

# NOVA TENDÊNCIA DA MEDICAÇÃO INTRACANAL PARA ATUAÇÃO SOBRE *Enterococcus faecalis*: REVISÃO DE LITERATURA

## NEW TREND OF INTRACANAL MEDICATION TO ACT ON *Enterococcus faecalis*: REVIEW OF LITERATURE

ANA CÁSSIA DE SOUZA REIS<sup>1\*</sup>, PABLO MARANHÃO<sup>2</sup>, LUCAS ALVES MOURA<sup>3</sup>, KALENA DE MELO MARANHÃO<sup>4\*</sup>

1. Cirurgiã-Dentista, Mestre em Odontologia pela Universidade Federal do Pará, Docente do Curso de Graduação em Odontologia da Escola Superior da Amazônia (ESAMAZ); 2. Médico, Especialista em Medicina da Família e Comunidade pela Universidade Federal de Ciências da Saúde do Pará, Mestrando em Cirurgia Experimental pela Universidade Estadual do Pará; 3. Cirurgião-Dentista, Doutor em Periodontia pela Universidade de Piracicaba, Docente do Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade Integrada Brasil-Amazônia (FIBRA); 4. Cirurgiã-Dentista, Mestre em Odontologia pela Universidade Federal do Pará, Docente do Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade Mauricio de Nassau (UNINASSAU)

\* Travessa São Francisco, 246 Apto 702, Campina, Belém, Pará, Brasil.CEP:66023-530. [anacassiareis@gmail.com](mailto:anacassiareis@gmail.com)

Recebido em 30/07/2018. Aceito para publicação em 17/08/2018

### RESUMO

O *Enterococcus faecalis* são microrganismos frequentemente encontrados em infecções endodônticas persistentes, sendo provavelmente a espécie que melhor pode se adaptar e tolerar às condições ecológicas carentes existentes em canais obturados. Com o intuito de mostrar quais as características que o tornam tão resistente e verificar a suscetibilidade do mesmo, frente a diferentes agentes antimicrobianos, uma ampla revisão da literatura foi realizada visando analisar a atuação da medicação intracanal sobre esse agente etiológico. A busca foi fundamentada no acesso às bases de dados PubMed e Bireme. Cinquenta artigos satisfizeram os critérios de inclusão e foram utilizados nessa revisão. Os resultados mostraram que o *E. faecalis* apresenta rápida recuperação frente à privação nutricional e ao estresse ambiental, possui potentes fatores de virulência e se localiza em lugares de difícil acesso ao endodontista. Quando submetidos aos diferentes medicamentos intracanaís, o *E. faecalis* teve uma maior suscetibilidade aos que continham clorexidina. Porém, essa bactéria ainda apresenta um alto nível de complexidade em sua eliminação e um potencial risco ao insucesso endodôntico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Obturação do Canal Radicular, *Enterococcus Faecalis*, Hidróxido de Cálcio, Clorexidina.

### ABSTRACT

The *Enterococcus faecalis* are microorganisms frequently found in persistent endodontic infections and are probably the best species to adapt to and tolerate the poor ecological conditions in root canal obturation. In order to show which characteristics make *E. faecalis* so resistant and to verify its susceptibility to different antimicrobial agents, a broad literature review of the literature was performed aiming to analyze the performance of the intracanal medication on this etiologic agent. The search was based on access to the Pubmed and Bireme databases. Fifty manuscripts met the inclusion criteria

and were used in this review. The results showed that *E. faecalis* a rapid recovery from nutritional deprivation and environmental stress, has strong factors of virulence and is located in places difficult to reach the endodontist. When submitted to different intracanal medicinal products, *E. faecalis* had a higher susceptibility to those containing chlorhexidine. However, this bacterium still presents a high level of complexity in its elimination and a potential risk to endodontic failure.

**KEYWORDS:** Root Canal Obturation, *Enterococcus Faecalis*, Calcium Hydroxide, Chlorhexidine.

### 1.INTRODUÇÃO

O controle e a resolução das infecções pulpares e perirradiculares proporciona o sucesso do tratamento endodôntico, associado ao amplo conhecimento sobre a microbiologia que infecta os canais radiculares e à realização das diferentes etapas desse processo<sup>1</sup>. Ainda que pesquisas recentes apontem para a etapa do preparo químico-mecânico como o fator mais importante, as demais etapas corroboram para o sucesso do tratamento endodôntico<sup>2,3</sup>.

Os medicamentos intracanaís são utilizados como agentes antibacterianos. Tais medicamentos buscam tornar inertes os conteúdos restantes do canal, dissolver tecidos, atuar como uma barreira física e controlar a infiltração apical persistente de fluidos para o sistema de canais radiculares<sup>4</sup>. O uso da medicação intracanal, após o preparo biomecânico, tem sido uma alternativa na tentativa de se eliminar o máximo de bactérias remanescentes possível.

Sabe-se que a flora microbiana que persiste nos casos de insucesso difere da presente antes ou durante o tratamento. O isolamento de *Enterococcus faecalis* (*Ef*)

está diretamente associado ao insucesso do tratamento<sup>5,6</sup>. Dessa forma, a presença de infecção no momento do tratamento e de lesão periapical influencia negativamente no prognóstico<sup>7</sup>.

No interior dos canais radiculares ocorre uma seleção dos microrganismos devido a fatores como: disponibilidade de nutrientes, baixo potencial de óxido redução, pH, temperatura, interações positivas e negativas entre os microrganismos, além dos mecanismos de defesa do hospedeiro e presença de agentes antimicrobianos e inibidores do crescimento. Estes fatores tendem a favorecer o crescimento de espécies anaeróbias estritas<sup>8,9</sup>.

O *Ef* é uma das espécies predominantes nos casos de lesões refratárias ao tratamento<sup>5,7,10,11</sup>. A presença de suas toxinas e bacteriocinas, como a citolisina, explica o porquê da não existência de muitas outras espécies em associação com *Ef* em infecções endodônticas<sup>12</sup>. Por isso, grande parte da pesquisa endodôntica atual procura formas mais eficientes de combater este microrganismo. Adicionalmente, tais microrganismos comumente se organizam sob a forma de biofilme<sup>13,14</sup>, tornando-se ainda mais resistentes<sup>14,15</sup>.

### Enterococcus faecalis

O *Ef* compõe um grupo de bactérias Gram positivas que são associadas a infecções endodônticas e é frequentemente encontrado em canais obturados, com persistência de patologia perirradiculares<sup>10,16</sup>. Estudos in vitro mostram a capacidade deste de penetrar nos túbulos dentinários (o que não é observado por todas as espécies bacterianas), favorecendo a resistência aos efeitos antimicrobianos do hidróxido de cálcio<sup>17,18</sup>, provavelmente devido ao efetivo sistema de bombeamento de prótons que mantém níveis de pH citoplasmático ótimos, dificultando o tratamento endodôntico<sup>19</sup>.

Apresentam poucas exigências para o seu crescimento, sendo capazes de crescer em temperatura de 10 a 45 °C, pH 9,6 em 6,5% de solução salina, e de sobreviver a 60 °C por 30 minutos. São microrganismos facultativos, catalase-negativos, e a grande parte das espécies desse gênero hidrolisam esculina na presença de bile. Apesar de o canal radicular obturado ser pobre em nutrientes, *E. faecalis* obtém sua nutrição do ácido hialurônico presente na dentina por meio da degradação por hialuronidase, e, nos casos de selamentos inadequados do conduto, a entrada de fluidos potencializa a ação de *Ef*<sup>20</sup>.

Por sua adaptação e tolerância às condições ecológicas carentes existentes em canais tratados endodônticamente, sua resistência a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos<sup>21</sup>, (tetraciclina e gentamicina), sua capacidade de aderir ao colágeno na

presença de soro humano<sup>7,22</sup>, sua persistência no sistema de canais radiculares pode sustentar a presença de periodontite apical<sup>23</sup>. Dessa forma, a eliminação do *Ef* do canal radicular por meio do preparo e utilização de medicação intracanal tem sido um grande desafio.

Pinheiros *et al.* (2015)<sup>24</sup>, coletaram amostras de 18 dentes com infecção intraradicular persistente / secundária antes (S1) e após a preparação química (S2). *Ef* foi detectado em 77,8% e 72,2% das amostras S1 usando ensaios baseados em rRNA e rDNA, respectivamente. Após a preparação quimomecânica, o número de cópias de rRNA e rDNA foi significativamente reduzido ( $P < 0,05$ ).

### Hidróxido de cálcio

Em 1975, o hidróxido de cálcio foi empregado como medicação intracanal em dentes com necrose pulpar. Indicado para o tratamento biológico da polpa dental e para a obturação dos canais radiculares, o hidróxido de cálcio apresentava as vantagens de um antisséptico forte, sem ter os inconvenientes do mesmo. Devido às suas características e propriedades é utilizado até os dias atuais<sup>25,26</sup>.

A ação antisséptica decorre do pH altamente alcalino dentro do canal radicular, 12,5 aproximadamente, que destrói e altera as células bacterianas, neutralizando os lipopolissacarídeos (LPS – endotoxinas endodônticas) da parede celular, além de ter a capacidade de reparar o tecido atingido através da ativação enzimática do hospedeiro<sup>27</sup>.

Em um estudo in vitro para avaliação da eficácia do hidróxido de cálcio frente a *Candida albicans* e *Ef*, foi utilizado hidróxido de cálcio, clorexidina 2% e a associação dessas duas medicações. Como resultado, observou-se que o hidróxido de cálcio apresentou um halo maior de inibição que a clorexidina 2% frente *Candida albicans* nas primeiras 24 horas, e após este período a clorexidina 2% se mostrou mais eficaz frente *Candida albicans* e *Ef*, mesmo quando comparado à combinação das duas medicações<sup>28</sup>.

Em outro estudo foi avaliado e comparado o efeito antimicrobiano de hidróxido de cálcio e de gluconato de clorexidina 0,12% após um período de 24 horas em dentina de canais infectados com *Ef*. Os medicamentos foram testados isoladamente e em combinação, em diferentes profundidades nos túbulos dentinários infectados com o microrganismo. Os resultados mostraram uma atividade mais pronunciada na formulação que continha apenas hidróxido de cálcio<sup>29</sup>.

Barthel<sup>30</sup> *et al.* (2002), realizaram uma análise microbiana a partir de amostras obtidas a partir do canal radicular de restos radiculares removidos de voluntários. As raízes foram medicadas com pasta de hidróxido de cálcio, gel de clorexidina a 5% e uma mistura de

clorexidina-hidróxido de cálcio. Os acessos foram fechados e as raízes incubadas durante 1 semana. Após a remoção dos agentes antimicrobianos, as raízes foram incubadas por mais 1 semana para observar o crescimento bacteriano. Os resultados foram satisfatórios, com redução do crescimento bacteriano em 71% dos casos que usaram gel de clorexidina, 86% dos casos com hidróxido de cálcio e em 21% dos casos para mistura de clorexidina e hidróxido de cálcio, sugerindo que o hidróxido de cálcio poderia interferir com a capacidade antibacteriana da clorexidina quando da sua associação<sup>30</sup>.

A eficiência do hidróxido de cálcio frente bactérias anaeróbicas restritas e facultativas foi avaliado usando dentes bovinos infectados pelas bactérias de interesse e foram expostos a hidróxido de cálcio utilizando como veículo solução salina e paramonoclorofenol canforado (PMCC). Os resultados mostraram que mesmo após uma semana em contato com o hidróxido de cálcio/solução salina o *Ef* não foi eliminado, enquanto a mistura com PMCC conseguiu eliminar esta bactéria em apenas um dia de exposição, mostrando um melhor resultado quando associado o hidróxido de cálcio ao PMCC<sup>31</sup>.

Segundo Siqueira<sup>32</sup> *et al.* (2007), para compensar a ausência de algumas propriedades buscam-se as associações do hidróxido de cálcio, por exemplo, com o digluconato de clorexidina, por apresentar ações complementares às do hidróxido de cálcio, agindo à distância, mostrando efeitos antimicrobianos residuais, substantividade, e ser também eficaz sobre os microrganismos<sup>32</sup>.

### Clorexidina

A clorexidina é uma base forte, composta estruturalmente por dois anéis fenólicos nas extremidades, ligados a um grupamento biguanida de cada lado (carregada positivamente), sendo considerada a mais potente das biguanidas. A forma de sal oferece maior solubilidade e os primeiros sais apresentados foram os de acetato e cloridrato de clorexidina, entretanto ambos relativamente pouco solúveis em água, enquanto o digluconato tem sido o mais utilizado<sup>33</sup>.

Exerce os seus efeitos antibacterianos por perturbar a integridade da membrana citoplasmática, causando vazamento do conteúdo intracelular<sup>34</sup>. Quando em contato com a cavidade oral, a clorexidina sofre adsorção nos dentes, língua e mucosa oral, ligando-se aos mucopolissacarídeos salivares e a hidroxiapatita de forma reversível, permitindo sua liberação no meio oral, quando sua concentração é reduzida no meio oral. Esta propriedade é chamada de efeito residual ou substantividade<sup>35,36</sup>. Essa capacidade antimicrobiana de longa duração é demonstrada, especialmente, contra o *Ef*<sup>37,38</sup>.

Um dos primeiros estudos sugerindo a utilização da solução de clorexidina no tratamento endodôntico, teve por objetivo observar a adsorção e liberação da solução de clorexidina por polpas bovinas e amostras de dentina, assim como, suas propriedades antibacterianas após uma contaminação proposital por *Ef*. Como resultado, foi observado que as amostras, após serem tratadas com clorexidina, não evidenciaram contaminação depois de 48 e 72 horas de exposição à bactéria<sup>39</sup>.

Devido a sua substantividade, quando a clorexidina é usada como medicação intracanal, tanto em solução pura quanto em associação com hidróxido de cálcio, mantém um íntimo contato com tecidos perirradiculares por um longo período. Visando avaliar a resposta tecidual da solução de clorexidina 2%, hidróxido de cálcio e a associação de ambos, Semenoff *et al.* (2008)<sup>34</sup> testaram tais medicações na submucosa bucal de ratos Wistar, e concluíram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os materiais testados, entretanto, todos os materiais mostraram uma redução da severidade da reação inflamatória ao longo do tempo avaliado<sup>34</sup>.

O uso da clorexidina tem sido proposto em duas formas de apresentação: líquida e gel. Alguns estudos demonstram que a atividade antimicrobiana da clorexidina na forma líquida é igual ou superior a da forma gel quando utilizadas sob contato direto<sup>40,41</sup>.

Almyroudi *et al.* (2002)<sup>42</sup>, compararam a efetividade de quatro substâncias químicas usadas como medicação intracanal: hidróxido de cálcio, gel de clorexidina, PerioChip (uma fórmula de clorexidina em pastilha) e uma mistura de gel de clorexidina com hidróxido de cálcio. As substâncias foram testadas em 3 diferentes períodos (3, 8 e 14 dias), utilizando dentes humanos previamente contaminados por *Ef*. Os resultados mostraram que o hidróxido de cálcio eliminou os microrganismos em 3 e 8 dias, mas não foi eficaz no grupo de 14 dias, provavelmente devido a uma queda de pH. A clorexidina, nas diferentes formulações, foi eficaz na eliminação de *Ef* dos túbulos dentinários, sendo observado um melhor resultado com a utilização da clorexidina na forma de gel<sup>42</sup>.

Vivacqua-Gomes *et al.* (2005)<sup>43</sup> avaliaram a ação antimicrobiana da clorexidina sobre *Ef* após obturação endodôntica de dentes infectados e extraídos. A clorexidina gel a 2% foi utilizada como solução irrigadora, exibindo em todos os grupos experimentais células residuais de *Ef* viáveis dentro de túbulos dentinários, mesmo após 60 dias de obturação dos canais.

### Terapias alternativas

Extratos de plantas, como o extrato de própolis e óleo de melaleuca tem sido proposto como medicação para a associação ao hidróxido de cálcio, uma vez que

esses extratos aumentam a eficácia antimicrobiana da medicação intracanal, inibindo o crescimento de microrganismos, particularmente contra microrganismos resistentes, tais como *Ef*, que são frequentemente encontradas nas raízes de dentes infectados<sup>44</sup>.

A utilização do laser de baixa potência associado a um corante com características fotossensibilizadoras (azul de metileno e o azul de toluidina), chamada Terapia Fotodinâmica tem sido explorada em diferentes estudos. Esta técnica é bastante indicada na eliminação de cepas bacterianas antibiótico-resistentes, leveduras, vírus e parasitas. O processo está relacionado com a associação de uma agente fotossensibilizante com uma fonte de luz que produz espécies reativas de oxigênio ou radicais livres, que são tóxicas para os microrganismos<sup>45,46</sup>.

O interesse pela utilização dessa Terapia está relacionado principalmente ao efeito antimicrobiano comprovadamente constatado, visto que ela não promove resistência microbiana, é uma técnica de fácil aplicação, é indolor, e soma a todas essas características os efeitos benéficos advindos da terapia com laser<sup>45,46</sup>. Porém, ainda não foi estabelecido um protocolo em relação à terapia fotodinâmica. No entanto, surge uma nova perspectiva na eliminação de microrganismos persistentes na endodontia.

Por ser difícil de erradicar devido a sua elevada patogenicidade e pela sua forte associação à falha do tratamento endodôntico, surgiu a necessidade de atualizar conhecimentos nesta área, elucidando as características do *Ef* e ressaltando o conhecimento de agentes antimicrobianos e outras terapias alternativas sobre este agente patológico, intimamente relacionado com o insucesso endodôntico.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo trata de uma revisão narrativa de literatura que tem como abordagem: o conhecimento do mecanismo de ação das diferentes substâncias utilizadas na endodontia como medicação intracanal, bem como sua atuação sobre o microrganismo *Enterococcus faecalis*, o qual representa o agente etiológico mais frequentemente associado ao insucesso da terapia endodôntica. A literatura selecionada abrange artigos de 1990 a 2017 incluindo artigos clássicos (1974 à década de 80) disponíveis no banco de dados.

Durante o levantamento bibliográfico utilizou-se como critério de exclusão: artigos em duplicidade; artigos que não abordavam o tema proposto. A revisão consistiu em buscar artigos com os descritores: Obstrução do Canal Radicular, *Enterococcus faecalis*, Hidróxido de Cálcio e Clorexidina. Foram selecionados 50 artigos que satisfizeram os critérios de inclusão, para

serem abordados no presente trabalho de revisão. A seleção foi obtida através da verificação da base de dados PubMed e Bireme.

## 3. DISCUSSÃO

Existe uma grande dificuldade em eliminar microrganismos que permanecem nos sistemas de canais radiculares e túbulos dentinários, mesmo após o preparo químico-cirúrgico, demonstrando a necessidade de se complementar a terapêutica endodôntica com o emprego de uma medicação intracanal entre as sessões, a qual vem sendo sugerida e utilizada com o intuito de: 1) eliminar a infecção endodôntica; 2) neutralizar as endotoxinas; 3) prevenir a proliferação de microrganismos entre as seções e; 4) agir como uma barreira mecânica que evite a re-infecção do canal radicular e o aporte de nutrientes para microrganismos remanescentes do preparo químico-mecânico.

O *Ef* foi o microrganismo de escolha para realização desta pesquisa por possuir uma considerável resistência a substâncias químicas auxiliares e medicações comumente utilizadas em Endodontia além de estar frequentemente associado à presença de lesões perirradiculares persistentes e ao insucesso no tratamento endodôntico. Características microbiológicas, bem como seus fatores de virulência, determinam sua patogenicidade, o que se traduz em condições clínicas pouco favoráveis e persistência das infecções, mesmo quando o retratamento é instituído.

O *Ef* é um microrganismo anaeróbio facultativo, relativamente fácil de ser cultivado e de alta relevância clínica. Apresenta, em função dos seus fatores de virulência, grande resistência às defesas do hospedeiro e aos quimioterápicos, ressaltando sua resistência a elevados níveis de pH, o que o torna refratário às medicações intracanaís contendo hidróxido de cálcio<sup>32</sup>. Portanto, àquelas que contém hidróxido de cálcio como único elemento ativo são ineficazes em eliminar o *Ef* do canal, concordando com os estudos de Siqueira e Uzeda (1996)<sup>31</sup> e divergindo dos estudos de Barthel *et al* (2002)<sup>30</sup>, os quais mostraram que o hidróxido de cálcio foi eficaz na eliminação deste microrganismo.

Sendo assim, a presença do *Ef* na periodontite apical secundária pode ser explicada, principalmente, pela forte adesão desta bactéria ao colágeno da dentina<sup>47</sup>, a um número relativamente pequeno para a manutenção de células viáveis no interior do canal radicular<sup>48</sup> e a bomba de prótons por meio de sua membrana citoplasmática responsável pela manutenção do pH no interior da célula mesmo quando existe uma grande variação do pH do meio<sup>19</sup>.

A solução de digluconato de clorexidina a 2,0% quando aplicada por 10 minutos, previamente à

obturação endodôntica, é capaz de penetrar no tecido dentinário e manter a ação antimicrobiana por mais de 12 semanas, embora essa capacidade seja reduzida em função do tempo. A sua utilização como medicação intracanal pode ser vantajosa em casos com infecção primária e nos casos de retratamento pode ser ainda mais importante, possibilitando sua alternância como solução irrigadora ou como medicação intracanal<sup>36</sup>. Alguns estudos sugerem também o uso da clorexidina como medicação intracanal na forma de gel devido ao seu amplo espectro de ação antimicrobiano<sup>40,49</sup>. Porém, esta substância apresenta como desvantagem a incapacidade de atuar como barreira física.

Sendo assim, o fator motivador da associação do hidróxido de cálcio à clorexidina é o aumento da capacidade antimicrobiana do hidróxido de cálcio, melhorando sua capacidade de penetrabilidade nos túbulos dentinários, ou seja, é a atuação do hidróxido de cálcio como barreira física, enquanto que a clorexidina atua por meio da sua ação de substantividade. Divergindo dos resultados encontrados por Lynne *et al* (2003)<sup>29</sup> e Barthel *et al* (2002)<sup>30</sup>, sugerindo que o hidróxido de cálcio poderia interferir com a capacidade antibacteriana da clorexidina quando da sua associação<sup>30,50</sup>.

Além das medicações tradicionalmente utilizadas, diversas pesquisas têm buscado terapias alternativas no que diz respeito a atuação frente à microorganismos resistentes, como o *Ef*. Dessa forma, os óleos e extratos de plantas, bem como a terapia Fotodinâmica têm sido utilizados para fins terapêuticos como medicação intracanal. As propriedades antimicrobianas de determinados óleos, extratos e/ou seus componentes em relação a flora bacteriana intracanal mostraram-se eficazes frente ao *Ef*, inibindo o crescimento de microorganismos em dentes necrosados, através da lise e perda de integridade e função da membrana celular da bactéria, o qual se manifesta por extravasamento de íons e inibição da respiração<sup>45</sup>.

Já a terapia Fotodinâmica, que tem por finalidade a fotossensibilização letal sobre microorganismos tem a vantagem que a luz pode ser redirecionada em virtude da sua transmissão através dos prismas de esmalte e túbulos dentinários, não sendo o complexo sistema de canais um impedimento para sua atuação como ocorre com as outras terapias<sup>45,46</sup>.

#### 4. CONCLUSÃO

Considerando que tanto o hidróxido de cálcio quanto a clorexidina e outras medicações, quando empregados isoladamente como medicação intracanal entre as sessões, não apresentam atributos suficientes para conter a infecção endodôntica de maneira satisfatória, faz-se necessário a busca por estratégias, como a terapia fotodinâmica e a associação de medicações, que

contemplem os objetivos do tratamento endodôntico, visando a eliminação de microorganismos resistentes, como o *Enterococcus faecalis*, o qual é a bactéria mais comumente associada aos insucessos endodônticos.

#### REFERÊNCIAS

1. Nacif MCAM, Alves FRF. *Enterococcus faecalis* na Endodontia: um desafio ao sucesso. Rev Bras Odontol 2010. 67(2):209-14.
2. Whitworth J. Methods of filling root canals: principles and practices. Endodontic Topics. 2005. 12:2-24.
3. Halim NF, Drumond NH, Queiroz CK, Marão ACPR, Tebechrani FC. Propriedades do Paramonoclorofenol Canforado e Paramonoclorofenol Canforado Associado ao Hidróxido de Cálcio Pesq Bras Odontoped e Clín Integ 2007. 7(3):235-9.
4. Davis JM, Maki J, Bahcall JK. An In Vitro Comparison of the Antimicrobial Effects of Various Endodontic Medicaments on *Enterococcus faecalis*. J Endod 2007. 33(5):567-9.
5. Molander A, Dahlén G. Evaluation of the antibacterial potencial of tetracycline or erythromycin mixed with calcium hydroxide as intracanal dressing against *Enterococcus faecalis* in vivo. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003. 96(6):744-50.
6. Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, *et al*. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. Oral Microbiol Immunol 2005. 20(1):10-19.
7. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998. 85(1):86-93.
8. Gomes BPFA, Drucker DB, Liley JD. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. Int Endod J 1996a. 29:69-75.
9. Gomes BPFA. Microorganismos: quais são, onde estão e que danos causam? In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. (Org). Endodontia & Trauma. 2002. 2:77-97.
10. Sirén EK, Haapasalo MP, Waltimo TM, Ørstavik D. In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *enterococcus faecalis*. Eur J Oral Sci 2004. 112(4):326-31.
11. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod 2004. 97(1):85-94.
12. Kayaoglu G, Erten H, Ørstavik D. Growth at high pH increases *Enterococcus faecalis* adhesion to collagen. Int Endod J 2005. 38:389-96.
13. George S, Kisben A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. J Endod 2005. 31(12):867-872.
14. Liu H, Wei X, Ling J, Wang W, Huang X. Biofilm formation capability of *Enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. J Endod 2010. 36(4):630-5.

15. Abdullah M, Ng Y-L, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* 2005. 31(1):30-6.
16. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004. 30(5):315-20.
17. Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *Journal of Dental Research* 1987. 66(8):1375-9.
18. Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressing of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990. 6 (4):142-9.
19. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus Faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002. 35(3):221-8.
20. Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. *Enterococcus faecalis*: clinical and microbiological considerations. *Rev Odontol UNESP* 2007. 36(2):163-8.
21. Fabricius L, Dahlen G, Holm SE, Moller AJR. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982. 90:200-6.
22. Love RM. *Enterococcus faecalis*- a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001. 34:399-405.
23. Komorowski R, Grad H, Xiao YW, Friedman S. Antimicrobial Substantivity of Chlorhexidine-Treated Bovine Root Dentin. *J Endod* 2000. 26(6):315-7.
24. Pinheiro ET, Candeiro GT, Teixeira SR, Shin RC, Prado LC, Gavini G, *et al.* RNA-based Assay Demonstrated *Enterococcus faecalis* Metabolic Activity after Chemomechanical Procedures. *J Endod* 2015. 41(9):1441-4.
25. Oliveira EPMD, Irala LED, Santos AR, Melo TAF. Avaliação da ação antimicrobiana de quatro formulações a base de hidróxido de cálcio utilizadas como medicação intracanal. *Revista da Faculdade de Odontologia UPF* 2010. 15(1):35-9.
26. Kim D, Kim E. Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review - Part I. In vitro studies. *Restorative Dentistry & Endodontics* 2014. 39(4):241-252.
27. Marques Da Silva B, Tomazinho FSF, Anele JA, Leonardi DP, Filho FB. A ação do hidróxido de cálcio frente ao *enterococcus faecalis* nos casos de periodontite apical secundária. *Odonto* 2010. 18(36):95-105.
28. Ballal V, Kundabala M, Acharya S, Ballal M. Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. *Aust Dent J* 2007. 52(2):118-21.
29. Lynne RE, Liewehr FR, West LA, Patton WR, Buxton TB, Mcpherson JC. In Vitro Antimicrobial Activity of Various Medication Preparations on *E. faecalis* in Root Canal Dentin. *J Endod* 2003. 29(3):187-90.
30. Barthel CR, Zimmer S, Zilliges S, Schiller R, Roulet JF. In Situ Antimicrobial Effectiveness of Chlorhexidine and Calcium Hydroxide: Gel and Paste Versus Gutta-Percha Points. *J Endod* 2002. 28(6):427-30.
31. Siqueira JF, Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod* 1996. 22(12):674-6.
32. Siqueira JrJF, Guimarães-Pinto T, Rôças IN. Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. *J Endod* 2007-b. 33(7):800-5.
33. Zehnder M. Root Canal Irrigants. *J Endod* 2006. 32(5):389-98.
34. Semenoff TADV, Semenoff Segundo A, Figueiredo JAP. Biocompatibility of different intracanal medications in rat buccal submucosa tissue. *J Appl Oral Sci* 2008. 16(1):12-7.
35. Rölla G, Løe H, Schiott CR. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Arch Oral Biol* 1974. 16:1109-16.
36. Rölla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res* 1975. 54:57-62.
37. Zamany A, Safavi K, Spångberg LSW, Conn F. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003. 96:578-81.
38. Soares JA, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LAB, Ito IY. Residual Antibacterial Activity of Chlorhexidine Digluconate and Camphorated P monochlorophenol in Calcium Hydroxide-Based Root Canal Dressings. *Braz Dent J* 2007. 18(1):8-15.
39. Parsons GJ, Patterson SS, Miller CH, Katz S, Kafrawy AH, Newton CW. Uptake and release of chlorhexidine by bovine pulp and dentin specimens and their subsequent acquisition of antibacterial properties. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980. 49:455-9.
40. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod* 2001. 27:452-5.
41. Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004. 97:79-84.
42. Almyroudi A, Mackenzie D, McHugh S, Saunders WP. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an in vitro study. *J Endod* 2002. 28(3):163-7.
43. Vivacqua-Gomes N, Gurgel-Filho ED, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth ex vivo. *Int Endod J* 2005. 34:697-704.
44. Rezende GPSR, Costa LRRS, Pimenta FC, Baroni DA. In vitro antimicrobial activity of endodontic pastes with propolis extracts and calcium hydroxide: A preliminary study. *Braz Dent J* 2008. 19(4):301-5.
45. Carvalho ES, Carvalho Edos S, Mello I, Albergaria SJ, Habitante SM, Lage-Marques JL, *et al.* Effect of chemical substances in removing methylene blue after photodynamic therapy in root canal treatment. *Photomed laser surg* 2011. 29(8):559-63.

46. Diogo P, Fernandes C, Caramelo F, Mota M, Isabel M, Miranda IM, *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy against Endodontic *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* Mono and Mixed Biofilms in the Presence of Photosensitizers: A Comparative Study with Classical Endodontic Irrigants. *Front in Microb* 2017. 498(8):1-11.
47. Kayaoglu G, Erten H, Orstavik D. Possible role of the adhesin ace and collagen adherence in conveying resistance to disinfectants on *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiol Immunol* 2008. 23(6):449-54.
48. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003. 18(4):234-9.
49. Gomes BPFA, Souza FC, Ferraz CCR, Teixeira FF, Zaia AA, Valdrighi L, *et al.* Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J* 2003. 36:267-75.
50. Schäfer E, Bössmann K. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Two Calcium Hydroxide Formulations Against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005. 31:53-6.