

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina Dentária



Eficácia antimicrobiana de medicação intracanal de
nanopartículas MgO-400 – estudo *ex vivo*

Tânia Raquel Antunes Nunes

Dissertação orientada por:

Professor Doutor António Manuel Pinto Ginjeira

Professora Doutora Eva Sofia Gonçalves da Cunha

Dissertação

Mestrado em Medicina Dentária

2023

Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina Dentária



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

Eficácia antimicrobiana de medicação intracanal de
nanopartículas MgO-400 – estudo *ex vivo*

Tânia Raquel Antunes Nunes

Dissertação orientada por:

Professor Doutor António Manuel Pinto Ginjeira

Professora Doutora Eva Sofia Gonçalves da Cunha

Dissertação

Mestrado em Medicina Dentária

2023

Dissertação formatada com as normas de publicação da Revista Brasileira de
Odontologia

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor António Ginjeira, por despertar em mim o interesse pela Endodontia, pela boa disposição, bondade e paciência, que marcaram o meu percurso na FMDUL,

À Professora Doutora Eva Cunha, por me ter introduzido à fascinante área da Microbiologia, pelo acompanhamento incansável e ajuda dentro e fora do laboratório,

A vossa dedicação e orientação foram fundamentais no desenvolvimento deste trabalho, que realizei com imenso gosto e marcou a minha jornada académica.

À Professora Doutora Karla Corte-Real, pela sua amabilidade, preocupação e constante disponibilidade para ajudar tanto neste trabalho, como ao longo dos passados anos,

À Professora Doutora Manuela Oliveira, pela simpatia e por me ter recebido tão bem na sua instituição, onde senti que também pertencia,

Aos Drs. Ana Margarida Sousa e Jory Romani, pela disponibilidade e conselhos ao longo destes meses,

Aos amigos que a FMDUL me deu, em especial à minha dupla, Inês Esteves, que partilhou comigo a etapa mais desafiante do curso, à Sofia Matos, Beatriz Almeida, Carolina Flamino e Ana Mole, todas capazes de iluminar até os dias mais exaustivos, vocês tornaram estes 5 anos memoráveis!

Obrigada a todos por terem feito parte do meu percurso académico,

“Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

Aos meus pais, pelo amor e apoio constante, por acreditarem em mim em todas as circunstâncias, desde sempre,

Ao meu irmão, que testa a minha paciência diariamente (o que para ele é um ato de amor e carinho),

Aos meus avós, tios e priminha, também pelo amor, carinho e presença na minha vida,

Ao meu namorado, pelo amor e carinho, pelo apoio imensurável nos melhores e nos piores momentos, que foi fundamental para que superasse todos os obstáculos (mas também por me ajudar a escolher dentes e na estatística deste trabalho),

À minha prima, Dra. Filipa Raquel por me ter guardado tantos dentes e por todo o apoio ao longo destes 5 duros anos,

Sem vocês esta jornada não teria sido possível,

Para sempre agradecida!

RESUMO

Objetivo: Comparar a eficácia antimicrobiana de medicação intracanalar constituída por nanopartículas de óxido de magnésio (MgO) com pasta de hidróxido de cálcio (HC), pasta bi-antibiótica (PBA), e com o veículo de administração incorporado nas pastas, o polietilenoglicol (PEG), face à *Enterococcus faecalis*.

Métodos: Uma amostra constituída por 54 dentes foi preparada, esterilizada e dividida nos seguintes grupos (n=9): (A) – pasta nano-MgO; (B) – HC comercial; (C) – PBA (ciprofloxacina e metronidazol); (D) – PEG; (-) – controlo negativo; (+) – controlo positivo. A avaliação preliminar *in vitro* do potencial antimicrobiano foi realizada através do teste *spot-on-lawn* e difusão em poço. Adicionalmente, determinou-se a concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB) das nano-MgO. Na fase *ex vivo*, os dentes foram inoculados com a estirpe de referência *E. faecalis* ATCC 51299 e incubados a 37°C por 24 h, ao fim das quais foram colocados os compostos. Após sete dias de incubação as pastas foram removidas e a multiplicação bacteriana foi avaliada às 24, 48 e 72 h pela observação de turvação do meio de cultura e medição da densidade ótica às 24 h. Os resultados foram avaliados através do teste exato de Fisher, sendo $p < 0,05$ considerado como estatisticamente significativo.

Resultados: Nos testes *in vitro* verificou-se que a PBA apresentou o maior halo de inibição. As nano-MgO apresentaram uma CMI de 0,78 mg/mL e uma CMB superior a 2,5 mg/mL. Na análise *ex vivo*, a PBA apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos restantes compostos e uma percentagem de inibição bacteriana superior (98,33%).

Conclusões: Nas condições deste estudo constatou-se que as nanopartículas de MgO apresentam um potencial antimicrobiano inferior à PBA, tanto *in vitro* como *ex vivo*. Sugerem-se estudos no âmbito clínico com nano-MgO, considerando o revestimento com PEG e análise da microestrutura das nanopartículas, bem como a sua aplicação noutras fases do tratamento endodôntico.

Palavras-chave: Nanopartículas; Óxido de Magnésio; Medicação Intracanal; *E. faecalis*.

ABSTRACT

Aim: To compare the antimicrobial activity of an intracanal paste composed by magnesium oxide (MgO) nanoparticles with calcium hydroxide (CH), a bi-antibiotic paste (BAP) and polyethylene glycol (PEG) against *E. faecalis*.

Methods: A sample of 54 teeth was prepared, sterilized, and divided into the following groups (n=9): (A) – nano-MgO paste; (B) – commercial CH; (C) – BAP (ciprofloxacin and metronidazole); (D) – PEG; (-) – negative control; (+) – positive control. The preliminary *in vitro* evaluation of the antimicrobial potential was performed through a spot-on-lawn and well diffusion test. Additionally, the minimum inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) concentrations for the MgO nanoparticles were determined. For the *ex vivo* experiment, teeth were inoculated with the reference strain *E. faecalis* ATCC 51299 and incubated at 37°C for 24 hours. After that, the respective compounds were applied. The pastes were removed after seven days of incubation, and their antimicrobial activity was evaluated at 24, 48 and 72 h, by observing the teeth and paper points tubes' turbidity and through the optical density at 24 h. The data were analysed using Fisher's exact test, and a p-value <0.05 was considered statistically significant.

Results: *In vitro* tests showed that BAP presented a bigger inhibition zone halo. The MgO nanoparticle solution presented a MIC of 0.78 mg/mL and a MBC superior to 2.5 mg/mL. In the *ex vivo* evaluation, BAP showed statistically significant results, comparing with the other compounds, besides a higher percentage of bacterial inhibition (98.33%).

Conclusion: In the conditions of this study, it was found that the antimicrobial activity of the MgO nanoparticle paste fell below the expectations, and the BAP exhibited superior antimicrobial activity compared to the other pastes. Clinical studies are suggested, also the coating of the nano-MgO with PEG and the microstructure analysis should be performed, these studies may be focused on other treatment phases.

Keywords: Nanoparticles; Magnesium Oxide; Intracanal Medication; *E. faecalis*.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	4
Preparação da amostra.....	4
Preparação da suspensão bacteriana.....	5
Solução Nano-MgO.....	6
Pasta de hidróxido de cálcio	6
Polietilenoglicol	6
Pasta bi-antibiótica	6
Avaliação preliminar <i>in vitro</i> do potencial antimicrobiano dos compostos	6
a) Ensaio de <i>spot-on-lawn</i> e difusão em poço	6
b) Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB) das partículas de MgO.....	7
Avaliação <i>ex vivo</i> do potencial antimicrobiano dos compostos testados	7
Contaminação dos dentes	7
Protocolo de tratamento dos grupos experimentais	8
Remoção da medicação intracanal	8
a) Avaliação da atividade antimicrobiana	8
b) Avaliação da atividade antimicrobiana por espectrofotometria.....	8
Análise estatística.....	8
RESULTADOS	10

Avaliação preliminar <i>in vitro</i> do potencial antimicrobiano.....	10
a) Ensaio de <i>spot- on-lawn</i> e <i>well-diffusion</i>	10
b) Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB) das nanopartículas de MgO	10
Avaliação <i>ex vivo</i> do potencial antimicrobiano	11
a) Avaliação visual da atividade antimicrobiana	11
b) Avaliação da atividade antimicrobiana por espectrofotometria.....	12
DISCUSSÃO	14
CONCLUSÕES	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
ANEXOS.....	22
Anexo I – Parecer 202001 da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa	22

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição da amostra pelos grupos experimentais e de controlo	5
Tabela 2 - CMI e CMB da solução de nano-MgO face a <i>E. faecalis</i> (*n.d.: não determinado).....	10
Tabela 3 – Comparação dos resultados visuais obtidos para os diferentes grupos experimentais às 24 h (dentes).....	12

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Número absoluto de tubos com e sem turvação observados após 24, 48 e 72 h, comparando os grupos de dentes com os de cones de papel.	12
Gráfico 2 – Percentagem de inibição bacteriana para a amostra de dentes e de cones, calculada através da OD ₆₀₀ , comparando com os grupos de controlo (dentes e cones de papel).....	13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Zonas de inibição após 24 h de incubação (A: solução de 5 mg/mL nano-MgO; B: hidróxido de cálcio; C: pasta bi-antibiótica; D: polietilenoglicol) (original).	10
Figura 2 – Multiplicação bacteriana observada nas concentrações da solução de nano-MgO testadas aquando da determinação da CMB (original).	11
Figura 3 – Comparação de turvação: neste ensaio verificou-se multiplicação bacteriana no controlo positivo e nos grupos A, B e D, tendo o controlo negativo e o grupo C apresentado ausência de multiplicação bacteriana, com meio de cultura límpido. À direita encontram-se os controlos dos cones de papel num dos ensaios (original).	11

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI – *Brain and Heart Infusion*

CE – Comprimento endodôntico

CMB – Concentração Mínima Bactericida

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CT – Comprimento de trabalho

E. faecalis – *Enterococcus faecalis*

h – Horas

HC – Hidróxido de Cálcio

JAC – Junção amelocementária

m – Massa

MgO – Óxido de Magnésio

NaCl – Cloreto de sódio

NaOCl – Hipoclorito de sódio

nano-MgO – Nanopartículas de Óxido de Magnésio

PA – Periodontite apical

PAP – Periodontite apical pós-tratamento

PBA – Pasta Bi-antibiótica

PEG – Polietilenoglicol

OD₆₀₀ – Densidade ótica a 600 nm

UFC – Unidade Formadora de Colônias

v - Volume

INTRODUÇÃO

A Endodontia é a área da medicina dentária especializada na fisiologia e patologia da polpa, que se foca no diagnóstico, prevenção e tratamento das patologias pulpares e perirradiculares.⁽¹⁾

A infecção endodôntica é causada por vários agentes etiológicos, incluindo fungos, *archaea*, vírus, mas sobretudo bactérias, na forma de biofilme aderido às paredes dos canais radiculares.⁽²⁾ Ainda que mais de 500 espécies bacterianas tenham sido detetadas nestas infeções, apenas 20 a 30 pertencem ao seu microbioma.⁽²⁾

A periodontite apical (PA) é uma condição inflamatória dos tecidos perirradiculares causada predominantemente por bactérias estritamente anaeróbias.^(2,3) Em resposta a esta condição, o tratamento endodôntico tem em vista a redução do microbioma patogénico, através do desbridamento, desinfeção e adequada obturação.⁽⁴⁾ A preparação químico-mecânica é considerada a fase mais importante para erradicar a PA, uma vez que consiste na remoção do agente etiológico, dos seus subprodutos e do tecido necrótico que funciona como substrato bacteriano.^(5,6)

Ainda assim, o tratamento endodôntico tem uma taxa de sucesso que varia entre 86 e 98%.^(5,7) O sucesso é caracterizado pela eliminação dos sinais e sintomas de doença, tais como a dor, radiolucidez periapical, fístula, inflamação e, de um ponto de vista histológico, a cicatrização perirradicular.^(2,5,7,8)

A etiologia da periodontite apical pós-tratamento (PAP) inclui bactérias estritamente anaeróbias e anaeróbias facultativas que prevaleceram nos canais tratados, ou que provêm de infeções intra ou extrarradiculares.⁽²⁾ A PAP é considerada emergente, persistente ou recorrente, sendo a sua forma persistente a mais comum.^(6,9)

As bactérias resistentes ao tratamento podem ser encontradas em especificidades anatómicas, tais como as ramificações apicais, istmos ou canais laterais que não foram abrangidos pela instrumentação e desinfeção.⁽²⁾ Todavia, a PAP nem sempre ocorre em dentes sujeitos a um tratamento insatisfatório – foi reportado que 5 a 15% destes casos ocorrem em dentes sujeitos a um tratamento adequado.⁽⁹⁾ No que toca a infeções secundárias extrarradiculares, estas têm origem na contaminação bacteriana, enquanto as infeções secundárias intrarradiculares surgem devido à microinfiltração que promove a multiplicação das bactérias usualmente existentes em níveis compatíveis com a saúde.⁽⁴⁾

Apenas alguns agentes patogênicos têm a capacidade de sobreviver e adaptar-se a condições adversas, como as de um canal submetido ao desbridamento e desinfecção, destes microrganismos destaca-se a *Enterococcus faecalis*, detetada em 77% das infecções refratárias.^(5,10)

Para sobreviver em condições adversas, os microrganismos sobreviventes precisam de uma fonte de nutrientes, como o tecido necrótico remanescente ou o exsudado inflamatório em caso de obturação inadequada.^(5,6,9) Resumidamente, as bactérias persistentes influenciam o prognóstico endodôntico se entrarem num estado de baixa atividade metabólica, que permite a sobrevivência em diferentes condições (tensão de oxigênio, privação de nutrientes, flutuações de temperatura e a espécies coexistentes), se estas se multiplicam até despoletarem inflamação dos tecidos, se obtêm acesso aos tecidos periapicais, ou se libertam fatores de virulência.⁽⁶⁾ A *E. faecalis*, classificada como uma bactéria gram-positiva anaeróbia facultativa, quando presente em larga escala é de complicada eliminação devido à sua capacidade de formar biofilme em condições extremas e de invadir os túbulos dentinários através de fatores de virulência que permitem adesão colagénica, resistindo assim à desinfecção e até à medicação intracanal.⁽¹¹⁾

O uso de medicação intracanal é apropriado quando o nível bacteriano não é compatível com a cicatrização, sendo recomendável o uso deste tipo de medicação entre consultas, para que os canais não permaneçam vazios e propensos à multiplicação bacteriana.^(12,13) Por sua vez, os agentes antimicrobianos usados devem apresentar um largo espectro de atividade e manter-se em contacto com as bactérias numa concentração apropriada.⁽¹³⁾

O hidróxido de cálcio (HC) é usado frequentemente como medicação intracanal, a sua eficácia antimicrobiana advém do seu pH elevado (12,5), que permite a disrupção das membranas celulares e proteínas bacterianas.⁽⁴⁾ Por outro lado, o HC contribui para a degradação do colagénio, comprometendo mecanicamente a dentina e não é eficaz contra *E. faecalis*, entre outras bactérias.⁽¹³⁻¹⁵⁾ Para além do mencionado, de um ponto de vista clínico, a remoção de HC dos canais é considerada desafiante.

A pasta bi-antibiótica (PBA) é constituída por ciprofloxacina, agente bactericida que tem ação sobre bactérias gram-negativas, e metronidazol, agente antimicrobiano que atua sobre bactérias anaeróbias e protozoários.⁽¹⁶⁾ Esta pasta surgiu como uma alternativa à pasta tri-antibiótica, constituída adicionalmente por minociclina, que tinha a desvantagem de descolorar os dentes.^(16,17) A PBA contribui excessivamente para a desmineralização

dentinária devido ao seu pH reduzido (2,9), para além da sua remoção ser também considerada desafiante e a retenção nos canais poder comprometer o selamento dos mesmos.^(14,16,18)

O veículo de administração usado nas pastas intracanales tem um papel crucial, uma vez que é responsável pelo transporte do agente ativo para os canais, influenciando a sua velocidade de difusão.⁽¹⁹⁾ De acordo com Carreira, C. *et al.* (2007), o polietilenoglicol (PEG) apresentou uma penetração dentinária promissora em comparação a outros veículos comuns.⁽¹⁹⁾

A nanotecnologia tem sido aplicada na medicina, genética e farmacologia, nomeadamente na antibioterapia.⁽²⁰⁾ As nanopartículas de óxidos metálicos têm demonstrado um efeito antimicrobiano interessante face a bactérias gram-positivas e negativas, mesmo quando em baixas concentrações, adicionalmente, têm-se demonstrado biocompatíveis com células mamíferas, sendo que o seu efeito deve-se à carga positiva e vasta área de superfície, o que permite a forte interação com as paredes celulares bacterianas.⁽¹⁰⁾ Todas estas descobertas têm trazido a atenção para nanopartículas de óxidos metálicos na área da endodontia.

Em comparação com o óxido-de-titânio, nano-prata e nano-cobre, as nanopartículas de óxido de magnésio (MgO) exibem as vantagens de ter uma toxicidade mínima e de serem facilmente produzidas a partir de precursores pouco dispendiosos.⁽¹⁰⁾ As partículas nano-MgO já foram testadas como irrigante canal, contudo, a sua eficácia face à *E. faecalis*, demonstrou-se inferior à do *gold standard*, hipoclorito de sódio (NaOCl) a 5,25%.⁽²¹⁾

O objetivo deste estudo *ex vivo* é de avaliar a atividade antimicrobiana de uma medicação intracanal de nanopartículas de MgO-400 de 20 nm de dimensão, bem como de comparar essa atividade com a de pastas usadas comumente (HC e PBA) e com o veículo usado para elaborar as pastas (PEG). Esta atividade antimicrobiana será testada através da aplicação das pastas numa infeção intracanal *ex vivo* causada por *E. faecalis*.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente protocolo foi apresentado ao Conselho de Ética da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa, tendo sido obtido um parecer favorável à realização do estudo (Anexo I).

Uma amostra constituída por 54 dentes monorradiculares, que apresentassem apenas um canal, não calcificado, sem curvas acentuadas e sem tratamento endodôntico prévio foi obtida a partir de várias clínicas localizadas em Lisboa. Cada dente foi desinfetado com uma solução de NaOCl a 5% e mantido em ambiente húmido.⁽²¹⁻²³⁾

Preparação da amostra

Os dentes foram radiografados de modo a verificar o cumprimento dos critérios acima mencionados, seccionaram-se as coroas dos dentes aceites pela junção amelo-cementinária (JAC) com recurso a uma broca diamantada e estabeleceu-se a permeabilidade dos canais com uma lima K 10 (*Dentsply-Maillefer*, Suíça).⁽²¹⁻²³⁾ O comprimento endodôntico (CE) e de trabalho (CT) estipulados foram 13 e 12 mm, respetivamente, estas medidas foram obtidas através da colocação da lima K 10 no canal até exceder o limite da raiz, que então foi ajustada de modo a coincidir com o ápex – ajustou-se o *stop* de borracha e transferiu-se essa medida para uma régua.⁽²¹⁾ Nesta fase excluíram-se os dentes não permeáveis e os de CE inferior a 13 mm, sendo os de maior comprimento desgastados até ao comprimento estipulado.^(21,23)

O cálculo dentário foi removido e os canais foram sujeitos à preparação químico-mecânica. Após a via da permeabilidade ter sido estabelecida com limas K 10 e 15 (*Dentsply-Maillefer*, Suíça), os canais foram preparados com limas *Small* (ISO 020) e *Primary* (ISO 025) do Sistema *WaveOne Gold* (*Dentsply-Maillefer*, Suíça).^(21,23) Entre cada lima, os canais foram irrigados com NaOCl a 5% (v/v), com 1 mL de ácido cítrico a 10% (m/v) no final da instrumentação durante um minuto para remover a *smear layer* e finalmente com água destilada por 30 segundos, de forma a inativar os irrigantes.^(21,23) A irrigação foi realizada através do método tradicional com seringa e agulha.^(21,23) As raízes foram revestidas com duas camadas de verniz de unhas e esterilizadas em autoclave a 120°C por 20 minutos.⁽²¹⁻²³⁾

A amostra foi dividida em seis grupos, cada grupo incluindo 9 dentes (n=9), tal como descrito na tabela que se segue.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	
Grupo A (n=9)	Pasta de nanopartículas de MgO-400 de 20 nm a 99% (<i>GetnanoMaterials</i> [®] , França) (com polietilenoglicol (<i>Macrogol</i> , <i>Generis</i> [®] Farmacêutica, MAM2201104A, 2025-02))
Grupo B (n=9)	Hidróxido de cálcio (<i>Calasept Plus</i> , 4U, <i>Nordiska Dental</i> , Suécia, 222239, 2023-05)
Grupo C (n=9)	Pasta bi-antibiótica – mistura de ciprofloxacina (<i>Nivoflox</i> , <i>Aristo</i> , 29991Mi, 2023-11) e metronidazol (<i>Flagyl</i> , <i>Laboratórios Vitória</i> , 3182, 2026-08) (com polietilenoglicol (<i>Macrogol</i> , <i>Generis</i> [®] Farmacêutica, MAM2201104A, 2025-02))
Grupo D (n=9)	Solução de polietilenoglicol (<i>Macrogol</i> , <i>Generis</i> [®] Farmacêutica, MAM2201104A, 2025-02)
GRUPOS DE CONTROLO	
Controlo negativo (n=9)	Incubação com meio <i>Brain Heart Infusion</i> (BHI), (<i>VWR Chemicals</i> , Bélgica)
Controlo positivo (n=9)	Incubação com suspensão de <i>E. faecalis</i> (ATCC 51299)

Tabela 1 – Distribuição da amostra pelos grupos experimentais e de controlo

Testou-se a eficácia de três medicações intracanalares para avaliar o seu potencial antimicrobiano e do veículo utilizado na execução das mesmas, de forma a determinar se este tem efeito antimicrobiano contra a *E. faecalis*.⁽¹⁹⁾

Todos os procedimentos adiante descritos foram realizados em câmara de fluxo laminar, em triplicado e em dias independentes, de forma a evitar erros laboratoriais, contaminação e garantir a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

Preparação da suspensão bacteriana

A estirpe de referência *E. faecalis* ATCC 51299 foi inoculada numa placa com meio não-seletivo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubada aerobicamente a 37 °C por 24 horas.

A cultura bacteriana obtida foi utilizada para realização de uma suspensão bacteriana com uma turvação de 0,5 na escala de McFarland ($\approx 10^8$ UFC/mL), em 0,9% de cloreto de sódio (NaCl). A suspensão foi diluída a 1:10 ($\approx 10^7$ CFU/mL) em meio BHI líquido (*VWRChemicals*, Bélgica), suspensão esta que foi utilizada nos ensaios *in vitro* e *ex vivo*.

Solução Nano-MgO

Foram obtidas partículas NanoMgO-400 de 20 nm a 99% da companhia GetNanoMaterials[®], as quais foram mantidas segundo as instruções do fornecedor (a temperatura ambiente e meio seco). Este produto foi esterilizado em estufa a 180°C por 90 minutos.⁽²⁴⁾ Subsequentemente, produziu-se uma solução de 5 mg/mL através da diluição em água ultrapura (*Milli-Q[®] Integral System*, Millipore, EUA), que foi submetida a um banho de ultrassons (*Grant, Ultrasonic Bath, MXB14*, Reino Unido), a 50 kHz, durante 15 minutos.^(21,25)

Pasta de hidróxido de cálcio

Utilizou-se uma pasta de hidróxido de cálcio comercial (*Calasept Plus, 4U, Nordiska Dental*, Suécia, 222239, 2023-05).

Polietilenoglicol

As partículas de PEG foram diluídas de acordo com as instruções do fornecedor (80 mg/mL) em água ultrapura (*Milli-Q[®] Integral System*, Millipore, EUA). Posto isto, a solução foi esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Pasta bi-antibiótica

A pasta foi produzida através de 500 mg de ciprofloxacina e 500 mg de metronidazol, esmagados e envolvidos em 1 mL da solução de PEG previamente preparada.

Avaliação preliminar *in vitro* do potencial antimicrobiano dos compostos

A metodologia que se segue foi realizada em triplicado, em câmara de fluxo laminar, em três dias independentes, por forma a evitar erros laboratoriais, contaminação e garantir a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

a) Ensaio de *spot-on-lawn* e difusão em poço

A suspensão bacteriana de *E. faecalis*, como anteriormente descrita, foi preparada e inoculada uniformemente em tapete, com uma zaragatoa, na superfície das placas de BHI agar.^(21,23) A técnica de *spot-on-lawn* foi utilizada para a avaliação da atividade

antimicrobiana de soluções, enquanto a técnica de difusão em poço foi utilizada para a avaliação da atividade antimicrobiana das pastas. As pastas foram colocadas em poços de 0,12 cm³, previamente preparados e na técnica de *spot-on-lawn*, procedeu-se à colocação de 10 µL de cada solução na superfície do agar.⁽²³⁾ Ambas as placas foram incubadas a 37°C por 24 h, após as quais os halos/diâmetros de inibição antimicrobiana foram medidos.

b) Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB) das partículas de MgO

A solução de nano-MgO foi sujeita a um protocolo de determinação da CMI e CMB.⁽²⁵⁾

Esta análise foi conduzida numa placa de cultura de 96 poços (*VWR Chemical, Tissue culture plate*, Bélgica). Para este protocolo, 50 µL de diluições seriadas da solução de 5 mg/mL de nano-MgO foram distribuídas pelos poços da microplaca e cada poço foi preenchido também com 50 µL da suspensão de *E. faecalis* a 10⁷ CFU/mL diluída em meio BHI líquido. Adicionalmente, foram incluídos no ensaio experimental um controlo negativo (apenas meio) e positivo (suspensão bacteriana). As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Após a incubação, a CMI foi determinada através da leitura de densidade ótica com recurso a espectrofotómetro (*FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Alemanha*) no comprimento de onda de 600 nm. O valor de CMB foi determinado através da inoculação de 3 µL de cada poço das microplacas em meio BHI agar. Placas estas incubadas a 37°C por 24 horas. A CMB foi determinada como a concentração mais baixa de nano-MgO onde não foi observada multiplicação bacteriana em placa.⁽²⁶⁾

Avaliação *ex vivo* do potencial antimicrobiano dos compostos testados

A metodologia que se segue foi realizada em triplicado, em câmara de fluxo laminar, em três dias independentes, por forma a evitar erros laboratoriais, contaminação e garantir a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

Contaminação dos dentes

Todas as raízes foram inoculadas com 10 µL de suspensão bacteriana de *E. faecalis* preparada com BHI líquido, à exceção dos dentes correspondentes ao controlo negativo, que foram inoculados com 10 µL de meio líquido BHI apenas.

Cada dente foi colocado num tubo estéril de 1,5 mL, devidamente legendado, com 100 µL de água ultrapura (*Milli-Q® Integral System, Millipore, EUA*). A amostra foi então incubada a 37°C por 24 horas.

Protocolo de tratamento dos grupos experimentais

Os canais das raízes dos grupos experimentais foram secos com cones de papel estéreis antes da colocação da medicação, as pastas foram colocadas até ao CT, na tabela 1 apresentam-se os grupos experimentais e as respetivas pastas aplicadas. As pastas dos grupos A e C foram colocadas utilizando lântulos #025 (*Dentsply-Maillefer, Suíça*), a pasta do grupo B foi colocada com o aplicador do fabricante e a solução do grupo D foi pipetada para os canais. Todos os dentes foram transferidos para novos tubos estéreis incubados a 37°C durante sete dias.^(27,28)

Remoção da medicação intracanal

Ao fim de 7 dias de incubação, todos os dentes foram irrigados com 2,5 mL de NaCl com uma seringa estéril e as pastas foram então removidas com limas estéreis K 25 (*Dentsply-Maillefer, Suíça*) através de movimentos circunferenciais.⁽²³⁾

Introduziram-se cones de papel estéreis nos canais durante 1 minuto, os mesmos cones foram transferidos para tubos de ensaio estéreis com 4 mL de meio de cultura BHI líquido e os dentes para tubos com 1,5 mL do mesmo meio. Estes tubos foram incubados a 37°C durante 72 horas.

a) Avaliação da atividade antimicrobiana

Os tubos foram observados após 24, 48 e 72 h de incubação, foi considerado que a existência de turvação observável indicava multiplicação bacteriana.

b) Avaliação da atividade antimicrobiana por espectrofotometria

A densidade ótica da amostra foi medida através de um espectrofotómetro (*FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Alemanha*) com comprimento de onda definido para 600 nm (OD_{600}), após 24h de incubação. O valor observado nos poços teste foram comparados com os valores dos controlos positivos para identificação de inibição antimicrobiana.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada em *software* MATLAB (*The Math Works Inc., versão R2022b, EUA*) e os gráficos foram realizados com Microsoft Excel (*Microsoft Corporation, versão 2304, EUA*). Os resultados foram comparados através do

cruzamento de dados pelo teste exato de Fisher, sendo considerados valores de $p < 0,05$ estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Avaliação preliminar *in vitro* do potencial antimicrobiano

a) Ensaio de *spot-on-lawn* e *well-diffusion*

Após 24 horas de incubação, foi observado que todos os compostos testados apresentaram diferenças no halo de inibição antimicrobiano, refletindo possíveis diferenças no seu potencial antimicrobiano. No grupo A foi observado um halo opaco de ligeira inibição, nos grupos B e C observaram-se halos de 14 e 42 mm, respectivamente, e no grupo D não foi observada evidência de inibição.

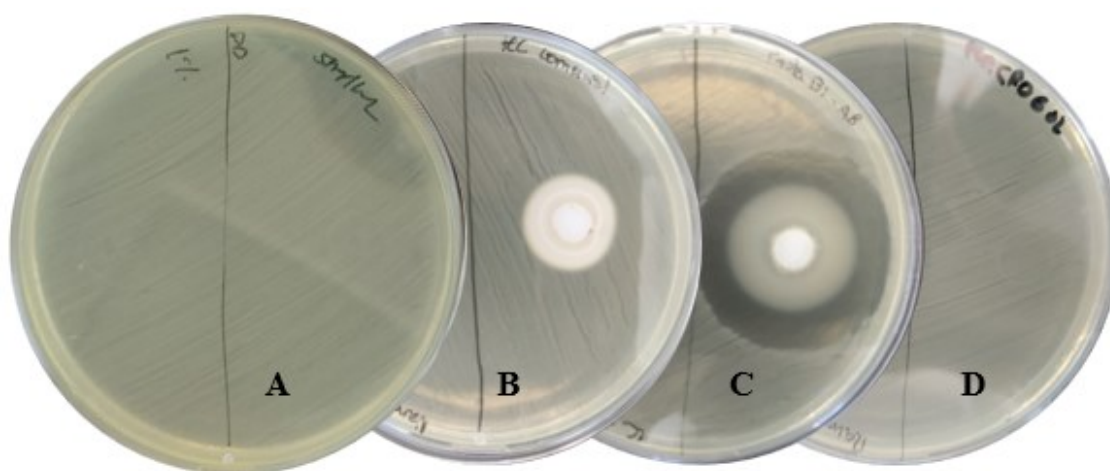


Figura 1 – Zonas de inibição após 24 h de incubação (A: solução de 5 mg/mL nano-MgO; B: hidróxido de cálcio; C: pasta bi-antibiótica; D: polietilenoglicol) (original).

b) Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e bactericida (CMB) das nanopartículas de MgO

Os valores obtidos para a CMI e CMB são apresentados na tabela que se segue, verifica-se que o valor de CMB não foi possível de determinar, sendo superior à concentração máxima testada.

CMI	CMB	CMB/CMI
0,78 mg/mL (σ 0,47 mg/mL)	> 2.5 mg/mL	*n.d.

Tabela 2 - CMI e CMB da solução de nano-MgO face a *E. faecalis* (*n.d.: não determinado)

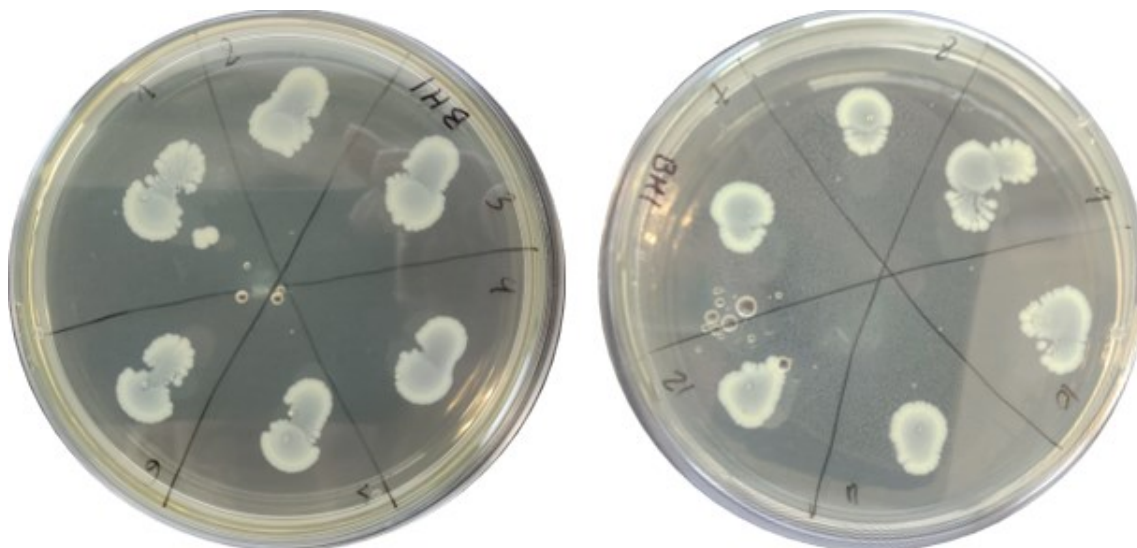


Figura 2 – Multiplicação bacteriana observada nas concentrações da solução de nano-MgO testadas aquando da determinação da CMB (original).

Avaliação *ex vivo* do potencial antimicrobiano

a) Avaliação visual da atividade antimicrobiana

A multiplicação bacteriana foi considerada na presença de turvação do meio de cultura (Figura 3). Todos os dentes dos controlos negativos, tanto dos dentes como dos cones de papel, permaneceram sem multiplicação bacteriana observável.

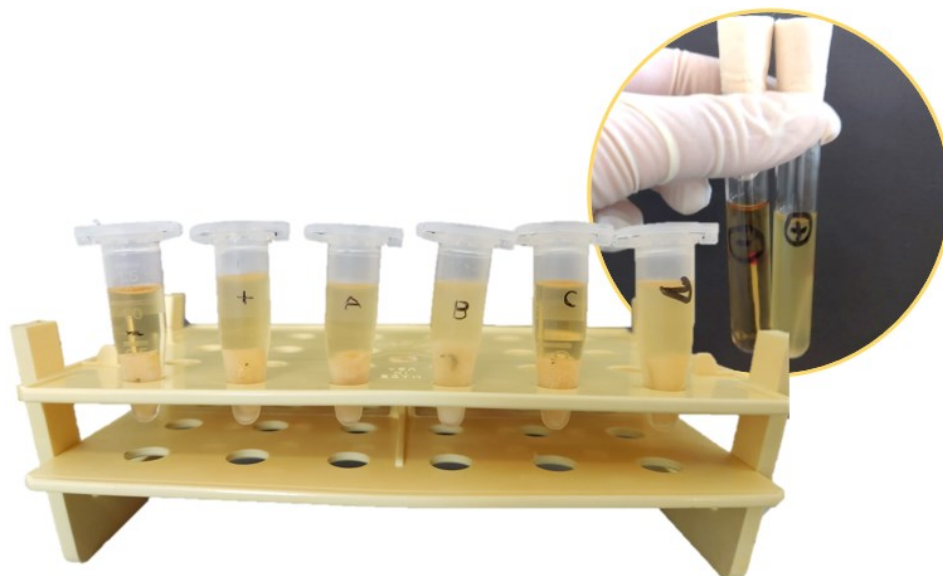


Figura 3 – Comparação de turvação: neste ensaio verificou-se multiplicação bacteriana no controlo positivo e nos grupos A, B e D, tendo o controlo negativo e o grupo C apresentado ausência de multiplicação bacteriana, com meio de cultura límpido. À direita encontram-se os controlos dos cones de papel num dos ensaios (original).

Considerando os controlos positivos, à exceção de um tubo com um cone de papel, todos apresentaram multiplicação bacteriana. De todos os grupos experimentais, o grupo C foi o único que nunca apresentou multiplicação bacteriana (Gráfico 1).

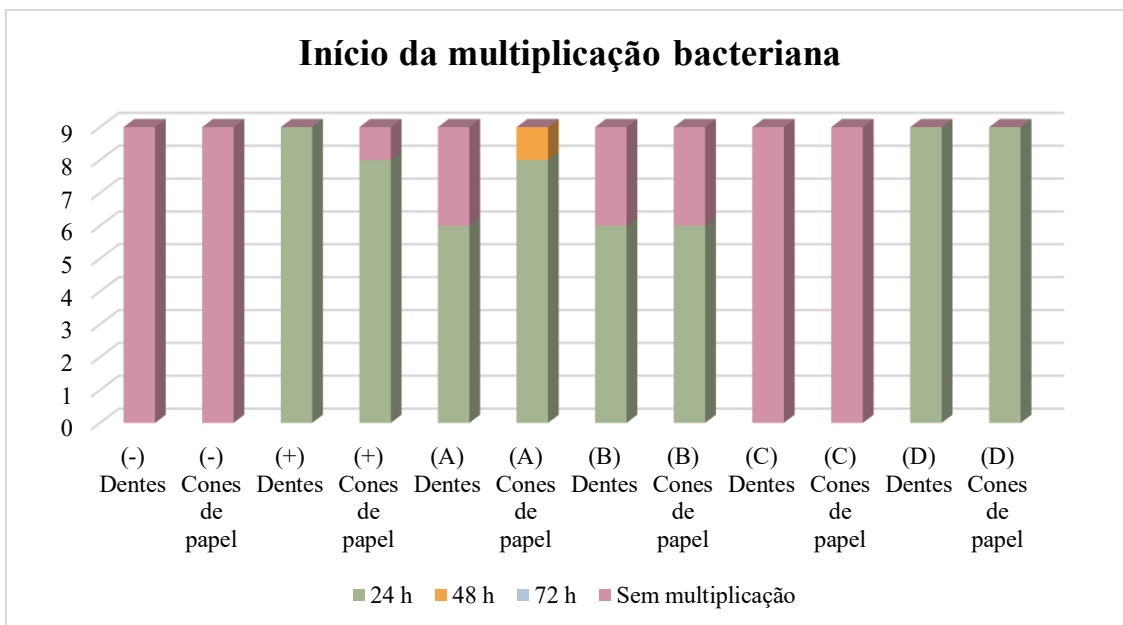


Gráfico 1 – Número absoluto de tubos com e sem turvação observados após 24, 48 e 72 h, comparando os grupos de dentes com os de cones de papel.

Foi observado que a multiplicação bacteriana ocorreu consistentemente nos grupos A, B e D, mas não no grupo C (PBA). Dadas as condições constantes, diferenças estatisticamente significativas foram registadas entre a pasta de nano-MgO, HC e solução de PEG, face à PBA (Tabela 3).

	Sig. Exata (2 lados)
Grupo A x Grupo B	1,0
Grupo A x Grupo C	0,0090
Grupo A x Grupo D	0,2059
Grupo B x Grupo C	0,0090
Grupo B x Grupo D	0,2059
Grupo C x Grupo D	0,000041

Tabela 3 – Comparação dos resultados visuais obtidos para os diferentes grupos experimentais às 24 h (dentes).

b) Avaliação da atividade antimicrobiana por espectrofotometria

A percentagem média de inibição antimicrobiana foi calculada através da OD₆₀₀. O resultado para a amostra dos dentes encontra-se apresentada no Gráfico 2. Esta determinação foi feita através da comparação dos valores de OD obtidos para os grupos experimentais e os grupos de controlo.

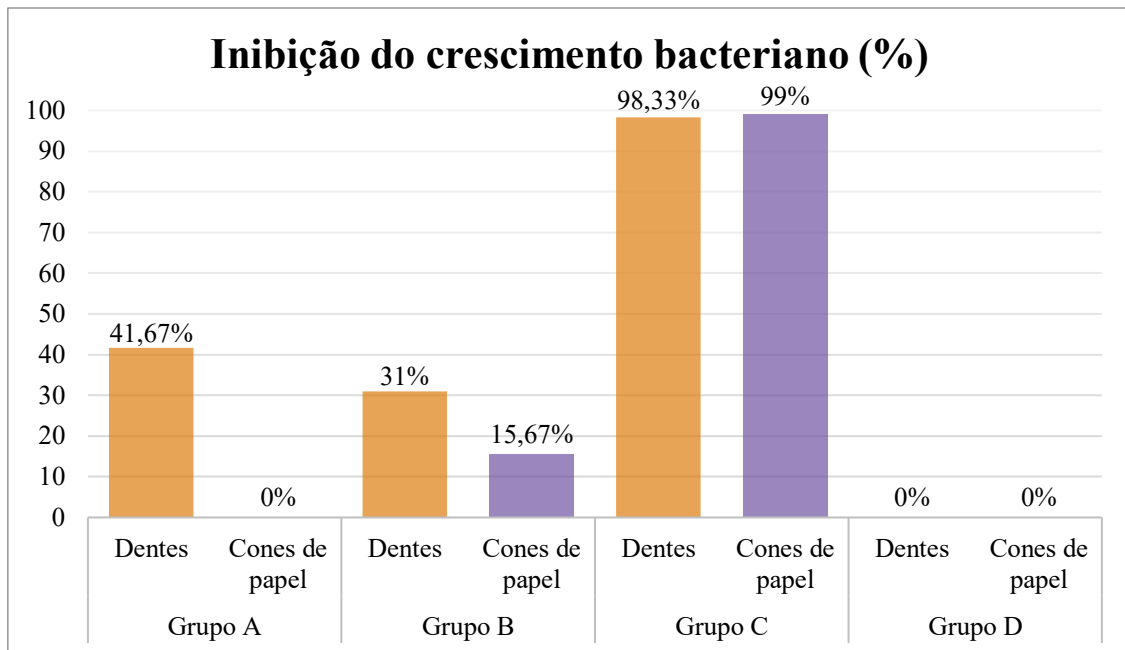


Gráfico 2 – Percentagem de inibição bacteriana para a amostra de dentes e de cones, calculada através da OD₆₀₀, comparando com os grupos de controlo (dentes e cones de papel).

Na amostra dos dentes, as três pastas (grupos A, B e C) apresentaram potencial inibição bacteriano, já na amostra dos cones de papel, a inibição apenas ocorreu nos grupos das pastas de hidróxido de cálcio e bi-antibiótica (grupos B e C). O PEG (grupo D) foi o único composto que nunca apresentou potencial de inibição bacteriana nesta avaliação.

DISCUSSÃO

A medicação intracanal tem o seu papel na endodontia como um complemento do tratamento e não como uma substituição da preparação químico-mecânica e desinfecção canal, sendo que, quando combinado com um desbridamento adequado, o uso de medicação intracanal pode ser muito favorável.⁽²⁹⁾

A escolha da *E. faecalis* como objeto de estudo foi baseada na sua vasta ocorrência em casos de infecções perirradiculares persistentes, bem como por ser conhecida como um dos maiores agentes responsáveis pelas falhas do tratamento endodôntico.^(11,30-32)

Ainda que sejam frequentemente usados como medicação intracanal, o HC e a PBA apresentam limitações, tais como a dificuldade na remoção dos canais, a degradação do colagénio dentinário no caso do HC, e a desmineralização da dentina no caso da PBA, que futuramente compromete o selamento do canal.^(14,16,33) Adicionalmente, o uso de HC tem sido reportado como ineficaz para *E. faecalis*, o que torna a procura de um novo agente antimicrobiano crucial.⁽¹⁵⁾

As bactérias patogénicas multirresistentes são uma das prioridades atuais na medicina, conseqüentemente, há um interesse crescente nas terapias antimicrobianas não-convencionais, como por exemplo no uso de nanopartículas metálicas.⁽²⁹⁾ Neste estudo recorreu-se às nanopartículas de MgO dado que estas se demonstraram biocompatíveis e apresentaram resultados favoráveis como irrigante segundo Monzavi *et al.* (2015), contudo, no trabalho de Romani *et al.* (2021), foi sugerido que este nano material necessitaria de um maior tempo de atuação no canal radicular.^(10,21)

Este trabalho apresentou como objetivo investigar o efeito de uma pasta constituída por nano-MgO face a *E. faecalis*, mimetizando o seu uso como medicação intracanal, sendo mantido no canal por sete dias, comparando o seu resultado com o das pastas usualmente utilizadas em endodontia.

Foi possível obter uma CMI de 0.78 mg/mL para as nanopartículas de MgO, já a CMB não foi determinada (> 2,5 mg/mL), pelo que o rácio MBC/MIC não pode ser obtido.⁽²⁶⁾

O efeito *ex vivo* das nanopartículas de MgO não correspondeu às expectativas, sendo que de acordo com Nguyen, N. T., *et al.* (2018), as nano-MgO (23±5 nm) demonstraram um efeito antimicrobiano promissor, sendo sugerido que uma concentração superior a 1,6 mg/mL poderia ser letal para bactérias gram-negativas e inibitório para as gram-

positivas.⁽²⁴⁾ A pesquisa sobre o potencial de nanopartículas no campo da endodontia tem sido sobretudo aplicada na fase da irrigação, conforme a investigação de Monzavi, A. *et al.* (2015), as nanopartículas de MgO com um tamanho de 70 a 150 nm exibiram resultados promissores na redução do número de colónias de *S. aureus*, *E. faecalis* e *C. albicans*, quando em comparação com NaOCl a 5,25%.⁽¹⁰⁾ Uma possível explicação para os resultados menos encorajadores do presente estudo é a tendência das nanopartículas de MgO a agregar com o tempo, reduzindo assim a sua eficácia. A fim de evitar a formação de agregados, Naguib, G. *et, al* (2022) revestiram as nanopartículas com zeína, um polímero de origem vegetal.⁽³⁴⁾

No presente estudo o HC demonstrou uma diferença estatisticamente significativa em relação à PBA no teste visual, e ainda uma percentagem de inibição inferior à mesma. Tem sido reportado que o HC é ineficaz na eliminação da *E. faecalis*, devido à penetração profunda desta bactéria nos túbulos dentinários, onde o pH elevado do HC não tem eficácia devido ao efeito de tampão da dentina e à capacidade de a bactéria manter a homeostase passivamente, através de bombas de protões.^(35,36)

Entender a multiplicação bacteriana nos túbulos dentinários é fundamental para o tratamento endodôntico, então foram observados os dentes e os cones de papel, pois os cones apenas demonstram a atividade bacteriana no canal, enquanto que o dente em si poderá apresentar atividade bacteriana no interior dos túbulos.⁽³⁷⁾ Observou-se que um dos cones de papel do controlo positivo não apresentou contaminação, possivelmente devido a erro laboratorial, já que na amostra de dentes todos apresentaram desenvolvimento bacteriano. Quando ocorreu, a multiplicação bacteriana foi observada sempre durante as primeiras 24 h, com exceção de um único tubo com cone de papel do grupo A, que apresentou crescimento às 48 h. O crescimento tardio observado neste tubo pode ser atribuído ao manuseamento quando foi feita a leitura OD₆₀₀ das 24h.

Os resultados da leitura ótica nos grupos dos dentes corresponderam aos resultados do teste visual. As três pastas apresentaram eficácia antimicrobiana, observando-se que a PBA apresentou um potencial antimicrobiano superior (98,33% nos dentes), já o PEG não inibiu o crescimento. As percentagens de inibição para amostra de cones de papel neste teste não foram concordantes com os valores obtidos na amostra de dentes, o facto de no grupo A (cones de papel) não ter havido inibição bacteriana e no grupo B a inibição ter sido inferior à dos dentes, pode ser justificado pelo facto de os cones de papel não

absorverem a pasta de nano-MgO e o hidróxido de cálcio, permitindo o crescimento bacteriano nestes grupos.

A presente investigação reúne algumas limitações, começando pela impossibilidade de reproduzir as condições da cavidade oral – estudos futuros no âmbito clínico poderão ser uma vantagem neste aspeto, uma vez que estas nanopartículas não são citotóxicas.⁽¹⁰⁾ O número reduzido da amostra foi outra limitação, bem como o facto de não se ter tido em conta as consistências das pastas como variável do estudo, ainda que não exista evidência sobre a influência da consistência na capacidade de penetração das pastas.^(19,38)

O estudo da eficácia antimicrobiana das nanopartículas deve ser realizado não só em torno da sua aplicabilidade como medicação intracanal, mas também na sua impregnação dos cones de *gutta-percha* e incorporação em cimentos. Os estudos futuros devem ter em conta a análise da microestrutura das nanopartículas com recurso a técnicas como a microscopia eletrónica por transmissão e varrimento, análise essa que é fundamental para confirmar a caracterização das nanopartículas fornecida pelo fabricante, sendo que o seu tamanho e área de superfície estão relacionadas com a velocidade de interação com as paredes celulares.⁽²⁵⁾ Para além disso, o PEG, deve ser explorado como polímero de revestimento, pois aparenta ser um promissor candidato devido à sua capacidade de penetrar na dentina e baixo custo.⁽¹⁹⁾ Ao contrário do que foi verificado por Carreira C. *et. al* (2007), o PEG não apresenta atividade antimicrobiana face à *E. faecalis*, pelo que não interferiu nos resultados obtidos entre as diferentes pastas.⁽¹⁹⁾

Houve diferenças estatisticamente significativas entre os potenciais antimicrobianos das pastas de nano-MgO, HC e PEG face à PBA, foi portanto descartada a hipótese nula. Nenhum dos dentes ou cones de papel do grupo da PBA apresentou multiplicação bacteriana observável e esta mesma pasta apresentou uma percentagem de inibição bacteriana de 98,33% no teste de OD₆₀₀ realizado nos dentes. Nestes ensaios, a PBA revelou ser a medicação intracanal com melhor atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*.

CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo, foi observado que as nanopartículas de óxido de magnésio apresentam atividade antimicrobiana, sendo possível calcular a sua concentração mínima inibitória. A medicação intracanal produzida com estas nanopartículas surtiu resultados comparáveis à pasta de hidróxido de cálcio e inferiores à pasta bi-antibiótica. Verificou-se que o polietilenoglicol, utilizado nas pastas de nano-MgO e bi-antibiótica, não interferiu com os resultados obtidos pelas pastas. Para posteriormente explorar o potencial antimicrobiano das nanopartículas de MgO são recomendados estudos clínicos com concentrações superiores à utilizada, considerando a segurança biológica destas nanopartículas. Adicionalmente sugere-se o revestimento das nanopartículas com PEG e a análise da microestrutura das nano-MgO, bem como que o foco não se dirija apenas ao seu uso como medicação intracanal, mas também na fase de obturação e selamento do canal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eleazer PD, Glickman GN, Scott JD, Mcclanahan B, Terry MS, Webb D, et al. Glossary of Endodontic Terms (2020).
2. Siqueira JF, Rôças IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. Vol. 55, International Endodontic Journal. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 512–30.
3. Nair PNR. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. Int Endod J [Internet]. 2006; 39:249–81. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2591.2006.01099.x>
4. Murad C, Fernando FARINIUK L, Fidel S, Antonio Sergio FIDEL R, Moura SASSONE L. Bacterial Leakage in Root Canals Filled with Calcium Hydroxide Paste Associated with Different Vehicles. Braz Dent J. 2008;19(3).
5. Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2019 May 1;24(3):e364–72.
6. Siqueira Junior JF, Rôças I das N, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. Unprepared root canal surface areas: Causes, clinical implications, and therapeutic strategies. Braz Oral Res. 2018; 32:1–19.
7. Tabassum S, Khan FR. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. Eur J Dent. 2016 Jan 23;10(01):144–7.
8. Journal E. Tabassum and Khan: Endodontic failure [Internet]. Available from: www.eurjdent.com
9. Siqueira JF, Rôças IN, Ricucci D, Hülsmann M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. Nature Publishing Group. 2014.
10. 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 Investig. 2015 Mar 1;19(2):349–56.
11. Narayanan Ll, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. Journal of Conservative Dentistry. 2010;13(4):233.

12. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Eur J Oral Sci.* 1981 Aug;89(4):321–8.
13. Chong BS, Ford TRP. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J.* 1992 Mar;25(2):97–106.
14. Yassen GH, Chu TMG, Eckert G, Platt JA. Effect of medicaments used in endodontic regeneration technique on the chemical structure of human immature radicular dentin: an in vitro study. *J Endod* [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2023 May 27];39(2):269–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23321244>
15. Momenijavid M, Salimizand H, Korani A, Dianat O, Nouri B, Ramazanzadeh R, et al. Effect of calcium hydroxide on morphology and physicochemical properties of *Enterococcus faecalis* biofilm. 123AD; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11780-x>
16. Parhizkar A, Nojehdehian H, Asgary S. Triple antibiotic paste: momentous roles and applications in endodontics: a review. *Restor Dent Endod.* 2018;43(3).
17. Carbajal Mejía JB, Aguilar Arrieta A. Reduction of viable *Enterococcus faecalis* in human radicular dentin treated with 1% cetrimide and conventional intracanal medicaments. *Dental Traumatology.* 2016 Aug 1;32(4):321–7.
18. Gokturk H, Ozkocak I, Buyukgebiz F, Demir O. Effectiveness of various irrigation protocols for the removal of calcium hydroxide from artificial standardized grooves. *Journal of Applied Oral Science.* 2017 May 1;25(3):290–8.
19. Carreira C de M, Santos SSF dos, Jorge AOC, Lage-Marques JL. Antimicrobial effect of intracanal substances. *Journal of Applied Oral Science.* 2007 Oct;15(5):453–8.
20. Shrestha A, Kishen A. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. *J Endod.* 2016 Oct;42(10):1417–26.
21. Romani J, Ginjeira A, Oliveira M. Avaliação in vitro e ex vivo da eficácia antimicrobiana de nanopartículas de MgO na eliminação de *Enterococcus faecalis* [Dissertação]. [Lisboa]: Universidade de Lisboa; 2021.

22. Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro Infection and of Dentinal Tubules. J Dent Res. 1987 Aug 9;66(8):1375–9.
23. Sousa AM, Ginjeira A, Oliveira M. Comparação da eficácia antimicrobiana de pastas de medicação intracanal na eliminação de *Enterococcus faecalis* [Dissertação]. [Lisboa]: Universidade de Lisboa; 2022.
24. Nguyen NYT, Grelling N, Wetteland CL, Rosario R, Liu H. Antimicrobial Activities and Mechanisms of Magnesium Oxide Nanoparticles (nMgO) against Pathogenic Bacteria, Yeasts, and Biofilms. Sci Rep. 2018 Nov 2;8(1):16260.
25. Adnan RM, Mezher M, Abdallah AM, Awad R, Khalil MI. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Mg-Doped CuO Nanoparticles. Molecules. 2022 Dec 23;28(1):103.
26. Cunha E, Janela R, Costa M, Tavares L, Veiga AS, Oliveira M. Nisin influence on the antimicrobial resistance ability of canine oral enterococci. Antibiotics. 2020 Dec 1;9(12):1–14.
27. Valverde ME, Baca P, Ceballos L, Fuentes MV, Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM. Antibacterial efficacy of several intracanal medicaments for endodontic therapy. Dent Mater J. 2017;36(3):319–24.
28. Prabhakar A, Hadakar Gs, 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. Contemp Clin Dent. 2012;3(1):42.
29. Ordinola-Zapata R, Noblett WC, Perez-Ron A, Ye Z, Vera J. Present status and future directions of intracanal medicaments. Int Endod J. 2022 May 19;55(S3):613–36.
30. E. T. Pinheiro, B. P. F. A. Gomes, C. C. R. Ferraz, F. B. Teixeira, A. A. Zaia, F. J. Souza Filho. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. Oral Microbiology Immunology. 2003;(18):100–3.
31. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction and Culture Analyses of *Enterococcus faecalis* in Root Canals. J Endod. 2006 Mar;32(3):173–7.

32. Endo MS, Ferraz CCR, Zaia AA, Almeida JFA, Gomes BPFA. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. *Eur J Dent.* 2013 Jul 26;07(03):302–9.
33. Gokturk H, Ozkocak I, Buyukgebiz F, Demir O. Effectiveness of various irrigation protocols for the removal of calcium hydroxide from artificial standardized grooves. *Journal of Applied Oral Science.* 2017 May 1;25(3):290–8.
34. Naguib GH, Nassar HM, Hamed MT. Antimicrobial properties of dental cements modified with zein-coated magnesium oxide nanoparticles. *Bioact Mater.* 2022 Feb; 8:49–56.
35. Lakhani AA. Antimicrobial Activity of Triple Antibiotic Paste, Moxifloxacin, Calcium Hydroxide and 2% Chlorhexidine *Journal of Clinical and Diagnostic Research [Internet].* Vol. 11. 2017. Available from: www.jcdr.net
36. Stuart C, Schwartz S, Beeson T, Owatz C. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *J Endod.* 2006 Feb;32(2):93–8.
37. Devaraj S, Jagannathan N, Neelakantan P. Antibiofilm efficacy of photoactivated curcumin, triple and double antibiotic paste, 2% chlorhexidine and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in vitro OPEN. 2016; Available from: www.nature.com/scientificreports
38. Estrela C, Rodrigues De Araujo Estrela C, Luschke Bammann L, Pecora JD. Two Methods to Evaluate the Antimicrobial Action of Calcium Hydroxide Paste. Vol. 27. 2001.

ANEXOS

**Anexo I – Parecer 202001 da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina
Dentária da Universidade de Lisboa**



FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DE LISBOA

Comissão de Ética

Parecer 202001

A Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa (CE-FMDUL) considera que a utilização de dentes ou partes de dentes, para investigação ou ensino, em que não conste a identidade do dador e em que seja impossível a respetiva identificação, não carece de parecer prévio favorável da CE-FMDUL.

É este, segundo melhor opinião, o parecer desta Comissão de Ética.

Lisboa, 7 de março de 2023

O presidente da CE-FMDUL

(João Aquino – professor catedrático)