




Julia de Oliveira NEVES**

 <https://orcid.org/0000-0001-7843-1116>


Franciele de Oliveira DIAS***

 <https://orcid.org/0000-0001-5418-2530>


Laís Stabile PRONI****

 <https://orcid.org/0000-0003-2621-9281>


Maria Letícia Oliveira e FREITAS*****

 <https://orcid.org/0000-0003-2529-5231>

Carolina Simonetti LODI*****

 <https://orcid.org/0000-0002-3926-8392>

Gabriely Cristinni REZENDE*****

 <https://orcid.org/0000-0003-2203-4538>

Recebido em: 27 de fevereiro de 2020.

Aprovado em: 20 de abril de 2021.

ANÁLISE ANTIMICROBIANA DO USO DA NANOPARTÍCULA DE PRATA COM HIDRÓXIDO DE CÁLCIO COMO MEDICAÇÃO INTRACANAL*

ANTIMICROBIAL ANALYSIS OF THE USE OF SILVER NANOPARTICLES WITH CALCIUM HYDROXIDE AS INTRACANAL MEDICATION

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio (HC) associada a nanopartículas de prata (Ag-NPs) sobre biofilme de *Enterococcus faecalis*. 144 espécimes de dentina foram inoculadas em placas contendo meio de cultura com *E. faecalis* (ATCC 29212) para a formação de biofilme. As medicações foram preparadas na proporção de 1:1 de HC e soro estéril e, em seguida, pesada e adicionada às concentrações de Ag-NPs 2,5%, 5% e 10%. Decorridos 14 dias, os espécimes foram lavados, transferidos para uma nova placa onde as medicações foram colocadas sobre o biofilme e deixados em estufa a 37°C por 2, 7 e 14 dias. Espécimes sem tratamento foram usados como controle negativo. Após cada tempo experimental, os espécimes foram lavados, agitados, diluídos e plaqueados em triplicata em M-Enterococcus. As unidades formadoras de colônia foram contadas e analisadas estatisticamente ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que não houve diferença estatística entre a medicação de HC e o grupo controle nos períodos de 2 e 7 dias, mesmo quando associados às diferentes concentrações da Ag-NPs. Após 14 dias de contato direto com a medicação, houve uma redução do biofilme bacteriano nos grupos de HC sozinho e associado à prata, quando comparado com o grupo controle, mas nenhuma diferença foi observada entre os grupos de HC. Diante dos resultados, podemos concluir que a associação da Ag-NPs não contribuiu para a atividade antimicrobiana do HC.

Descritores: Antibacteriano. Prata. Endodontia. *Enterococcus faecalis*.

ABSTRACT

This paper aims at evaluating the antimicrobial activity of calcium hydroxide (CH) in association with silver nanoparticles (AgNPs) over the *Enterococcus faecalis* biofilm. 144 dentine specimens were inoculated in plates containing culture medium with *E. faecalis* (ATCC 29212) to biofilm formation. Medication was prepared in proportion 1:1 of CH and sterile serum, then weighted and added to 2,5%, 5%, and 10% AgNPs concentrations. No earlier than 14 days, the specimens were washed, transferred to a new plate where medication was applied over the biofilm and rested in heating chamber at 37 °C during 2, 7, and 14 days. Specimens with no treatment were used as a negative control. After each trial time, the specimens were washed, mixed, diluted, and plated in triplicate at M-Enterococcus. The colony-forming units were counted and statistically analyzed ($p < 0,05$). The results showed that there was no statistical difference between CH medication and the group of control during the period of 2 and 7 days, even when they were associated with different concentrations of AgNPs. After 14 days of direct contact with the medication, there was a reduction of the bacterial biofilm in the groups of CH itself and associated with silver, when compared to the control group, but no difference was observed in the group of CH. In view of the results, we can conclude that the association of AgNPs does not contribute to the antimicrobial activity of the CH.

Keywords: Antibacterial. Silver. Endodontics. *Enterococcus faecalis*.

* Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Centro Universitário de Santa Fé do Sul/SP - Pibic/Unifunec

** Graduanda em Odontologia pelo Centro Universitário de Santa Fé do Sul/SP - Unifunec, julianeves99@outlook.com.br

*** Graduanda em Odontologia pelo Centro Universitário de Santa Fé do Sul/SP - Unifunec, frandiasdeoliveira01@gmail.com

**** Graduanda em Odontologia pelo Centro Universitário de Santa Fé do Sul/SP - Unifunec, laisproni@hotmail.com

***** Graduanda em Odontologia pelo Centro Universitário de Santa Fé do Sul/SP - Unifunec, marialeticia_pba@hotmail.com

***** Doutora, Docente do Centro Universitário de Santa Fé do Sul/SP - Unifunec, carol_lodi@yahoo.com.br

***** Doutora, Docente do Centro Universitário de Santa Fé do Sul/SP - Unifunec, gaby.cristinni@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

O hidróxido de cálcio (HC) é amplamente utilizado durante o tratamento endodôntico por apresentar propriedades antimicrobianas e biológicas¹ decorrentes da liberação de íons de cálcio e hidroxila². O pH alto do HC promove a inibição microbiana através de uma reação enzimática irreversível³ e o cálcio rouba o dióxido de carbono dificultando a respiração bacteriana⁴.

No entanto, infecção persistente pode ocorrer devido à presença de microrganismos que sobrevivem aos procedimentos endodônticos⁵. Alterações ambientais, como o aumento do pH, podem estimular as modificações genéticas na célula bacteriana ou/e a formação de biofilme bacterianos que aumentam a resistência dos microrganismos⁵. O *Enterococcus faecalis*, é um dos microrganismos envolvidos nessas infecções persistentes⁶ e resistente à pasta de HC⁷.

Com o propósito de reduzir o número de microrganismos resistentes, o uso de associações de substâncias antimicrobianas e o hidróxido de cálcio vem sendo sugerido. Estudos têm demonstrado que a nanopartícula de prata (Ag-NPs) em uma concentração de 25 ppm pode inibir o crescimento bacteriano de bactérias orais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, e *Prevotella intermedia*⁸. Entretanto, Gomes-Filho *et al.* relataram que a nanopartícula, em uma concentração de 23 ppm, apresenta biocompatibilidade, quando usada como agente de irrigação, provocando leve reação inflamatória nos tecidos em contato após 24h⁹. Resultados semelhantes de biocompatibilidade foram obtidos quando esta substância foi associada ao MTA em pequenas concentrações (1% em peso)¹⁰.

Apesar de alguns estudos demonstrarem a efetividade e biocompatibilidade da prata, a atividade antimicrobiana da associação da Ag-NPs ao HC como medicação intracanal ainda não foi estudada. Assim, o objetivo deste estudo será avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana sobre biofilmes de *Enterococcus faecalis* da pasta de hidróxido de cálcio associada a diferentes concentrações de nanopartículas de prata (2,5%, 5% e 10%). A hipótese nula testada será que as adições das diferentes concentrações da nanopartícula não influenciam na atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio e que a atividade antimicrobiana não aumenta em períodos maiores em contato com o biofilme.

O trabalho teve como objetivo avaliar, comparativamente, a ação antimicrobiana da pasta de HC associada a diferentes concentrações de Ag-NPs (2,5%, 5% e 10%) em um modelo de biofilme *in vitro* nos períodos de 2, 7 e 14 dias.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram divididos de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 1 - Grupos experimentais

Materiais Experimentais	Tempos Experimentais (n=144)		
	2 dias	7 dias	14 dias
Hidróxido de Cálcio (N = 24)	N = 8	N = 8	N = 8
Hidróxido de Cálcio + 2,5% de Prata (N = 24)	N = 8	N = 8	N = 8
Hidróxido de Cálcio + 5% de Prata (N = 24)	N = 8	N = 8	N = 8
Hidróxido de Cálcio + 10% de Prata (N = 24)	N = 8	N = 8	N = 8
Controle Negativo (N = 24)	N = 8	N = 8	N = 8
Controle Positivo (N = 24)	N = 8	N = 8	N = 8

Fonte: Dos próprios autores.

Os tempos experimentais foram divididos de acordo com os dias em que as amostras ficaram em contato com os materiais experimentais. Amostras contaminadas (Bloco de dentina com biofilme) e sem pasta foram usadas como controle positivo e amostras não contaminadas (Blocos de dentina sem biofilme) foram usadas como controle negativo, ambas foram mantidas em água destilada estéril¹¹.

2.2 Preparo dos extratos

As pastas de hidróxido de cálcio foram, inicialmente, manipuladas com água destilada na proporção 1:1, em seguida, foram pesadas e a Ag-NPs adicionada de acordo com o grupo a ser avaliado. As pastas foram colocadas em discos de 1x0,7mm (AxD) e usadas no mesmo dia.

2.3 Obtenção e preparo dos blocos de dentina

Os blocos de dentina utilizados como substrato para a formação do biofilme nesse estudo foram obtidos de dentes bovinos (incisivos) com idade aproximada de três anos e, após a

extração, foram mantidos em timol 0,2% pH 7,0, durante 30 dias. Blocos de dentes bovinos (4 x 4 x 1,5mm) foram obtidos a partir da porção mais reta da raiz do dente e planificados com o auxílio de uma lixa¹¹. Os blocos resultantes foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min, dentro de tubos de ensaio contendo água deionizada¹², antes de sua utilização no experimento. Esses blocos estéreis foram utilizados para a formação do biofilme de *Enterococcus faecalis*.

2.4 Reativação das cepas bacterianas

Primeiramente, as cepas referência de *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) congeladas foram plaqueadas em meio de cultura BHI ágar (Brain Heart Infusion) (HIMEDIA, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, India) e colocadas em estufa a 37°C. Após 48 horas, cinco colônias de *E. Faecalis* foram inoculadas em 5 mL de meio de cultura BHI caldo (HIMEDIA, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, India) e mantida em estufa de CO₂ (5% CO₂) a 37°C por uma noite para permitir o crescimento bacteriano¹³.

Após o crescimento, a cultura de *E. Faecalis* foi ajustada na densidade óptica de 0,06 em espectrofotômetro (Espectrofotômetro UV/Vis – 1800, Shimadzu Corporation, Nakagyo-Ku, Kyoto, Japão) no comprimento de onda de 550nm, para obtenção aproximada da concentração bactéria de $3,2 \times 10^7$ CFU/mL¹².

2.5 Formação do biofilme

Para a formação do biofilme, os blocos de dentina foram colocados de forma asséptica em placas de cultura de tecido com 24 poços (TPP Techno Plastic Products AG, Suíça), 200µL da suspensão com a concentração conhecida de *E. faecalis* (aproximadamente $3,2 \times 10^7$ CFU/mL) preparada previamente foi adicionada e mais 1,8 mL de meio de cultura fresco BHI de caldo foi acrescentado (HIMEDIA, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, India). Os espécimes foram igualmente processados sem a adição de novos inóculos¹².

As placas de cultura foram incubadas em estufas a 37°C por 14 dias e o meio de cultura BHI, caldo completamente trocado a cada 48 horas, sem adição de novos microrganismos¹². Decorridos 14 dias do crescimento microbiano, os blocos de dentina foram lavados em 2ml de solução salina 0,9% e, em seguida, colocados em novas placas de cultura de 24 poços contendo os discos com cada pasta.

2.6 Análise microbiológica

Após cada tempo experimental de contato com as pastas (2, 7 e 14 dias), os blocos de dentina foram novamente lavados em 2ml de solução salina 0,9% e, em seguida, colocados em tubos Falcon contendo 1mL de solução salina, agitados em vortex por 1 minuto para a transferências dos microrganismos para a solução salina¹¹.

As suspensões foram diluídas sequencialmente (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) e inoculadas em triplicata no meio de cultura m-Enterococcus ágar (HIMEDIA, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, India) para determinar a quantidade de *E. Faecalis*¹².

Para a determinação do número de *E. faecalis*, 3 gotas de 10 μ L das diluições pré-estabelecidas foram inoculadas pela técnica da semeadura por gotas, na superfície de placas de petri contendo o m-Enterococcus ágar¹².

Quando as gotas secaram, as placas foram incubadas em estufa de CO₂ (5% CO₂) a 37°C por 48 h para a contagem das bactérias viáveis.

2.7 Análise estatística

As análises estáticas foram realizadas utilizando o programa Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA). As medianas do parâmetro medido (UFC no biofilme) foram calculadas para cada grupo. Os dados foram analisados pelo modelo ANOVA de fator único e Shapiro-Wilk, uma vez que não foram distribuídos normalmente e as variâncias não foram iguais. O teste unilateral de Kruskal-Wallis também foi usado. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

A tabela 2 mostra a mediana UFC/mL⁻¹ dos diferentes grupos. A comparação entre os grupos revelou que todas as medicações de HC apresentaram maior atividade antimicrobiana quando comparadas com o grupo controle ($p < 0,001$), porém não houve diferença estatística entre os grupos de hidróxido de cálcio e os grupos de HC +Ag-NPs, nos períodos avaliados. Por outro lado, ao comparar a atividade antimicrobiana das diferentes medicações, foi possível observar uma redução na UFC, após 14 dias de contato direto com o biofilme.

Tabela 2. Mediana da UFC (UFC/mL-1) dos diferentes grupos e períodos

Grupos/ Períodos	2 dias	7 dias	14 dias
Controle Negativo	⁵ 5,6 x 10 ⁵ A,a	⁵ 3,6 x 10 ⁵ A,a	⁵ 4,6 x 10 ⁵ A,a
Hidróxido de Cálcio	⁵ 3,9 x 10 ⁵ A,a	⁵ 1,4 x 10 ⁵ A,a	⁴ 1,1 x 10 ⁵ B,b
HC+ Prata 2,5%	⁵ 3,5 x 10 ⁵ A,a	⁵ 9,3 x 10 ⁵ A,a	⁴ 1,4 x 10 ⁵ B,b
HC + Prata 5%	⁵ 1,8 x 10 ⁵ A,a	⁵ 1,8 x 10 ⁵ A,a	⁴ 1,1 x 10 ⁵ B,b
HC+ Prata 10%	⁵ 3,8 x 10 ⁵ A,a	⁵ 3,4 x 10 ⁵ A,a	⁴ 2,1 x 10 ⁵ B,b

Fonte: Dos próprios autores. Teste unilateral de Kruskal-Wallis (p < 0.05)

Letras maiúsculas diferentes indicam a diferença estatística (P < 0.05) entre os períodos.

Letras minúsculas diferentes indicam a diferença estatística (P < 0.05) entre os grupos.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo comparou a eficácia do hidróxido de cálcio associados a três concentrações de Ag-NPs contra *E. faecalis*. De acordo com os resultados, as associações do hidróxido de cálcio com as diferentes concentrações de prata não melhoraram a atividade antimicrobiana da medicação nos períodos avaliados de 2, 7 e 14 dias. Portanto, a hipótese nula de que não haveria diferenças significativas entre os grupos experimentais foi aceita. Entretanto, quando o período de contato das medicações com o biofilme foi avaliado, foi observada uma redução no número de UFC, após 14 dias de contato direto, mostrando que o tempo é um fator relevante nas propriedades antimicrobianas das medicações estudadas, rejeitando a segunda hipótese nula testada.

O *E. faecalis* foi a cepa de escolha para o experimento, pois está presente na etiologia de infecções endodônticas persistentes, devido a sua capacidade de sobreviver no canal radicular em diversas situações¹⁴. As medicações intracanaís contendo HC são amplamente utilizadas durante o tratamento endodôntico por apresentarem atividade antimicrobiana, auxiliando na redução de microrganismos após o preparo biomecânico¹. Atualmente, as Ag-NPs vêm sendo estudadas associadas a diferentes materiais de uso da endodontia^{9, 10} e contra patógenos orais⁸. Estudo tem demonstrado que há efetividade contra bactérias gram-negativas, gram-positivas e bactérias multirresistentes¹⁵.

No presente estudo, o HC com soro não foi capaz de eliminar os microrganismos presentes, concordando com estudos anteriores^{16,17}, em um estudo que avaliou a atividade antimicrobiana do HC com biofilme de *E. faecalis*, mostraram que, no período de 1 dia, a medicação reduzia o número de microrganismos, mas não os eliminava. Apesar de não eliminar

o biofilme, o uso da medicação intracanal com HC reduz o número de microrganismo presentes após 14 dias de contato direto, como mostrado nos resultados.

Os resultados mostraram que HC associados às diferentes concentrações de Ag-NPs apresentaram efetividade antimicrobiana, após 14 dias de contato direto com o biofilme. Esses resultados concordam com os dados mostrados por¹⁸, que utilizaram a Ag-NPs em uma concentração de 100 ppm (0,01%) como veículo da medicação de hidróxido de cálcio. Por outro lado, nossos resultados mostraram que a associação não aumentou a efetividade do hidróxido de cálcio, discordando do estudo anteriormente realizado por¹⁶. A diferença dos resultados se deve às diferentes metodologias e tempos experimentais usados para avaliar a atividade antimicrobiana das medicações.

Demonstraram que a instrumentação é capaz de eliminar até 99,80% das bactérias cultiváveis, portanto a medicação intracanal auxiliaria na redução dos 0,20% dos microrganismos remanescentes¹⁹. E, apesar de parecer poucos microrganismos, mostraram a influência da presença de infecções no momento da obturação, relatando uma taxa de 94% de cicatrização apical nos casos que obtiveram cultura negativa²⁰. Esses achados, juntamente com os resultados obtidos no presente estudo, enfatizam a importância do uso da medicação do HC, após o preparo biomecânico, como coadjuvante no controle de microrganismo e reparo apical.

5 CONCLUSÃO

Mediante os resultados obtidos, podemos concluir que a associação da nanopartícula de prata nas diferentes concentrações estudadas 2,5%, 5% e 10% não foram capazes de alterar as propriedades antimicrobianas da pasta de hidróxido de cálcio.

REFERÊNCIAS

- 1 Desai S, Chandler N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. J Endod. [Internet]. 2009;35(4):475-80. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.11.026>
- 2 Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. J Endod. [Internet] 1998;24(1):15-7. PMID: 9487859. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(98\)80205-7](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(98)80205-7)
- 3 Siqueira Junior JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. Int Endod J. [Internet] 1999;32(5):361-369. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1999.00275.x>

- 4 Kontakiotis E, Nakou M, Georgopoulou M. In vitro study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *Int Endod J.* [Internet]. 1995;28(6):285-9. PMID: 8601517. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1995.tb00317.x>
- 5 Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* [Internet] 2008;34(11):1291-1301. e3. PMID: 18928835. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.07.028>
- 6 Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* [Internet] 2003;36(1):1-11. PMID: 12656508. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2003.00603.x>
- 7 Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* [Internet] 2002;35(3):221-8. PMID: 11985673. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2002.00504.x>
- 8 Bahador A, Pourakbari B, Bolhari B, Hashemi FB. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of nanosilver-mineral trioxide aggregate against frequent anaerobic oral pathogens by a membrane-enclosed immersion test. *Biomed J.* [Internet] 2015;38(1):77-83. PMID: 25179709. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/2319-4170.132901>
- 9 Gomes-Filho JE, Silva FO, Watanabe S, Cintra LT, Tendoro KV, Dalto LG, Pacanaro SV, Lodi CS, de Melo FF. Tissue reaction to silver nanoparticles dispersion as an alternative irrigating solution. *J Endod.* [Internet] 2010;36(10):1698-702. PMID: 20850681. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.07.007>
- 10 Zand V, Lotfi M, Aghbali A, Mesgariabasi M, Janani M, Mokhtari H, Tehranchi P, Pakdel SMV. Tissue Reaction and Biocompatibility of Implanted Mineral Trioxide Aggregate with Silver Nanoparticles in a Rat Model. *Iran Endod J* [Internet]. 2016;11(1):13-6. Disponível em: <https://doi.org/10.22037/iej.v11i1.8891>
- 11 Rezende G.C, Massunari L., Queiroz I.O.A, Gomes-Filho J.E., Jacinto R.C., Lodi C.S., Dezan-Junior E. Antimicrobial action of calcium hydroxide-based endodontic sealers after setting, against *E. faecalis* biofilm. *Brazilian Oral Research* [Internet]. 2016;30(1)e38. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0038>.
- 12 Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J.* [Internet] 2013;46(8):755-62. PMID: 23441819. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iej.12055>
- 13 Kimyai S, Lotfipour F, Pourabbas R, Sadr A, Nikazar S, Milani M. Effect of two prophylaxis methods on adherence of *Streptococcus mutans* to microfilled composite resin and giomer surfaces. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* [Internet] 2011;16(4):e561-7. Disponível em: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v16i4/medoralv16i4p561.pdf>
- 14 Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* [Internet] 2006;32(2):93-98. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.049>

- 15 Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod.* [Internet] 2014;40(2):285-90. PMID: 24461420. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.08.022>
- 16 Javidi M, Afkhami F, Zarei M, Ghazvini K, Rajabi O. Efficacy of a combined nanoparticulate/calcium hydroxide root canal medication on elimination of *Enterococcus faecalis*. *Aust Endod J.* [Internet] 2014;40(2):61-5. PMID: 25244219. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/aej.12028>
- 17 Punathil S, Moyin S, Bhat SS, Hedge S, Pai A, James J. Comparison of Antibacterial Effect of Calcium Hydroxide Combined With Chlorhexidine and Povidone-Iodine Against *Enterococcus faecalis* in Dentinal Tubules of Human Incisors: An In Vitro Comparative Study. *J Pharm Bioallied Sci.* [Internet] 2020;12(Suppl 1):S448-S452. PMID: 33149504; PMCID: PMC7595516. Disponível em: <https://www.jpbonline.org/text.asp?2020/12/5/448/292823>
- 18 Afkhami F, Pourhashemi SJ, Sadegh M, Salehi Y, Fard MJ. Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against *Enterococcus faecalis*. *J Dent.* [Internet] 2015;43(12):1573-9. PMID: 26327612. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.08.012>
- 19 Machado C.A.D, Souza A.C.A, Loureiro C, Martinho F.C, Cintra L.T.Â, Dezan Junior E, Jacinto R.C. Comparison of two rotary systems in bacteria/lps removal from endodontic infections: randomized clinical trial. *Brazilian Oral Research* [Internet]. 2019;33.e039. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0039>.
- 20 Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* [Internet] 1997;30(5):297-306. Erratum in: *Int Endod J* [Internet] 1998;31(2):148. PMID: 9477818. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1997.00092.x>