capacidade de dissolver o tecido orgânico e de inativar as endotoxinas bacterianas. ^(4,11) Contudo, alguns estudos consideram que

o Ca(OH)_2 é ineficaz na eliminação de *E. faecalis*, uma vez que não consegue penetrar nos túbulos dentinários. ^(2,4,12)

Recentemente a pasta bi-antibiótica, constituída por uma combinação de metronidazol e ciprofloxacina, substituiu a pasta tri-antibiótica que continha minociclina, composto que representava uma preocupação pela sua capacidade de descoloração dentária. ⁽¹³⁻¹⁵⁾

De acordo com a pesquisa efetuada, não existe consenso em relação à escolha da medicação intracanal ideal, havendo necessidade de mais estudos. ^(7,9,12,15) Assim, este estudo teve como objetivo a comparação da eficácia antimicrobiana de diferentes pastas de medicação intracanal na eliminação de *E. faecalis* dos canais radiculares. A hipótese nula é que todas as pastas testadas não apresentem diferenças estatisticamente significativas.

2. Materiais e Métodos

O modelo descrito por Haapasalo and Ørstavik foi modificado e utilizado como protocolo experimental deste estudo. ⁽¹⁶⁾

Entre agosto e outubro de 2021, recolheram-se 48 dentes humanos unirradiculares em clínicas dentárias na região de Lisboa. Os dentes com múltiplos canais, variações anatómicas, curvaturas acentuadas, tratamentos endodônticos ou calcificações foram excluídos. As amostras foram primeiramente desinfetadas através da incubação em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 5% durante 15 minutos, e posteriormente conservadas numa solução salina estéril (NaCl) a 0,9% para manter a hidratação.

2.1 Preparação da amostra

Seccionou-se a coroa dentária com uma broca diamantada, tendo como referência a junção amelocementária, e estabeleceu-se um comprimento canalar e de trabalho de 13 e 12 mm, respetivamente. Em seguida, para a preparação química e mecânica dos dentes, utilizaram-se as limas Small e Primary do sistema Wave One Gold (Dentsply-Maillefer, Suíça) com o intuito de padronizar o lúmen do sistema canalar, sendo que entre cada lima mecanizada efetuou-se a irrigação com NaOCl a 5%. Por fim, removeu-se a *smear layer* através da irrigação com ácido cítrico a 10% durante 1 minuto, e para inativar os irrigantes procedeu-se à irrigação com água destilada durante 30 segundos. As amostras foram distribuídas, de forma aleatória, por 6 grupos experimentais, tal como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos dentes amostrados pelos diferentes grupos experimentais e de controlo

Grupos experimentais	
Grupo A (n=9)	Hidróxido de Cálcio (Calasept Plus, 4U, Nordiska Dental, Suécia, 211002, 2022-07)
Grupo B (n=9)	Hidróxido de Cálcio (UltraCal XS, Ultradentl Products, EUA, BLXYB, 2023-07)
Grupo C (n=9)	Mistura de Hidróxido de Cálcio puro (Dentaflux, Espanha, 011021, 2025-07) com uma solução salina
Grupo D (n=9)	Pasta bi-antibiótica – Mistura de Ciprofloxacina (Nivoflox, Aristo, 29991M1, 2023-11) e Metronidazol (Flagyl, Laboratórios Vitória, 3169, 2025-05) com uma solução salina

Grupos controle	
Grupo E Controlo negativo (n=6)	Incubação em meio <i>Brain Heart Infusion</i>
Grupo F Controlo positivo (n=6)	Incubação com <i>E. faecalis</i>

Posteriormente, selaram-se os ápices e toda a superfície radicular com verniz de unhas, e esterilizaram-se em autoclave a 121°C por 60 minutos.

2.2 Preparação da cultura bacteriana

Utilizou-se uma cultura da estirpe referência *E. faecalis* ATCC 51299, que foi inoculada em meio não seletivo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubada em ambiente anaeróbico por 24 horas a 37°C. ⁽¹⁷⁾ De seguida, realizou-se uma suspensão bacteriana em NaCl a 0.9%, preparada de forma a coincidir com uma turvação de 0,5 na escala de McFarland ($\approx 10^8$ CFU/mL), posteriormente diluída de 1:10 em BHI líquido.

2.3 Preparação das pastas

A pasta de hidróxido de cálcio puro foi preparada misturando 1 g de Ca(OH)_2 com 0,8 mL de NaCl. ⁽¹⁸⁾ Por sua vez, a pasta bi-antibiótica foi preparada misturando 500 mg de metronidazol e 500 mg de ciprofloxacina com 0,75 mL de NaCl. ⁽²⁾

2.4 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana (*in vitro*)

A suspensão bacteriana foi inoculada através da técnica de sementeira em tapete, na superfície de uma placa com meio BHI agár, na qual foram realizados 4 poços com um volume padronizado de 0,12 cm³, para a colocação das substâncias do Grupo A, B, C e D. ⁽¹⁹⁾ A placa foi incubada por 24 horas a 37°C, e no segundo dia observou-se a formação de halos de inibição microbiana ao redor de cada poço, tendo-se medido o valor do diâmetro dos mesmos em mm.

2.5 Contaminação das amostras

Os dentes foram colocados em tubos *Eppendorf* que continham 100 µL de água destilada estéril, de forma a assegurar um ambiente húmido. De seguida, os canais radiculares foram inoculados com a suspensão de *E. faecalis*, à exceção do controlo negativo, que foi inoculado com BHI estéril. Após inoculação, as amostras foram incubadas a 37°C durante 24h.

2.6 Protocolo de tratamento das amostras infetadas

Quanto às amostras do Grupo A, B, C e D, secaram-se os canais com cones de papel e aplicou-se a respetiva pasta medicamentosa até ao comprimento de trabalho recorrendo a um Lêntulo nº25 (Dentsply-Maillefer, Suíça). As amostras do Grupo E e F, não submetidas a qualquer tipo de tratamento, foram transferidas para meio BHI, para realizar um teste de esterilidade e verificar a viabilidade do biofilme, respetivamente. Por fim, as amostras foram incubadas a 37°C por 1 semana, em condições húmidas.

Após esse tempo, a medicação intracanal foi removida por irrigação com 5 mL de NaCl e pela utilização de uma lima K25 (Dentsply-Maillefer, Suíça) em movimentos circunferenciais. ^(15,20)

Os ensaios foram realizados em câmara de fluxo laminar e em triplicado, por forma a evitar a contaminação e assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

2.7 Análise do tratamento com medicação intracanal

Após a remoção do tratamento intracanal, introduziu-se um cone de papel no interior de cada canal, durante 1 minuto, que depois foi introduzido num tubo de ensaio com 5 mL de BHI. Ainda, cada dente foi colocado num *Eppendorf* com 1 mL de BHI.

Os tubos de ensaio e os microtubos foram incubados a 37°C durante 72h, e sujeitos a homogeneização através de um Vortex a cada 24h. Através de um método qualitativo de turvação, avaliou-se às 24, 48 e 72h a multiplicação bacteriana de todos os grupos de estudo.

2.8 Análise Estatística

A análise estatística foi efetuada usando o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*; SPSS Inc, versão 28, USA). Compararam-se os resultados pelo cruzamento de variáveis utilizando o teste exato de Fisher, sendo que os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados

3.1 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana (*in vitro*)

Após 24h de incubação, observou-se que os compostos testados apresentavam diferenças quanto ao seu potencial antimicrobiano. Assim, o grupo A produziu um halo de inibição com 10mm de diâmetro, o grupo B um halo com 11mm, o grupo C um halo com 12mm e o grupo D, que apresentou um melhor resultado, um halo com 37mm.



Figura 1 - Avaliação preliminar (A- Calasept Plus; B- UltraCal XS; C- Ca(OH)_2 puro; D- Pasta bi-antibiótica) (Original)

3.2 Avaliação do potencial antimicrobiano (*ex vivo*)

O potencial antimicrobiano dos diferentes compostos foi avaliado de forma dicotômica quer nos cones de papel (Figura 2), quer nos dentes (Figura 3), através da verificação visual da presença ou ausência de turvação do meio líquido após incubação, sendo que a presença de turvação significa que ocorreu multiplicação bacteriana.

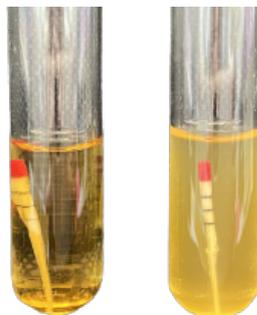


Figura 2 - Avaliação do potencial antimicrobiano através da visualização da turvação em cones de papel. À esquerda, sem turvação e à direita, com turvação. (Original)



Figura 3 - Avaliação do potencial antimicrobiano através da visualização da turvação em dentes. À esquerda, sem turvação e à direita, com turvação. (Original)

Ainda, todos resultados foram registados às 24, 48 e 72h, e esquematizados conforme representado no Gráfico 1.

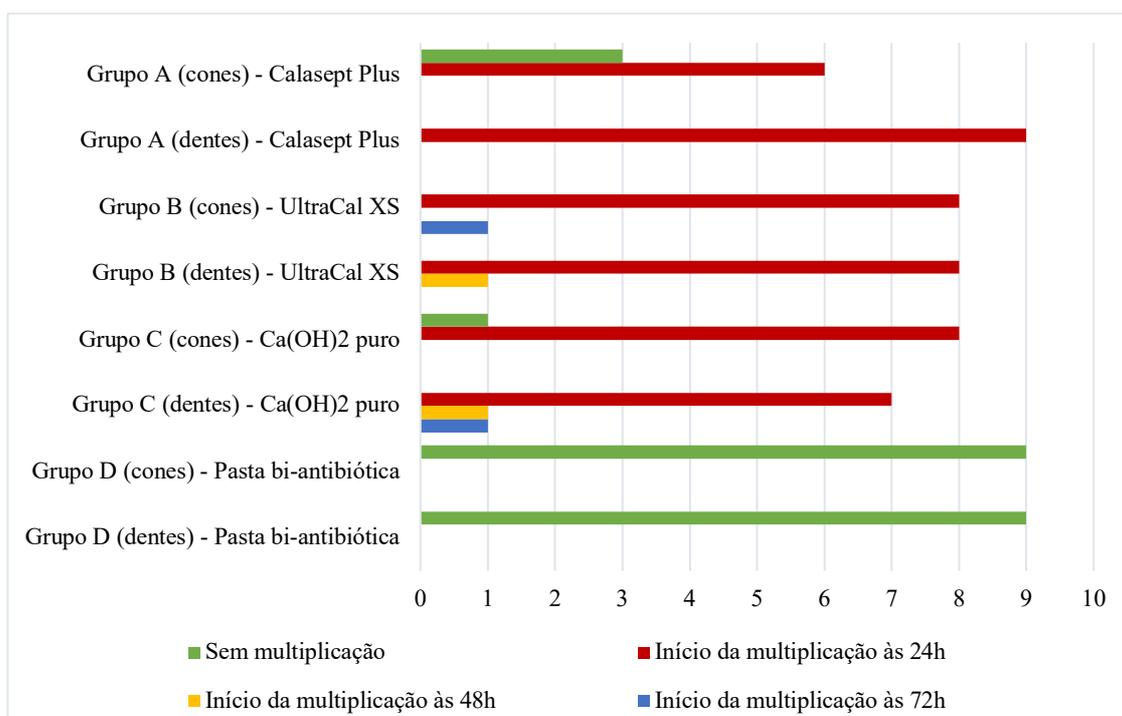


Gráfico 1 - Representação da ocorrência ou ausência de multiplicação bacteriana nos grupos de estudo, comparando os resultados dos cones de papel com os resultados dos dentes.

Relativamente aos resultados obtidos para os cones de papel, descritos na Tabela 2, é possível observar diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos para os grupos A, B e C e o grupo D.

Tabela 2 - Comparação dos resultados obtidos para os cones de papel sujeitos aos vários grupos de medicação intracanal

Medicação Intracanal	Comparação com	Sig. Exata (2 lados)
Grupo A – Calasept Plus	Grupo B – UltraCal XS	0,206
Grupo A – Calasept Plus	Grupo C – Ca(OH) ₂ puro	0,576
Grupo A – Calasept Plus	Grupo D – Pasta bi-antibiótica	0,009
Grupo B – UltraCal XS	Grupo C – Ca(OH) ₂ puro	1,000
Grupo B – UltraCal XS	Grupo D – Pasta bi-antibiótica	<0.001
Grupo C – Ca(OH) ₂ puro	Grupo D – Pasta bi-antibiótica	<0,001

Relativamente aos dentes, foi possível observar que ocorreu sempre multiplicação bacteriana nos grupos A, B e C, contrastando com o grupo D, em que nunca ocorreu multiplicação bacteriana. Posto isto, e tendo em consideração que as variáveis são constantes, as diferenças estatisticamente significativas encontram-se apenas entre os grupos de compostos com Ca(OH)₂ e o grupo da pasta bi-antibiótica ($p < 0,001$).

4. Discussão

O sucesso do tratamento endodôntico está fortemente associado a uma correta preparação químico-mecânica do canal radicular. Contudo, os microrganismos têm a capacidade de sobreviver à preparação do canal radicular, sendo a aplicação de medicação intracanal utilizada como forte aliada na desinfecção e eliminação destes microrganismos. (2,4,9) Assim, a sua aplicação permite reduzir a inflamação, neutralizar os resíduos de tecido pulpar e necrótico, controlar o exsudado apical e prevenir a contaminação entre consultas. (9,21) Em contrapartida, esta apresenta efeitos na estrutura dentária. Segundo um estudo de Yassen *et al.*, o Ca(OH)_2 e as pastas tri e bi-antibióticas afetam prejudicialmente as propriedades mecânicas da dentina radicular, aumentando a suscetibilidade para a fratura. (22)

Ao longo dos últimos anos, várias pastas antimicrobianas têm sido utilizadas, todavia a incidência de infecções resistentes às mesmas parece ter aumentado drasticamente. (2) Como tal, *Enterococcus faecalis* foi selecionado para este estudo por representar a espécie bacteriana mais frequentemente encontrada em casos de infecção secundária persistente no canal radicular, tendo a capacidade de tolerar níveis de pH tão elevados como 11,9. (2,23) A perturbação das condições ambientais faz com que esta bactéria entre num estado viável, mas não cultivável, podendo sobreviver, adaptar-se e manter o seu potencial patogénico. (24)

O objetivo deste estudo foi comparar a eficácia antimicrobiana de diferentes pastas de medicação intracanal na eliminação de *E. faecalis*. É pertinente salientar que a sua eficácia foi avaliada ao fim de 7 dias, pois este período corresponde ao intervalo de tempo recomendado entre consultas durante os procedimentos endodônticos. (15,20)

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que o Ca(OH)_2 demonstra ser ineficaz na completa eliminação de *E. faecalis*, estando em conformidade com vários estudos que referem a sua incapacidade de destruir a estrutura do biofilme. (2,4,7,23,25) A explicação dada pelos autores é que, apesar das suas propriedades antimicrobianas atribuídas ao seu elevado pH e à sua capacidade de libertar iões Ca^{2+} e OH^- , o Ca(OH)_2 necessita de um contacto direto com as bactérias, sendo que *E. faecalis* tem uma capacidade inerente para resistir ao seu elevado pH. Ainda, o Ca(OH)_2 tende a ser neutralizado pelo sistema tampão da dentina e apresenta uma baixa difusão e elevada solubilidade. (18,20)

Por outro lado, a pasta bi-antibiótica permitiu a eliminação eficaz de *E. faecalis*. Esta medicação intracanal parece ser benéfica devido à associação dos antibióticos e à natureza

polimicrobiana das infeções, estando demonstrado que é tão eficaz quanto a pasta tri-antibiótica. ^(2,14,15) Contudo, levanta problemas como a promoção da resistência antibiótica, a reação alérgica ou a toxicidade medicamentosa. ^(2,15,23) Na avaliação do efeito desta pasta sobre as células-tronco da papila apical, um estudo de Ruparel *et al.* sugeriu existir um potencial de toxicidade, levantando uma consideração clínica importante, como a necessidade de padronizar as concentrações de antibiótico. ⁽²⁶⁾ Porém, este é um assunto não totalmente esclarecido, sendo questionável a real relevância clínica desta toxicidade.

No presente estudo considerou-se necessário avaliar a diferença da multiplicação bacteriana tanto nos cones de papel como nos dentes, de modo a verificar a atividade antimicrobiana tanto no lúmen do canal radicular principal como em profundidade nos túbulos dentinários. ⁽²⁵⁾ A sua importância é observada quando os microrganismos permanecem nos túbulos dentinários ou em outros espaços irregulares, podendo proliferar e reinfectar o sistema de canais radiculares. ⁽²⁷⁾ Por conseguinte, nos grupos com Ca(OH)₂, as diferenças entre os resultados obtidos em 4 dos cones de papel quando comparados com os respetivos dentes podem ser explicadas por no lúmen existir um contacto direto com a pasta medicamentosa capaz de eliminar eficazmente *E. faecalis*. No entanto, aquando da observação dos dentes é possível averiguar a presença do microrganismo, o que não acontece nos cones de papel uma vez que estes não conseguem alcançar o interior dos túbulos dentinários, os canais laterais e os canais acessórios. ⁽²⁷⁾

Este estudo apresenta algumas limitações, entre as quais se destacam o não ter sido possível reproduzir a nível laboratorial a totalidade das condições da cavidade oral, nem demonstrar o completo potencial clínico dos materiais testados, bem como o número da amostra ser reduzido. Assim, sugere-se a realização de estudos futuros em meio clínico com um maior tamanho da amostra, e ainda, a investigação de novos materiais que apresentem uma elevada capacidade antimicrobiana e uma baixa toxicidade, como é o exemplo da nanotecnologia. ⁽³⁾

Deste modo, a hipótese nula foi rejeitada pois observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as pastas medicamentosas, em especial entre os grupos com hidróxido de cálcio e o grupo da pasta bi-antibiótica.

5. Conclusão

Nas condições deste estudo, podemos concluir que a pasta bi-antibiótica poderá ser considerada como a medicação intracanal mais eficaz, em especial quando comparada com a pasta de hidróxido de cálcio. Porém, em contexto clínico é sempre necessário avaliar o benefício da utilização de qualquer uma destas pastas, isto porque apesar de não ocorrer uma completa eliminação de *Enterococcus faecalis*, a sua não utilização pode implicar um aumento significativo da colonização por espécies bacterianas.

Assim, e tendo em conta as limitações das pastas medicamentosas aqui estudadas são necessários mais estudos, quer em ambiente clínico, quer de outros materiais e das suas concentrações mais adequadas.

Referências Bibliográficas

1. Siqueira JF. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94:281-293.
2. Zancan R, Calefi P, Borges M, Lopes M, Andrade F, Vivan R *et al.* Antimicrobial activity of intracanal medications against both *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm. *Microsc Res Tech.* 2019;82(5):494-500.
3. Monzavi A, Eshraghi S, Hashemian R, Momen-Heravi F. In vitro and ex vivo antimicrobial efficacy of nano-MgO in the elimination of endodontic pathogens. *Clin Oral Invest.* 2015;19:349-356.
4. Lima R, Guerreiro-Tanomaru J, Faria-Júnior N, Tanomaru-Filho M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *Int End Journal.* 2011;45:311-316.
5. Oliveira M, Tavares M, Gomes D, Touret T, São Braz B, Tavares L *et al.* Virulence traits and antibiotic resistance among enterococci isolated from dogs with periodontal disease. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2016;46:27-31.
6. World Health Organization (WHO). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017. Available online: www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed (accessed on 5 May 2022).
7. Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Mico-Martinez P, Muwaquet-Rodríguez S, Albero-Monteagudo A. Update of the therapeutic planning of irrigation and intracanal medication in root canal treatment. A literature review. *J Clin Exp Dent.* 2019;11(2):e185-193.
8. Lakhani A, Sekhar K.S, Gupta P, Tejolatha B, Gupta A, Kashyap S. Efficacy of Triple Antibiotic Paste, Moxifloxacin, Calcium Hydroxide And 2% Chlorhexidine Gel In Elimination of *E. Faecalis*: An In vitro Study. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(1):ZC06-ZC09.
9. Chong BS, Ford T. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int End Journal.* 1992;25(2):97-106.
10. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res.* 1981;89:321-328.

11. Manfredi M, Figini L, Gagliani M, Lodi G. Single versus multiple visits for endodontic treatment of permanent teeth. *Cochrane*. 2016;12(12):CD005296.
12. Dewi A, Upara C, Krongbaramee T, Louwakul P, Srisuwan T, Khemaleelakul S. Optimal antimicrobial concentration of mixed antibiotic pastes in eliminating *Enterococcus faecalis* from root dentin. *Aust Endod J*. 2020;47(2):273-280.
13. Parhizkar A, Nojehdehian H, Asgary S. Triple antibiotic paste: momentous roles and applications in endodontics: a review. *Restor Dent Endod*. 2018;43(3):e28-44.
14. Sousa M, Xavier P, Cantuária A, Amorim I, Almeida J, Franco O *et al*. Antimicrobial and immunomodulatory in vitro profile of double antibiotic paste. *Int End Journal*. 2021;54(10):1850-1860.
15. Valverde M, Baca P, Ceballos L, Fuentes M, Ruiz-linares M, Ferrer-luque C. Antibacterial efficacy of several intracanal medicaments for endodontic therapy. *Dent Mater J*, 2017;36(3):319-324.
16. Haapasalo M, Orstavik D. In Vitro Infection and of Dentinal Tubules. *J Dent Res*. 1987;66(8):1375-1379.
17. Romani J. Avaliação in vitro e ex vivo da eficácia antimicrobiana de nanopartículas de MgO na eliminação de *Enterococcus faecalis*. Dissertação de Mestrado, 2021.
18. Zancan R, Vivan R, Milanda Lopes M, Weckwerth P, de Andrade F, Ponce J *et al*. Antimicrobial Activity and Physicochemical Properties of Calcium Hydroxide Pastes Used as Intracanal Medication. *JOE*, 2016;42:1822-1828.
19. Cunha E, Trovão T, Pinheiro A, Nunes T, Santos R, Silva JM *et al*. Potential of two delivery systems for nisin topical application to dental plaque biofilms in dogs. *BMC Vet Res*. 2018;14(1):375-385.
20. Prabhakar A, Hadakar G, Raju O. Comparative evaluation of pH and antibacterial effect of various calcium hydroxide combinations on *E. faecalis* and its effect on root strength: An in vitro study. *Cont Clinic Dent*, 2012;3(1):42-47.
21. Mohammadi Z, Dummer P. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int End Journal*. 2011;44:697-730.
22. Yassen G, Chu T, Eckert G, Platt J. Effect of Medicaments Used in Endodontic Regeneration Technique on the Chemical Structure of Human Immature Radicular Dentin: An In Vitro Study. *JOE*. 2013;39(2):269-273.
23. Adl A, Shojaee N, Motamedifar M. A Comparison between the Antimicrobial Effects of Triple Antibiotic Paste and Calcium Hydroxide Against *Entrococcus Faecalis*. *Iran Endod J*. 2012;7(3):149-155.

24. Lleó M, Tafi M, Canepari P. Nonculturable *Enterococcus faecalis* Cells Are Metabolically Active and Capable of Resuming Active Growth. *Syst Appl Microbiol.* 1998;21(3):333-339.
25. Devaraj S, Jagannathan N, Neelakantan P. Antibiofilm efficacy of photoactivated curcumin, triple and double antibiotic paste, 2% chlorhexidine and calcium hydroxide against *Enterococcus fecalis* in vitro. *Sci Rep.* 2016;6(1):24797.
26. Ruparel N, Teixeira F, Ferraz C, Diogenes A. Direct Effect of Intracanal Medicaments on Survival of Stem Cells of the Apical Papilla. *JOE.* 2012;38(10):1372-1375.
27. Câmara AC, de Albuquerque MM, Aguiar CM, de Barros Correia AC. In vitro antimicrobial activity of 0.5 %, 1 %, and 2.5 % sodium hypochlorite in root canal instruments with the ProTaper Universal system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108:55–56.