

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**DEBORAH MEIRELLES COGO**

**POTENCIALIZAÇÃO DA AÇÃO DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO PELO INIBIDOR  
DA BOMBA DE PRÓTONS OMEPRAZOL SOBRE O *ENTEROCOCCUS  
FAECALIS***

Porto Alegre

2012

**DEBORAH MEIRELLES COGO**

**POTENCIALIZAÇÃO DA AÇÃO DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO PELO INIBIDOR  
DA BOMBA DE PRÓTONS OMEPRAZOL SOBRE O *ENTEROCOCCUS  
FAECALIS***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre em Endodontia, pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

**Orientador: Profa. Dra. Fabiana Vieira Vier Pelisser**

**Co-orientador: Profa. Dra. Patrícia Maria Poli Kopper Móra**

Porto Alegre

2012

DEBORAH MEIRELLES COGO

**POTENCIALIZAÇÃO DA AÇÃO DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO PELO INIBIDOR  
DA BOMBA DE PRÓTONS OMEPRAZOL SOBRE O *ENTEROCOCCUS  
FAECALIS***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre em Endodontia, pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof Dr. Francisco Montagner

---

Prof.Dr. José Antonio Poli de Figueiredo

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Vieira Vier Pelisser (orientadora)

Porto Alegre

2012

Dedico esta dissertação a todos os professores que ao cruzarem minha vida acadêmica me mostraram o quanto é bom estudar.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Neroli e Clara, pelo sacrifício feito para oferecer aos filhos um ensino da melhor qualidade possível. Pela amizade e carinho constantes e incentivos às grandes mudanças que ocorreram ao longo da minha vida.

Ao meu marido, Thiago, grande amor da minha vida e exemplo profissional, pelo apoio durante os momentos difíceis e por ser minha alegria sempre.

Aos meus irmãos, Laura e Ricardo, pelo companheirismo e me fazer sentir em casa quando estava em Porto Alegre. Vocês me ajudaram muito mesmo.

Ao meu filhote, Leopoldo, por me acalmar e encher meu coração de felicidade ao vê-lo quando chegava cansada em casa.

A minhas orientadoras, Profa. Dra. Fabiana Vieira Vier Pelisser e Dra. Patrícia Maria Poli Kopper Móra pela amizade e dedicação.

Ao meu querido professor, Prof. Dr. José Antonio Poli de Figueiredo, que me impulsionou a fazer o mestrado, me ajudou muito no meu crescimento acadêmico e será sempre um grande amigo. Terás minha gratidão pra sempre!

Aos meus queridos mestres e amigos, Profs. da UFRGS: Regis Burmeister dos Santos, Fabiana Grecca Villela, João Ferlini Filho e Elaine Fachin por despertarem em mim a paixão pela Endodontia.

A toda equipe atual de Profs. da UFRGS: Regis Burmeister dos Santos, Fabiana Grecca Villela, João Ferlini Filho, Francisco Montagner, Simone Bonato Luisi, Augusto Bonadezi e Marcus Vinícius Reis Só, pela inestimável oportunidade de ser professora substituta na graduação da Faculdade em que me formei, sendo esse momento crucial para sedimentação da idéia de que adoro ensinar.

Aos professores de Endodontia do CEOM, Volmir João Fornari, José Roberto Vanni e Mateus Silveira Martins Hartmann pela oportunidade de trabalhar como professora no curso de especialização em Endodontia, pelos ensinamentos e pela troca de experiências.

Aos queridos professores Cezar Garbin e Lillian Rigo, pela amizade e estímulo à carreira acadêmica.

Aos meus professores do curso de pós-graduação da PUCRS: Dr. José Antonio Poli de Figueiredo, Dra. Maria Martha Campos, Dr. Eraldo Batista Junior, Dr. João Batista Weber, Dra. Fabiana Vieira Vier Pelisser, Dra. Marília Gerhardt de Oliveira, Dr. Mario Wagner, pela dedicação e ensinamentos científico-intelectuais.

À secretaria da Pós-Graduação pela disponibilidade e acolhimento.

À PUCRS, pela oportunidade de realizar um curso de tanta qualidade.

À Capes e ao CNPq, pelo incentivo à pesquisa científica e oportunidade de estudo dado a todos os alunos dos Programas de Pós-Graduação em Odontologia.

Aos meus queridos colegas de curso pela convivência e por compartilhar as alegrias e frustrações.

À professora, Dra. Silvia Dias de Oliveira, e as alunas iniciação científica Fernanda Camargo Antunes e Jéssica Stephanie Rodrigues Nasário, pelo auxílio na realização da parte experimental da dissertação.

À Fitonfarma, especialmente ao farmacêutico Eduardo, que me ajudou inúmeras vezes com minhas dúvidas e realizou cálculos matemáticos imprescindíveis para a realização do experimento.

A todos que me ajudaram no Mestrado, muito obrigada.

## RESUMO

**Introdução:** O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, o efeito do hidróxido de cálcio (HC) e do inibidor da bomba de prótons Omeprazol (O), isolados e associados contra o *Enterococcus faecalis*, assim como avaliar se a acidificação do O influenciou nesse contexto. **Métodos:** A metodologia foi baseada no modelo para Concentração Inibitória Mínima (CIM) em macrodiluição do CLSI (Clinical Laboratory and Standards Institute). A atividade antibacteriana foi avaliada contra o *E. faecalis* (ATCC 29212). Soluções de HC, O e associações dessas substâncias em diferentes concentrações, foram preparadas e colocadas em contato com o inóculo no meio de cultura Mueller Hinton. Os tubos permaneceram em estufa por 24h, diluições seriadas foram semeadas em ágar, e após 48h, realizou-se a contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) / mL. Também avaliou-se a CIM das medicações. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, empregando-se ANOVA e *post-hoc* de Tukey, para  $\alpha=5\%$ . **Resultados:** A CIM para o HC foi de 32mg/mL, porém quando associado ao O e OA reduziu para 16mg/mL. O O e o OA tiveram comportamentos semelhantes. **Conclusão:** O O potencializa o efeito do HC, uma vez que a associação desses medicamentos reduz a CIM para o *E. faecalis*. A acidificação do O, quando associado ao HC nas diferentes concentrações, não influenciou o seu efeito.

**Palavras-chave:** *in vitro*, *Enterococcus faecalis*, hidróxido de cálcio, omeprazol.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** The aim of this *in vitro* study was to evaluate the effect of calcium hydroxide (CH), omeprazole (O) and associations of these substances against *Enterococcus faecalis*, as well as to evaluate if the acid-catalysation of the O had any influence in the results. **Methods:** The methodology used was adapted from the CLSI (Clinical Laboratory and Standards Institute) macrodilution MIC (Minimum Inhibitory Concentration) test. Antibacterial activity was evaluated against *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Solutions with different concentrations of CH, associated or not with O were prepared and placed in contact with the inocula in the culture medium Mueller Hinton. The tubes remained in a dry-heat oven for 24h, serial dilutions were cultivated in agar plates, and after 48h, colony-forming units (CFU) mL<sup>-1</sup> was determined. The MIC was also evaluated. Data were statistically analyzed using ANOVA test with Tukey post-hoc, with a level of significance of 5%. **Results:** The MIC for CH was 32 mg mL<sup>-1</sup>, however reduced to 16 mg mL<sup>-1</sup> when associated with O. The O and AO had similar behavior. **Conclusion:** O potentiates the effect of CH, since the association of these drugs reduces the MIC for *E. faecalis*. The acidification of O, when associated with CH in different concentrations, did not influence its effect.

**Key words:** *in vitro*, *Enterococcus faecalis*, calcium hydroxide, omeprazole.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>2. ARTIGO</b>	<b>15</b>
<b>3. DISCUSSÃO</b>	<b>27</b>
<b>4. REFERÊNCIAS</b>	<b>30</b>
<b>ANEXOS</b>	
ANEXO A. CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA	35
ANEXO B. BANCO DE DADOS	36
ANEXO C. DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO	41
ANEXO D. SUBMISSÃO DO ARTIGO	43

## 1. INTRODUÇÃO

Desde que um estudo clássico da literatura endodôntica (1) comprovou a necessidade da presença de microrganismos para a ocorrência de necrose pulpar e processo patológico perirradicular, têm-se procurado caracterizar essa microbiota. Atualmente sabe-se que apesar de mais de 700 espécies bacterianas colonizarem o ambiente oral (2), as bactérias presentes nos canais radiculares infectados pertencem a um grupo bem mais restrito; sendo esta uma infecção mista e polimicrobiana, com predomínio de bactérias anaeróbias estritas (3,4).

A grande maioria dos insucessos endodônticos relaciona-se a falhas nos processos de desinfecção e à manutenção dos microrganismos no sistema de canais radiculares. Alguns destes parecem estar mais frequentemente associados a infecções resistentes, devido a seus fatores de virulência (5,6,7).

A literatura mostra que o índice de sucesso dos retratamentos endodônticos é menor do que o da terapia endodôntica convencional, ficando em torno de 75% (8). Este fato reforça a idéia de que além dos fatores anatômicos que impõe dificuldades aos processos de desinfecção, provavelmente há uma microbiota distinta nesses casos, sendo necessária uma diferente abordagem para a obtenção de adequada limpeza do sistema de canais radiculares.

A microbiota presente em situações de reintervenção endodôntica pode ser caracterizada como uma comunidade predominantemente composta por bactérias gram-positivas, com aproximadamente a mesma proporção de anaeróbias estritas e facultativas (8,9) ou com maioria facultativa (10). Tal fato pode estar relacionado à menor suscetibilidade desses microrganismos aos processos de desinfecção (9,10). Algumas bactérias anaeróbias facultativas, como o *E. faecalis*, têm-se mostrado mais resistentes aos processos de desinfecção (8,11).

Estudos mais recentes da microbiota em casos de insucesso endodôntico, utilizando métodos moleculares de identificação bacteriana têm sugerido que a flora persistente possa ser mais complexa do que se imaginava. Isto porque com o uso dessas técnicas foram detectadas muitas espécies ainda não cultivadas (12,13,14,15). Porém, é necessário ter-se em mente que as técnicas moleculares identificam todo DNA presente, seja ele pertencente a bactérias viáveis ou não (16), o que pode levar a uma má interpretação desses dados.

A presença do *E. faecalis* na microbiota endodôntica primária é muito pequena. Porém, esta bactéria tem-se destacado naqueles casos considerados refratários ao tratamento, onde sua prevalência varia de 38% a 77% (5,8,9,10,18,19,20). No entanto, um estudo mais recente (21), usando técnicas moleculares, demonstrou a presença do *E. faecalis* em 86% das infecções primárias e em 76% das infecções secundárias.

Estudos *in vitro* demonstraram a capacidade de penetração do *E. faecalis* nos túbulos dentinários, habilidade não demonstrada em todas as espécies microbianas (22). Dessa forma, tal microrganismo torna-se inacessível a ação das substâncias irrigadoras e medicações intracanal (6,22,23). Além disso, foi verificada sua habilidade de formação de biofilme no sistema de canais radiculares, mesmo na presença de medicação intracanal (24).

Algumas investigações constataram que o *E. faecalis* tem a capacidade de sobreviver por muitos meses em ambientes com limitação de nutrientes em estado metabólico mínimo (25). Além disso, Abdullah *et al.* (26) demonstraram que a eliminação do *E. faecalis* organizado em biofilme é mais difícil do que na forma planktonica, principalmente quando os agentes antimicrobianos não possuem poder de dissolução de matéria orgânica. Isto pode ser decorrente de uma mudança fenotípica no biofilme, tais como alterações na composição proteica das membranas ou bombas de efluxo dos medicamentos.

O hidróxido de cálcio (HC) tem demonstrado efeitos antimicrobianos nos canais radiculares devido a sua excelente ação bactericida e bacteriostática. Isto ocorre pela sua dissociação em íons cálcio e íons hidroxila, os quais influenciam no metabolismo celular (27,28).

Os íons hidroxila são radicais livres altamente oxidantes que reagem com diversas moléculas indiscriminadamente, inclusive bactérias. Seus efeitos letais sobre estas provavelmente devem-se a um efeito destrutivo na membrana celular, estruturas protéicas (enzimas e proteínas estruturais) e no próprio DNA bacteriano (29,30).

O pH do HC comumente varia entre 12 e 12,5 (11,31), o que causa a eliminação da grande maioria das bactérias encontradas nos canais radiculares infectados, após um curto espaço de tempo, quando em contato direto (11,31,32). No estudo de Kayaoglu *et al.* (33), o *E. faecalis* mostrou-se susceptível à ação do

HC, em contato direto, após 24 horas. Entretanto, clinicamente, o contato direto nem sempre é possível.

Pelo fato da hidroxiapatita da dentina humana apresentar uma alta capacidade tampão, para que o HC seja eficaz, os íons hidroxila devem ser capazes de suplantam essa neutralização (34,35).

Devido a dificuldade em elevar o pH à distância, vários estudos têm mostrado que o HC é pouco eficaz na presença do *E. faecalis* (22,36,37,38). Este fato pode resultar da baixa difusão dos íons hidroxila na dentina infectada ou, até mesmo, do efeito tampão da dentina (23).

Evans *et al.* (39) investigaram *in vitro* os mecanismos envolvidos na resistência do *E. faecalis* ao HC. O estudo demonstrou que em um pH de 11,1 ou menor, o *E. faecalis* é capaz de sobreviver; porém, isso não ocorre a um pH de 11,5. No mesmo estudo, procurou-se verificar o papel da bomba de prótons da membrana celular do *E. faecalis* na sua tolerância a condições de alta alcalinidade. Para tanto, células de *E. faecalis* foram expostas ao HC, a um pH de 11,1, na presença de um inibidor da bomba de prótons (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone – CCCP). Os resultados mostraram que a presença do CCCP reduziu em 20 vezes a taxa de sobrevivência deste microrganismo. Portanto a presença da bomba de prótons é de fundamental importância para a sobrevivência do *E. faecalis* em ambientes alcalinos, pois dessa forma, ele tem a capacidade de acidificar seu citoplasma.

Apesar dos estudos demonstrarem que ocorre uma alcalinização do meio quando o HC é utilizado, para o *E. faecalis*, os níveis de pH alcançados, muitas vezes, não são letais. Tal tolerância bacteriana pode ser atribuída a ativação do sistema da bomba de prótons, de sistemas enzimáticos específicos e/ou de sistemas tampão que auxiliam na manutenção do pH interno bacteriano praticamente constante (29,39,40). Além disso, é possível que alguns produtos bacterianos, secretados durante seu crescimento, possam ajudar na neutralização do pH do ambiente (29).

Sendo assim, nos casos onde a microbiota tem-se provado resistente, pode ser necessário o uso de outros medicamentos, associados ao HC, para auxiliar na redução da infecção (23,41,42). Estudos associando o HC ao PMCC (Paramonoclorofenol Canforado) e a clorexidina têm sido desenvolvidos. Na presença do *E. faecalis*, os resultados de tais associações se mostraram

favoráveis, mas ainda não são ideais (10,11,23,41,42), o que justifica a realização de estudos adicionais nesta linha de pesquisa.

Devido à grande resistência do *E. faecalis* aos procedimentos clínicos usuais de descontaminação do sistema de canais radiculares e a sua presença em grande quantidade nos casos de infecção persistente, compostos com capacidade de inibir a ação da bomba de prótons da membrana bacteriana, que regula o seu pH interno, poderiam potencializar os efeitos do HC, aumentando as possibilidades de eliminação desta espécie.

Atualmente, um dos inibidores da bomba de prótons utilizado por via oral para o tratamento de distúrbios gastrointestinais é o omeprazol (O), o qual apresenta resultados altamente favoráveis quanto à toxicidade (43). Seu mecanismo de funcionamento dá-se através da inibição específica da  $H^+K^+$ -ATPase, uma bomba de prótons localizada na membrana secretora das células parietais da mucosa gástrica, a qual é responsável pelo último passo da secreção ácida.

Tal medicamento é uma pró-droga que necessita de indução ácida para sua ativação, o que ocorre no compartimento das células parietais. Sendo assim, estudos *in vitro* testaram seus efeitos antimicrobianos dissolvendo a droga previamente em substâncias ácidas (44,45).

Quando o O foi avaliado puro, foi demonstrado, *in vitro*, que apesar de não ser capaz de eliminar o *Helicobacter pylori* apresenta propriedades antimicrobianas, embora a sua forma de atuação ainda não esteja esclarecida (46). A sua associação com metronidazol também tornou o mesmo microrganismo mais susceptível ao antibiótico (44).

Estudos *in vitro* investigaram a CIM (concentração inibitória mínima) do HC e do O contra diferentes microrganismos, inclusive o *E. faecalis* (45,47).

No estudo de Jonkers et al (45) o O teve efeito antibacteriano sobre o *E. faecalis* apenas quando testado em solução cujo pH foi ajustado para tornar-se ácido (pH 5). Como o efeito ainda estava presente após 24hs, sugere-se que este efeito seja bactericida. Quando testada a possível interação entre o O e antibióticos (amoxicilina e doxiciclina) não houve efeito sinérgico ou antagonista do O com ambos antibióticos. Os resultados também sugeriram que parte do efeito do O sobre o crescimento bacteriano *in vitro* é devido a sua ligação com a cisteína do meio de cultura, pois a suplementação do meio com cisteína resultou

na redução do efeito inibitório. Além disso, o aumento da concentração do meio de cultura prevenindo a falta de nutrientes também resultou na redução do efeito inibitório do O.

Já Pallota *et al.* (47) investigaram a CIM de 4 medicações utilizadas em Endodontia, entre elas o HC e uma associação deste com outras substâncias - CFC (ciproflaxina, metronidazol e HC) contra diversas bactérias. Contra o *E. faecalis*, a CIM para o HC foi de 16mg/mL, enquanto para o CFC foi de 0,125mg/mL. A associação de medicações (CFC) foi a que apresentou os melhores resultados.

Até o presente momento, exclusivamente Wagner *et al.* (48) estudaram a eficácia da associação de um inibidor da bomba de prótons (O) com o HC como medicação intracanal, em um modelo de lesões periapicais em ratos. As análises radiográfica e histológica demonstraram que tanto a pasta de HC puro quanto a sua associação com O resultaram em redução das lesões periapicais após 28 dias, quando comparadas ao grupo controle. A redução das lesões periapicais e das células inflamatórias foi visivelmente melhorada pela associação do O com o HC, com um aumento das áreas de reparo ósseo. Apesar desses promissores resultados, neste estudo não houve controle das concentrações utilizadas na associação das substâncias, sendo as mesmas combinadas em volumes iguais. Além disso, essa associação não foi testada com uma microbiota comum em casos refratários ao tratamento endodôntico.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, o efeito antimicrobiano do HC e do O, isolados e associados, contra o *E. faecalis*, assim como verificar a necessidade de acidificação do O nesse contexto.

## 2. ARTIGO

**Formatado conforme diretrizes do Journal of Endodontics (J Endod)- Fator de impacto: 3.291**

### **POTENTIATION OF THE ACTION OF CALCIUM HYDROXIDE ON ENTEROCOCCUS FAECALIS BY THE PROTON PUMP INHIBITOR OMEPRAZOLE**

Deborah Cogo<sup>a</sup> BDS; Sílvia Dias de Oliveira<sup>b</sup> MSc, PhD; Fernanda Camargo Antunes<sup>b</sup>; Patrícia Maria Poli Kopper<sup>c</sup> BDS, MSc, PhD; Jéssica Stephanie Rodrigues Nasário<sup>b</sup>; Fabiana Vieira Vier Pelisser<sup>a</sup> BDS, MSc, PhD.

a Department of Endodontics, Graduate Program, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil;

b Laboratory of Immunology and Microbiology, Graduate Program, School of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil;

c Department of Endodontics, Graduate Program, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil;

Address correspondence to:

Fabiana Vieira Vier-Pelisser

Graduate Program in Dentistry Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul – PUCRS, Porto Alegre, Brazil

Corresponding address:

Av. Ipiranga 6681 Prédio 6

CEP 90619-900 Porto Alegre – RS – Brazil

Phone: 55 51 3320 3562

## POTENTIATION OF THE ACTION OF CALCIUM HYDROXIDE ON ENTEROCOCCUS FAECALIS BY PROTON PUMP INHIBITOR OMEPRAZOLE

### ABSTRACT

**Introduction:** The aim of this *in vitro* study was to evaluate the effect of calcium hydroxide (CH), omeprazole (O) and associations of these substances against *Enterococcus faecalis*, as well as to evaluate if the acid-catalysation of the O had any influence in the results. **Methods:** The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of these drugs against *E. faecalis* (ATCC 29212) was determined using macrodilution test adapted from the CLSI (Clinical Laboratory and Standards Institute). Solutions with different concentrations of CH, associated or not to O, were tested. Data were statistically analyzed using ANOVA test with Tukey post-hoc, with a level of significance of 5%. **Results:** The MIC to CH was 32 mg mL<sup>-1</sup>, however reduced to 16 mgmL<sup>-1</sup> when associated with O. The O and AO had similar activity. **Conclusion:** O potentiates the effect of CH, since the association of these drugs reduces the MIC for *E. faecalis*. The acidification of O, when associated with CH in different concentrations, did not influence its effect.

**Key words:** *in vitro*, *Enterococcus faecalis*, calcium hydroxide, omeprazole.



## Introduction

The presence of the *E. faecalis* has stood out in those cases considered refractory to the endodontic treatment (1-8) due to its resistance to conventional disinfection processes (3,9).

This facultative anaerobic bacterium has the ability to survive for many months in environments with limited nutrients in minimum metabolic condition (10). Its elimination is difficult, especially when organized in biofilm (11), this may be due to a phenotypic change in the biofilm, such as changes in the protein composition of the membranes or drug efflux pumps.

Several studies have shown that the CH is not very effective against *E. faecalis* (12-15). Such bacterial tolerance may be attributed to the activation of the proton pump, of specific enzyme systems and/or buffering systems that assist in the maintenance of the bacterial internal pH practically constant (16-18).

Thus, in cases where the microbiota has been proved resistant, the association of other drugs with CH could reduce the infection (19-21). However, in the presence of *E. faecalis*, the CH associated with the PMCC (Camphorated Paramonochlorofenol) and the chlorhexidine has not shown promising results (2,9,19-21).

Currently, one of the proton pump inhibitors, used orally for the treatment of gastrointestinal disorders is omeprazole (O). Its mechanism of functioning takes place through the specific inhibition of the H + K<sup>+</sup>-ATPase, a proton pump located in the secretory membrane of the parietal cells of the gastric mucosa, which is responsible for the final step of the acid secretion. Regarding the antimicrobial activity of the proton pump inhibitors, has been shown *in vitro* that O by itself has some effect against the *Helicobacter pylori* (22). Its association with metronidazole also made the same microorganism more susceptible to the antibiotic (23). *In vitro* studies have investigated the MIC (minimum inhibitory concentration) of the CH and the O against different microorganisms, including *E. faecalis* (24,25).

Omeprazole is a prodrug which seems to require acid induction for its activation, as occurs in the compartment of the parietal cells. Therefore, *in vitro* studies previously dissolve the drug in acid substances (23,24). However, to date, no studies have compared whether the acidification of this drug has a superior

antimicrobial effect, particularly when associated with the CH, which has an alkaline pH.

Wagner et al. (26) related that association of O with CH favored a superior repair of rat periapical lesions and seemed to display different selective activity over endodontic microbiota, in comparison with the conventional CH dressing. But in this study, the concentration of the substances was not controlled, and the medications were not tested against a known microbiota of refractory periapical lesions.

Due to the high resistance of the *E. faecalis* and its presence in large numbers in cases of persistent infection, compounds capable of inhibiting the action of the proton pump of the bacterial membrane, which regulates the internal pH of the bacteria, could potentiate the effects of the CH, increasing the possibility of elimination of this bacterial species.

Therefore, the aim of this study was to evaluate *in vitro* the antimicrobial effect of the CH and the O, isolated and associated, against the *E. faecalis*, as well as to verify the need for acidification of O in this context.

### **Materials and Methods:**

The antimicrobial activity of the drugs was verified through determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) using macro dilution test adapted from the CLSI (Clinical Laboratory and Standards Institute) (27).

The inocula from *E. faecalis* (ATCC 29212) culture were prepared in 0.85% saline solution and adjusted at the 0.5 McFarland standard. The inocula were 10-fold diluted until to  $10^{-5}$  and each dilution was cultured, in duplicate, in Plate Count Agar at 37°C for 24h to determine the bacterial concentration in colony-forming units (CFU) mL<sup>-1</sup>.

Table 1. Groups and the drug concentrations statistically analyzed:

Drug	CH/O Concentration (mg mL <sup>-1</sup> )	Group
calcium hydroxide (CH)*	32	CH32
	16	CH16
	8	CH8
calcium hydroxide* + omeprazole** (CHO)	32/0.512	CH32O
	16/0.512	CH16O
	8/0.512	CH8O
calcium hydroxide* + acidified omeprazole** (CHAO)	32/0.512	CH32AO
	16/0.512	CH16AO
	8/0.512	CH8AO
Omeprazole** (O)	0.512	O
Acidified Omeprazole (AO)**	0.512	AO

\*Odontosul, Porto Alegre, Brazil

\*\*Cardila Healphcare TVT Ltda., Ahmedabad, Índia

In CHAO and AO groups, O was dissolved in 1mL of 2.85% acetic acid (Nuclear, Diadema, Brazil), 10 min before use, to assure acid-catalysation. A pilot study confirmed that there was no effect of the acetic acid on *E. faecalis* with the concentration used in this experiment.

To determine the maximum concentrations to be tested, were taken as reference previous studies, *in vitro*, which evaluated the MIC to CH (25) and for the O (24) against *E. faecalis*.

A standard solution of each drug was prepared by diluting the drugs in distilled water. The standard solutions were prepared to reach a concentration 10 times higher than the maximum concentration of each drug to be tested (Table 1). The experiment itself consisted of removing a certain aliquot (X) from the standard solution, in accordance with the desired concentration to be tested, and repeatedly inoculating them into tubes containing Y mL of sterile medium and 0.05mL of the inocula, up to  $X + Y = 10$  mL. The drug aliquot was reduced by 50% every time, until it reached zero (bacterial growth control), and the aliquot of medium was raised accordingly, up to 10 mL of the final volume.

The possible contamination of the drugs was evaluated by incubation of these with culture medium without inoculum under the same experimental conditions. In CHO and CHAO groups, the concentration of O was remained constant ( $0.512 \text{ mg mL}^{-1}$ ) and only the CH concentration varied.

The tubes were mixed by vortexing for 30s and then incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 hours.

The survival of the bacteria was assessed by 10-fold serial dilutions on agar plates. After incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  for 48h, colonies on the plates were counted and  $\text{CFU mL}^{-1}$  was determined. All experiments were made in triplicate.

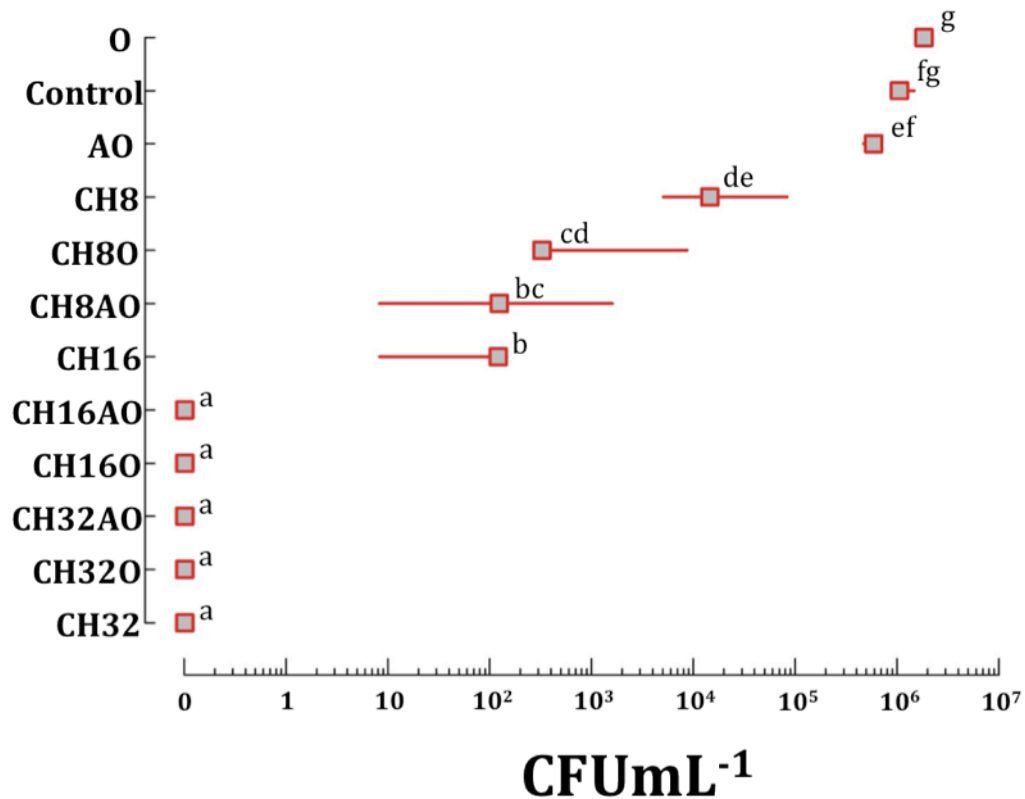
The MICs to drugs were determined and consisted of the lowest concentration of the drug at which bacterial growth could not be observed.

Data were statistically analyzed, with a level of significance of 5%. MIC required killing the microorganism were compared among the different groups . These data were then submitted to statistical analyses using the ANOVA test with Tukey post-hoc.

## Results

The *E. faecalis* growth was not inhibited by O and AO in any tested concentration, similar to what has been observed in bacterial growth control ( $P = .319$ ), although the AO group had better results comparing with the O group ( $P = .001$ ).

MIC to CH was  $32 \text{ mg mL}^{-1}$ , while to CHO and CHAO it was  $16 \text{ mg mL}^{-1}$ . When CH, CHO and CHAO were tested at 16, 8 and 8  $\text{mg mL}^{-1}$ , respectively, it was observed a reduction of the number of CFUs (Figure 1).

Fig. 1: CFUs of *E. faecalis* after exposure to drug at various concentrations

Different letters mean that  $P < .05$

## Discussion

The *E. faecalis* is one of the predominant species in cases of lesions refractory to treatment (1-8,10), since it has important characteristics that make it resistant to the therapeutic procedures (3,9,30). Therefore, much of the current endodontic research seeks more efficient ways to combat this microorganism. The use of intracanal medication has been an alternative in an attempt to eliminate the maximum amount of the remaining bacteria after canal preparation.

The agar diffusion test is used extensively to assess the antimicrobial effect of these medications, despite its well-known limitations. Its results are influenced by the solubility and diffusibility of the material in the culture medium, not expressing their real antimicrobial effect (31). Also, this test cannot distinguish the microbiostatic and microbicidal properties of the material (32). On the other hand, the direct contact test does not have these disadvantages and it can be

used to assess the antimicrobial effect of materials, providing quantitative and reproducible results (33,34,35).

The determination of the MIC to a drug is used by diagnostic laboratories to confirm which is the minimum concentration able to inhibit the bacterial growth, and often as a tool to determine the *in vitro* activity of new antimicrobials (25). This study was conducted to determine the MIC to CH, to O, and to the association of these substances, and to check whether the prior acidification of the O would have some influence in this context.

Considering that the O is a prodrug that requires acid induction, in this experiment we chose to add such variable, by acidifying it previously in some groups, as performed by Andersen et al. (23) and Jonkers et al. (24). This investigation showed that the CH concentrations below 16 mg mL<sup>-1</sup> associated with the previously acidified O demonstrated better results than when combined with the non-acidified O. This may be clinically relevant, requiring further investigations.

As the effects of the CH are closely related to its high pH, the addition of an acidic substance in this medication could have reduced its effectiveness. However, this effect was not observed because the results obtained showed no difference between CHO and CHAO when were used the concentrations of 32 and 16 mg mL<sup>-1</sup>. Although O and AO have not shown significant difference compared to control, even at the highest concentration, it was found that the AO was able to reduce further the number of CFUs in comparison with the O. This findings supports the assertion that the O has its action enhanced when previously dissolved in an acid substance.

The acidified ethanol used by Andersen et al. (23) and Jonkers et al. (24) to promote de catalization of the O presented antimicrobial effect on *E. faecalis*, in a preliminary study. Therefore, it was not used in this investigation. The apple cider vinegar has already been proposed as an irrigating solution in endodontics by Estrela et al. (28), and the acetic acid is one of its main components (29); that is why it was considered as a possible choice to acidify the O. Thus the O was previously acidified with that substance, which in the concentration used in the experiment did not cause inhibition of the *E. faecalis* growth.

The MIC to CH for the *E. faecalis* was 32 mg mL<sup>-1</sup>, in contrast with another experiment, that used a similar methodology, in which it was 16 mg mL<sup>-1</sup> (25). In

our case, the drugs were diluted in distilled water and in their experiment it was used glycerin, this may have altered the results. Our results showed that CH has antimicrobial activity on this bacterium, which is enhanced when combined with O. The findings of this research have shown that the O was not able to eliminate the *E. faecalis*, but when used in combination with the CH it was able to reduce its MIC in 50%. This fact may be related to the direct effect of the O on the proton pump present in the cytoplasmic membrane of *E. faecalis* (18), that would promote an increase in their internal pH, favoring the action of the CH. Thus, the CH and O could act synergistically, increasing its potential as an intracanal medication.

The results achieved in this study were obtained through *in vitro* analysis and cannot be directly related to the clinic, but they can be promising. By combining different antimicrobial substances we can act on independent resistance mechanisms of the microorganisms.

This study indicates that the association of CH with the proton pump O inhibitor potentialized the effects of the CH. Additional researches are still necessary to verify that these results will also occur in the complex root canal system.

## References

1. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol.* 1992; 7: 257-262.
2. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31:1-7.
3. 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* 1998; 8:86-92.
4. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a lithuanian population. *J Endod* 2000; 26:593-5.
5. Pinheiro ET, Gomes BPPA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003; 36:1-11.
6. Roças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; 30: 315-320.

7. 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; 97:85-94.
8. Subramanian K, Mickel A K. Molecular Analyses of Persistent Periradicular Lesions and Root Ends Reveals a Diverse Microbial Profile. *J Endod* 2009; 35:950-7.
9. Souza-Filho FJ, Soares AJ, Vianna ME, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPFA. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J* 2008; 19: 28-33.
10. Figdor D, Davies JK, Sundvist G. Starvation survival, growth, and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microb Immunol* 2003; 18:234-9.
11. Abdullah M, Ng Y-L, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod.* 2005; 31:30-6.
12. Haapasalo M, Orstavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987; 66:1375-9.
13. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6:142-9.
14. Orstavik, D.; Kerekes, K.; Molven O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study. *Int Endod J* 1991; 24:1-7.
15. Dalén G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microb Immunol* 2000; 15:309-12.
16. Siqueira JF Jr., Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999; 32:361-9.
17. Padan E, Zilberstein D, Schuldiner S. pH homeostasis in bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1981; 650:151-66.
18. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002; 35:221-8.
19. Siqueira JF Jr., Uzeda M. Desinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligated and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod* 1996; 22:674-6.
20. Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Vladighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide



against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. Int Endod J 2003; 36:267-75.

21. Sirén EK, Haapasalo MPP, Waltimo TMT, Orstavik D. *In vitro* antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. Eur J Oral Sci 2004; 112:326-331.

22. Loo VG, Fallone CA, De Souza E, Lavallée J, Barkun AL. In-vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to ampicillin, clarithromycin, metronidazole and omeprazole. J Antimicrob Chemother 1997; 40:881-3.

23. Andersen LP, Colding H, Kristiansen J. Potentiation of the action of metronidazole on *Helicobacter pylori* by omeprazole and bismuth subcitrate. Int J Antimicrob Agents 2000; 14: 231-4.

24. Jonkers D., Stobberingh E., Stockbrügger R. Omeprazole inhibits growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria including *Helicobacter pylori in vitro*. Journal Antimicrob Chemother 1996; 37:145-150.

25. Pallota RC., Ribeiro MS., Machado MEL. Determination of the minimum inhibitory concentration of four medicaments used as intracanal medication. Aust Endod J 2007; 33:107-111.

26. Wagner C., Barth VC., Oliveira SD., Campos MM. Effectiveness of the proton pump inhibitor omeprazole associated with calcium hydroxide as intracanal medication: an in vivo study. J Endod 2011; 37(9):1253-7.

27. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2003). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically-Sixth Edition: Approved Standard M7-A6. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

28. Estrela C, Holland R, Bernabe PFE, Souza V, Estrela CRA. Antimicrobial potencial of medicaments used in healing process in dog's teeth with apical periodontitis. Braz Dent J 2004; 15:181-5.

29. Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod 2006; 32:389-98.

30. Portenier I, Waltimo T, Orstavik D ET AL. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis*. J Endod 2005; 31:380-6.

31. Estrela C, Bammann LL, Estrela CRA, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and Chemical Study of MTA, Portland Cement, Calcium Hydroxide Paste, Sealapex and Dycal. Braz Dent J 2000, 11(1): 3-9.

32. Tobias RS (1988) Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. International Endodontic Journal 21, 155-60.

33. Gomes BPFA, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza Filho FJ. *In*

*vitro* evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006, 102: 544-50.

34. Morgental RD, Vier-Pelisser FV, Oliveira SD, Antunes FC, Cogo DM, Kopper PMP. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. Int Endod J 2011, 44:1128-1133.

35. Silveira CFM, Cunha RS, Fontana CE, Martin AS, Gomes BPFA, Motta RHL, Bueno CES. Assessment of the Antibacterial Activity of Calcium Hydroxide Combined with Chlorhexidine Paste and Other Intracanal Medications against Bacterial Pathogens. Eur J Dent 2011, 5:1-7.

### 3. DISCUSSÃO

O retratamento endodôntico é ainda um dos procedimentos com maior dificuldade técnica e menor índice de sucesso (8). Isto porque o profissional está, muitas vezes, lidando com uma microbiota diferente daquela encontrada nos casos de lesão primária (8,9,10).

O *E. faecalis* é uma das espécies predominantes nos casos de lesões refratárias ao tratamento (4,8,9,10,18,19,20,21). 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 (6,7), tornando-se ainda mais resistentes. (7,26). O uso da medicação intracanal, após o preparo biomecânico, tem sido uma alternativa na tentativa de se eliminar o máximo de bactérias remanescentes possível.

A determinação da CIM é utilizada por laboratórios de diagnóstico para confirmar resistência microbiana, mas mais frequentemente como uma ferramenta para determinar a atividade *in vitro* de novos antimicrobianos (45). Este estudo foi conduzido para determinar a CIM do HC, do O, bem como da associação dessas substâncias, além de verificar se a acidificação prévia do O teria alguma influência neste contexto.

O *E. faecalis*, avaliado neste estudo, é um dos microrganismos mais comuns nos casos de lesões refratárias ao tratamento (4,8,9,10,18,19,20,21,25) e apresenta características importantes que lhe tornam resistente aos procedimentos terapêuticos (8,11,51).

Considerando que o O é uma pró-droga que necessita de indução ácida para sua ativação, neste experimento optou-se por acrescentar tal variável, acidificando-o previamente em alguns grupos, como realizado por Andersen *et al.* (44) e Jonkers *et al.* (45).

Os resultados demonstraram não haver diferença entre os grupos HCO e HCOA quando utilizadas as concentrações de 32 e 16mg/mL. Como os efeitos do HC estão intimamente relacionados ao seu elevado pH, a adição de uma substância ácida à esta medicação poderia ter reduzido sua eficácia. Porém, este efeito não foi observado.

E apesar dos grupos O e OA não terem apresentado efeito sobre o *E. faecalis* quando comparados ao controle, mesmo na maior concentração testada (0,512mg/mL), o grupo OA reduziu uma maior quantidade de UFCs que o O, o que está de acordo com a idéia de que o O necessita ser dissolvido previamente em alguma substância ácida que assegure a sua ativação.

Em um estudo piloto, realizado previamente ao experimento, o etanol acidificado apresentou efeito antimicrobiano sobre o *E. faecalis*. Devido a isso não foi empregado para acidificar o O. O vinagre de maçã, proposto como solução irrigadora por Estrela *et al.* (49), possui o ácido acético como um dos seus principais componentes, sendo que sua concentração varia de 2,85 a 7,09% (51). Por esta razão o O foi previamente acidificado com essa substância, a qual em piloto realizado previamente ao estudo não apresentou efeito sobre o *E. faecalis* e cujo pH correspondia a 2,75 (pHmetro Marte).

A escolha da metodologia foi baseada no fato de que apesar do teste de difusão em ágar ser amplamente utilizado para avaliar o efeito antimicrobiano de materiais endodônticos, ele possui conhecidas limitações. Os seus resultados podem ser influenciados pela solubilidade e difusibilidade do material no meio de cultura, não expressando o seu real efeito antimicrobiano (52). Além disso, este tipo de ensaio não pode distinguir as propriedades microbiostáticas e microbicidas do material (53) Por outro lado, o teste de contato direto não possui estas desvantagens e podem ser usado para avaliar o efeito antimicrobiano de materiais, proporcionando resultados quantitativos e reproduzíveis (17,54,55,56,57).

A CIM do HC para o *E. faecalis* foi de 32mg/mL, em contraste com outro experimento no qual foi de 16mg/mL (47), evidenciando sua atividade antimicrobiana sobre esta bactéria, sendo esta potencializada quando associado ao O. Os resultados da presente investigação demonstraram que o O não foi capaz de eliminar o *E. faecalis*; porém, quando utilizado em associação com o HC, foi capaz de reduzir a CIM deste em 50%.

Este estudo evidenciou que o HC apresenta atividade antimicrobiana sobre o *E. faecalis*, sendo que esta foi potencializada quando associado ao O.

Uma grande parte das propriedades de cicatrização do HC pode ser atribuída aos seus efeitos bactericidas. Os álcalis, em geral, têm um efeito destrutivo pronunciado na membrana celular e estruturas protéicas (11,30).

O O tem ação na bomba de prótons que inibe a secreção do ácido gástrico. O *E. faecalis* também possui uma bomba de prótons e o O poderá ter um efeito direto nesta bomba de prótons (39).

Por isso observamos que tanto o HC quanto o O agem sobre a parede celular bacteriana, assim a associação dessas medicações podem ter efeitos sinérgicos, ou seja, parece haver um potencialização dos efeitos do HC quando associado ao O.

E finalmente, quando a associação do HC e do O utilizou concentrações de HC menores que 16mg/mL, observou-se uma vantagem para os grupos onde o O foi acidificado previamente, o que poderia ser relevante na clínica.

Os resultados alcançados neste estudo ocorreram *in vitro* e não podem ser diretamente relacionados com a clínica, porém são promissores. Ao combinar diferentes substâncias antimicrobianas, pode-se agir em mecanismos de resistência dos microrganismos.

Este estudo indica que a associação do HC com o inibidor da bomba de prótons O potencializou os efeitos do HC. Pesquisas adicionais ainda são necessárias para verificar se esses resultados ocorrerão também no complexo sistema de canais radiculares, onde o contato direto da medicação com a microbiota nem sempre é possível. E, preferencialmente, testar a eficácia das medicações em um comunidade microbiana mista, tal como ocorre clinicamente nos canais radiculares.

Além disso, é preciso verificar a possibilidade de manipulação de pastas com essas concentrações das medicações, já que a pasta de hidróxido de cálcio normalmente utilizada como medicação intracanal deverá ter uma adequada consistência que possibilite sua introdução e permanência no sistema de canais radiculares.

#### 4. REFERÊNCIAS

1. Kakehashi S., Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg. Oral Med Oral Pathol* 1965, 20(3):340-9.
2. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(11): 5721-31.
3. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Umea (Suécia): University of Umea; 1976.
4. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992; 18(9):427-30.
5. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol.* 1992; 7(5): 257-262.
6. 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.
7. 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.
8. 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* 1998; 8(1):86-92.
9. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003; 36(1):1-11.
10. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31(1):1-7.
11. Souza-Filho FJ, Soares AJ, Vianna ME, Zaia AA, Ferraz CCR, Gomes BPFA. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J* 2008; 19(1): 28-33.
12. 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.
13. Siqueira JF, Rôças I. Clinical Implications and Microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008, 34(11):1291-1301.e3.

14. Subramanian K, Mickel A K. Molecular Analyses of Persistent Periradicular Lesions and Root Ends Reveals a Diverse Microbial Profile. *J Endod* 2009; 35(7):950-957.
15. Siqueira JF, Alves FRF, Rôças IN. Pyrosequencing Analysis of the Apical Root Canal Microbiota. *J Endod* 2011, 37(11):1499-1503.
16. Zoletti GO, Siqueira JF, Santos KRN. Identification of *Enterococcus faecalis* in Root-filled Teeth With or Without Periradicular Lesions by Culture-dependent and-Independent Approaches. *J Endod* 2006, 32(8):722-6.
17. Gomes BPFA, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza Filho FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006, 102: 544-50.
18. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a lithuanian population. *J Endod* 2000; 26(10):593-5.
19. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; 30(5): 315-320.
20. 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.
21. Gomes BFA, Pinheiro ET, Souza ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJAL. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102:247-53.
22. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6(4):142-9.
23. Siqueira JF Jr., Uzeda M. Desinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligated and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod* 1996; 22(12):674-6.
24. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002; 28(10):689-93.
25. Figdor D, Davies JK, Sundvist G. Starvation survival, growth, and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microb Immunol* 2003; 18(4):234-9.
26. 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):30-36.

27. Estrela, C.; Figueiredo, JAP. Medicação Intracanal. In: Estrela, C.; Figueiredo, JAP. Endodontia: princípios biológicos e mecânicos. São Paulo: Artes Médicas; 2001.p. 571-653.
28. Subramaniam P, Konde S, Prashanth P. An in vitro evaluation of pH variations in calcium hydroxide liners. J Indian Soc Pedod Prev Dent 2006; 24(3): 144-145.
29. Siqueira JF Jr., Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. Int Endod J 1999; 32(5):361-9.
30. Teixeira FB, Levin LG, Trope MT. Investigation of pH at different dentinal sites after placement of calcium hydroxide dressing by two methods. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005; 99:511-6.
31. Chai WL, Hamimah H, Cheng SC, Sallam AA, Abdullah M. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. J Oral Sci 2007; 49(2): 161-6.
32. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. Endod Dent Traumatol 1985; 1(5): 170-5.
33. Kayaoglu G, Erten H, Bodrumlu E, Orstavik D. The resistance of collagen-associated, planktonic cells of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. J Endod 2009; 35(1):46-8.
34. Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TMT, Orstavik D, Haapasalo MPP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. Int Endod J 2000; 33(2):126-131.
35. Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH changes in root dentine over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. J Endod 1993; 19(6):302-6.
36. Haapasalo M, Orstavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res 1987; 66(8):1375-9.
37. Orstavik, D.; Kerekes, K.; Molven O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study. Int Endod J 1991; 24(1):1-7.
38. Dalén G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. Oral Microb Immunol 2000; 15(5):309-12.
39. 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.



40. Padan E, Zilberstein D, Schuldiner S. pH homeostasis in bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1981; 650: 151-66.
41. Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Vladrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. *Int Endod J* 2003; 36(4):267-75.
42. Sirén EK, Haapasalo MPP, Waltimo TMT, Orstavik 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):326-331.
43. Israel DM, Hassall E. Omeprazole and other proton pump inhibitors: pharmacology, efficacy, and safety, with special reference to use in children. *J Pediatric Gastroenterol & Nutr* 1998; 27(5):568-79.
44. Andersen LP, Colding H, Kristiansen J. Potentiation of the action of metronidazole on *Helicobacter pylori* by omeprazole and bismuth subcitrate. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14(3): 231-4.
45. Jonkers D., Stobberingh E., Stockbrügger R. Omeprazole inhibits growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria including *Helicobacter pylori in vitro*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1996, 37:145-150.
46. Loo VG, Fallone CA, De Souza E, Lavallée J, Barkun AL. In-vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to ampicillin, clarithromycin, metronidazole and omeprazole. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 881-3.
47. Pallota RC, Ribeiro MS, Machado MEL. Determination of the minimum inhibitory concentration of four medicaments used as intracanal medication. *Aust Endod J* 2007, 33:107-111.
48. Wagner C., Barth VC., Oliveira SD., Campos MM. Effectiveness of the proton pump inhibitor meprazole associated with calcium hydroxide as intracanal medication: an in vivo study. *J Endod* 2011; 37(9):1253-7.
49. Estrela C, Holland R, Bernabe PFE, Souza V, Estrela CRA. Antimicrobial potencial of medicaments used in healing process in dog's teeth with apical periodontitis. *Braz Dent J* 2004; 15:181-5.
50. Portenier I, Waltimo T, Orstavik D. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005; 31(5):380-6.
51. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006; 32:389-98.
52. Estrela C, Bammann LL, Estrela CRA, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and Chemical Study of MTA, Portland Cement, Calcium Hydroxide Paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J* 2000, 11(1): 3-9.
53. Tobias RS (1988) Antibacterial properties of dental restorative materials: a

review. International Endodontic Journal 21, 155–60.

54. Morgental RD, Vier-Pelisser FV, Oliveira SD, Antumes FC, Cogo DM, Kopper PMP. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. Int Endod J 2011, 44:1128-1133.

55. Silveira CFM, Cunha RS, Fontana CE, Martin AS, Gomes BPFA, Motta RHL, Bueno CES. Assessment of the Antibacterial Activity of Calcium Hydroxide Combined with Chlorhexidine Paste and Other Intracanal Medications against Bacterial Pathogens. Eur J dent 2011, 5:1-7.).

56. Ferguson JW, Hatton JF, Jane Gillespie M. Effectiveness of Intracanal Irrigants and Medications against the Yeast *Candida albicans*. J Endod 2002, 28(2): 68-71.

57. Vianna ME, Gomes BPFA, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza Filho FJ. *In vitro* Evaluation of the Susceptibility of Endodontic Pathogens to Calcium Hydroxide Combined with Different Vehicles. Braz Dent J 2005, 16(3): 175-180.

## ANEXOS

## ANEXO A. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



*Comissão Científica e de Ética  
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

---

Porto Alegre 19 de Abril de 2011

**O Projeto de: Dissertação**

**Protocolado sob n°:** 0004/11  
**Intitulado:** Avaliação, in vitro, do hidróxido de cálcio e inibidores da bomba de prótons em canais radiculares bovinos contaminados com *Enterococcus faecalis*  
**Pesquisador Responsável:** Profa. Dra. Fabiana Vieira Vier Pelisser  
**Pesquisadores Associados** Deborah Meirelles Cogo; Patrícia Maria Poli Kopper  
**Nível:** Dissertação / Mestrado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 19 de Abril de 2011.

*Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA*

**Profa. Dra. Ana Maria Spohr**  
Presidente da Comissão Científica e de Ética da  
Faculdade de Odontologia da PUCRS

## ANEXO B. BANCO DE DADOS

Amostra	Grupo	Conc	Média UFC/mL	Conc inóculo UFC/mL
1	Omeprazol	512µg/mL	1,425 X10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
2	Omeprazol	512µg/mL	1,2 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
3	Omeprazol	512µg/mL	1,25 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
4	Omeprazol	256µg/mL	1,775 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
5	Omeprazol	256µg/mL	1,525 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
6	Omeprazol	256µg/mL	2,025 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
7	Omeprazol	128µg/mL	4,25 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
1	Omeprazol	128µg/mL	1,975 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
2	Omeprazol	128µg/mL	3,75 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
3	Omeprazol	64µg/mL	2,35 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
4	Omeprazol	64µg/mL	1,5 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
5	Omeprazol	64µg/mL	2,025 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
6	Omeprazol	32µg/mL	1,475 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
7	Omeprazol	32µg/mL	2,1 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
8	Omeprazol	32µg/mL	1,875 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
9	Omeprazol	16µg/mL	1,875 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
10	Omeprazol	16µg/mL	1,875 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
11	Omeprazol	16µg/mL	1,325 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
12	Omeprazol	8µg/mL	1,1 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
13	Omeprazol	8µg/mL	1,025 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
14	Omeprazol	8µg/mL	9,25 X 10 <sup>7</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
15	Omeprazol	4µg/mL	1,275 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
16	Omeprazol	4µg/mL	1,525 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
17	Omeprazol	4µg/mL	1,6 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
18	Omeprazol	2µg/mL	1,175 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
19	Omeprazol	2µg/mL	1,4 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
20	Omeprazol	2µg/mL	1,35 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
21	Omeprazol	1µg/mL	1,125 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
22	Omeprazol	1µg/mL	1,075 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
23	Omeprazol	1µg/mL	1 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
24	Omeprazol	0µg/mL	9,5 X 10 <sup>7</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
25	Omeprazol	0µg/mL	6,25 X 10 <sup>7</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
26	Omeprazol	0µg/mL	5,50 X 10 <sup>7</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
27	Omeprazol Acidificado	512µg/mL	3 X10 <sup>7</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
28	Omeprazol Acidificado	512µg/mL	2,25 X 10 <sup>7</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
29	Omeprazol Acidificado	512µg/mL	3,75 X 10 <sup>7</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>
30	Omeprazol Acidificado	256µg/mL	2,1 X 10 <sup>8</sup>	6,9X10 <sup>7</sup>

31	Omeprazol Acidificado	256µg/mL	$2,3 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
32	Omeprazol Acidificado	256µg/mL	$2,075 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
33	Omeprazol Acidificado	128µg/mL	$2,5 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
34	Omeprazol Acidificado	128µg/mL	$1,575 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
35	Omeprazol Acidificado	128µg/mL	$1,825 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
36	Omeprazol Acidificado	64µg/mL	$1,825 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
37	Omeprazol Acidificado	64µg/mL	$1,625 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
38	Omeprazol Acidificado	64µg/mL	$1,55 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
39	Omeprazol Acidificado	32µg/mL	$2,1 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
40	Omeprazol Acidificado	32µg/mL	$1,925 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
41	Omeprazol Acidificado	32µg/mL	$1,575 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
42	Omeprazol Acidificado	16µg/mL	$1,925 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
43	Omeprazol Acidificado	16µg/mL	$1,6 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
44	Omeprazol Acidificado	16µg/mL	$2,175 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
45	Omeprazol Acidificado	8µg/mL	$1 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
46	Omeprazol Acidificado	8µg/mL	$5,75 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$
47	Omeprazol Acidificado	8µg/mL	$1,025 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
48	Omeprazol Acidificado	4µg/mL	$6,75 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$
49	Omeprazol Acidificado	4µg/mL	$9,5 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$
50	Omeprazol Acidificado	4µg/mL	$8,5 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$
51	Omeprazol Acidificado	2µg/mL	$1,45 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
52	Omeprazol Acidificado	2µg/mL	$1,55 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
53	Omeprazol Acidificado	2µg/mL	$1,775 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
54	Omeprazol Acidificado	1µg/mL	$1,275 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
55	Omeprazol Acidificado	1µg/mL	$2,75 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$
56	Omeprazol Acidificado	1µg/mL	$7,75 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$
57	Omeprazol Acidificado	0µg/mL	$9,25 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$
58	Omeprazol Acidificado	0µg/mL	$5,5 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$
59	Omeprazol Acidificado	0µg/mL	$6 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$
60	Hidróxido de Cálcio	32mg/mL	0	$6,9 \times 10^7$
61	Hidróxido de Cálcio	32mg/mL	0	$6,9 \times 10^7$
62	Hidróxido de Cálcio	32mg/mL	0	$6,9 \times 10^7$
63	Hidróxido de Cálcio	16mg/mL	$9,25 \times 10^2$	$6,9 \times 10^7$
64	Hidróxido de Cálcio	16mg/mL	$7,25 \times 10^2$	$6,9 \times 10^7$
65	Hidróxido de Cálcio	16mg/mL	$<5,0 \times 10^1$	$6,9 \times 10^7$
66	Hidróxido de Cálcio	8mg/mL	$2,9 \times 10^5$	$6,9 \times 10^7$
67	Hidróxido de Cálcio	8mg/mL	$7,75 \times 10^4$	$6,9 \times 10^7$
68	Hidróxido de Cálcio	8mg/mL	$>2,5 \times 10^6$	$6,9 \times 10^7$
69	Hidróxido de Cálcio	4mg/mL	$1,425 \times 10^6$	$6,9 \times 10^7$
70	Hidróxido de Cálcio	4mg/mL	$1,1 \times 10^6$	$6,9 \times 10^7$
71	Hidróxido de Cálcio	4mg/mL	$7,75 \times 10^6$	$6,9 \times 10^7$
72	Hidróxido de Cálcio	2mg/mL	$1,075 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$

73	Hidróxido de Cálcio	2mg/mL	$6,75 \times 10^6$	$6,9 \times 10^7$
74	Hidróxido de Cálcio	2mg/mL	$9,25 \times 10^6$	$6,9 \times 10^7$
75	Hidróxido de Cálcio	1mg/mL	$2,625 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$
76	Hidróxido de Cálcio	1mg/mL	$2,5 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$
77	Hidróxido de Cálcio	1mg/mL	$1,9 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$
78	Hidróxido de Cálcio	0mg/mL	$3,25 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$
79	Hidróxido de Cálcio	0mg/mL	$5,75 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$
80	Hidróxido de Cálcio	0mg/mL	$8 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$
81	Ácido Acético	29,89mg/mL	$1,4 \times 10^8$	$1,11 \times 10^8$
82	Ácido Acético	29,89mg/mL	$7,00 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
83	Ácido Acético	29,89mg/mL	$1,15 \times 10^8$	$1,11 \times 10^8$
84	Ácido Acético	14,95mg/mL	$4,75 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
85	Ácido Acético	14,95mg/mL	$1,00 \times 10^8$	$1,11 \times 10^8$
86	Ácido Acético	14,95mg/mL	$1,100 \times 10^8$	$1,11 \times 10^8$
87	Ácido Acético	7,47mg/mL	$1,525 \times 10^8$	$1,11 \times 10^8$
88	Ácido Acético	7,47mg/mL	$1,200 \times 10^8$	$1,11 \times 10^8$
89	Ácido Acético	7,47mg/mL	$1,45 \times 10^8$	$1,11 \times 10^8$
90	Ácido Acético	3,74mg/mL	$6,5 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
91	Ácido Acético	3,74mg/mL	$8,75 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
91	Ácido Acético	3,74mg/mL	$7,75 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
93	Ácido Acético	1,86mg/mL	$1,000 \times 10^8$	$1,11 \times 10^8$
94	Ácido Acético	1,86mg/mL	$7,25 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
95	Ácido Acético	1,86mg/mL	$6,75 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
96	Ácido Acético	0,93mg/mL	$6,75 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
97	Ácido Acético	0,93mg/mL	$7,50 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
98	Ácido Acético	0,93mg/mL	$8,25 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
99	Ácido Acético	0,47mg/mL	$8,25 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
100	Ácido Acético	0,47mg/mL	$9,75 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
101	Ácido Acético	0,47mg/mL	$9,5 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
102	Ácido Acético	0,23mg/mL	$7,5 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
103	Ácido Acético	0,23mg/mL	$8,0 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
104	Ácido Acético	0,23mg/mL	$1,275 \times 10^8$	$1,11 \times 10^8$
105	Ácido Acético	0,12mg/mL	$8 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
106	Ácido Acético	0,12mg/mL	$1,175 \times 10^8$	$1,11 \times 10^8$
107	Ácido Acético	0,12mg/mL	$6,5 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
108	Ácido Acético	0,06mg/mL	$3,25 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
109	Ácido Acético	0,06mg/mL	$7,75 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
110	Ácido Acético	0,06mg/mL	$5,25 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
111	Ácido Acético	0,03mg/mL	$9,00 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
112	Ácido Acético	0,03mg/mL	$6,00 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
113	Ácido Acético	0,03mg/mL	$7,50 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
114	HC + Omeprazol	32mg/mL+512µg/mL	0	$6,5 \times 10^7$

115	HC + Omeprazol	32mg/mL+512µg/mL	0	6,5 x10 <sup>7</sup>
116	HC + Omeprazol	32mg/mL+512µg/mL	0	6,5 x10 <sup>7</sup>
117	HC + Omeprazol	16mg/mL+512µg/mL	0	6,5 x10 <sup>7</sup>
118	HC + Omeprazol	16mg/mL+512µg/mL	0	6,5 x10 <sup>7</sup>
119	HC + Omeprazol	16mg/mL+512µg/mL	0	6,5 x10 <sup>7</sup>
120	HC + Omeprazol	8mg/mL+512µg/mL	2 x 10 <sup>3</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
121	HC + Omeprazol	8mg/mL+512µg/mL	2,5 x 10 <sup>3</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
122	HC + Omeprazol	8mg/mL+512µg/mL	1,525 x 10 <sup>5</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
123	HC + Omeprazol	4mg/mL+512µg/mL	1,55 x 10 <sup>7</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
124	HC + Omeprazol	4mg/mL+512µg/mL	1,225 x 10 <sup>7</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
125	HC + Omeprazol	4mg/mL+512µg/mL	3 x 10 <sup>7</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
126	HC + Omeprazol	2mg/mL+512µg/mL	3,25 x 10 <sup>8</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
127	HC + Omeprazol	2mg/mL+512µg/mL	2,875 x 10 <sup>8</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
128	HC + Omeprazol	2mg/mL+512µg/mL	2,65 x 10 <sup>8</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
129	HC + Omeprazol	1mg/mL+512µg/mL	1,3 x 10 <sup>8</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
130	HC + Omeprazol	1mg/mL+512µg/mL	8,25 x 10 <sup>7</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
131	HC + Omeprazol	1mg/mL+512µg/mL	3,3 x 10 <sup>8</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
132	HC + Omeprazol	0mg/mL+512µg/mL	1 x 10 <sup>8</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
133	HC + Omeprazol	0mg/mL+512µg/mL	9,75 x 10 <sup>7</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
134	HC + Omeprazol	0mg/mL+512µg/mL	7 x 10 <sup>7</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
135	Acidificado HC + Omeprazol	32mg/mL+512µg/mL	0	6,5 x10 <sup>7</sup>
136	Acidificado HC + Omeprazol	32mg/mL+512µg/mL	0	6,5 x10 <sup>7</sup>
137	Acidificado HC + Omeprazol	32mg/mL+512µg/mL	0	6,5 x10 <sup>7</sup>
138	Acidificado HC + Omeprazol	16mg/mL+512µg/mL	0	6,5 x10 <sup>7</sup>
139	Acidificado HC + Omeprazol	16mg/mL+512µg/mL	0	6,5 x10 <sup>7</sup>
140	Acidificado HC + Omeprazol	16mg/mL+512µg/mL	0	6,5 x10 <sup>7</sup>
141	Acidificado HC + Omeprazol	8mg/mL+512µg/mL	1,85 x 10 <sup>4</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
142	Acidificado HC + Omeprazol	8mg/mL+512µg/mL	<5,0X10 <sup>1</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
143	Acidificado HC + Omeprazol	8mg/mL+512µg/mL	7,5 x 10 <sup>2</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
144	Acidificado HC + Omeprazol	4mg/mL+512µg/mL	2,325 x 10 <sup>7</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
145	Acidificado HC + Omeprazol	4mg/mL+512µg/mL	1,025 x 10 <sup>8</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
146	Acidificado HC + Omeprazol	4mg/mL+512µg/mL	3,225 x 10 <sup>8</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>
147	Acidificado	2mg/mL+512µg/mL	2,4 x 10 <sup>8</sup>	6,5 x10 <sup>7</sup>

148	HC + Omeprazol Acidificado	2mg/mL+512µg/mL	$1,675 \times 10^8$	$6,5 \times 10^7$
149	HC + Omeprazol Acidificado	2mg/mL+512µg/mL	$2 \times 10^8$	$6,5 \times 10^7$
150	HC + Omeprazol Acidificado	1mg/mL+512µg/mL	$>2,5 \times 10^9$	$6,5 \times 10^7$
151	HC + Omeprazol Acidificado	1mg/mL+512µg/mL	$1,65 \times 10^8$	$6,5 \times 10^7$
152	HC + Omeprazol Acidificado	1mg/mL+512µg/mL	$1,975 \times 10^8$	$6,5 \times 10^7$
153	HC + Omeprazol Acidificado	0mg/mL+512µg/mL	$1,025 \times 10^8$	$6,5 \times 10^7$
154	HC + Omeprazol Acidificado	0mg/mL+512µg/mL	$6 \times 10^7$	$6,5 \times 10^7$
155	HC + Omeprazol Acidificado	0mg/mL+512µg/mL	$5,75 \times 10^7$	$6,5 \times 10^7$



## ANEXO C. DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO

**Solução padrão  
10X mais  
concentrada do  
que a maior  
concentração de  
medicação a ser  
utilizada.**

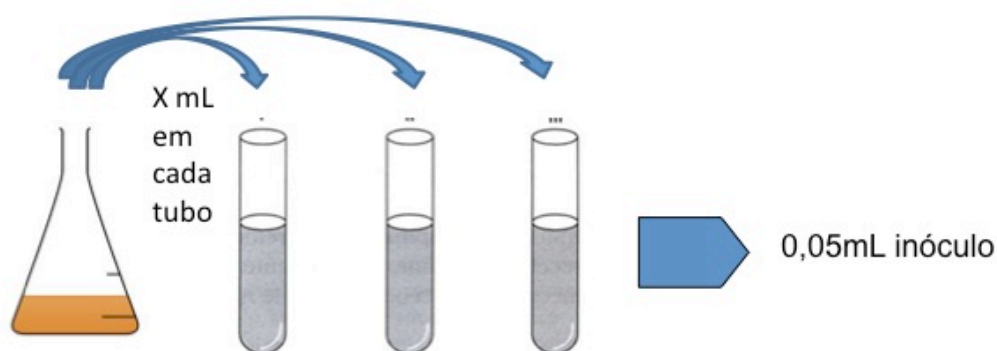


CH=320mg/mL  
CHO<sup>1</sup>=320mg/mL+5,12mg/mL  
CHOA<sup>1,2</sup>=320mg/mL+5,12mg/mL  
O=5,12mg/mL  
AO<sup>2</sup>=5,12mg/mL

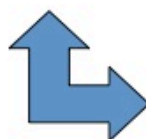
↓  
Água destilada esterilizada

<sup>1</sup> quantidade de O manteve-se constante

<sup>2</sup> 1 mL ácido acético 2,85% - 10 min



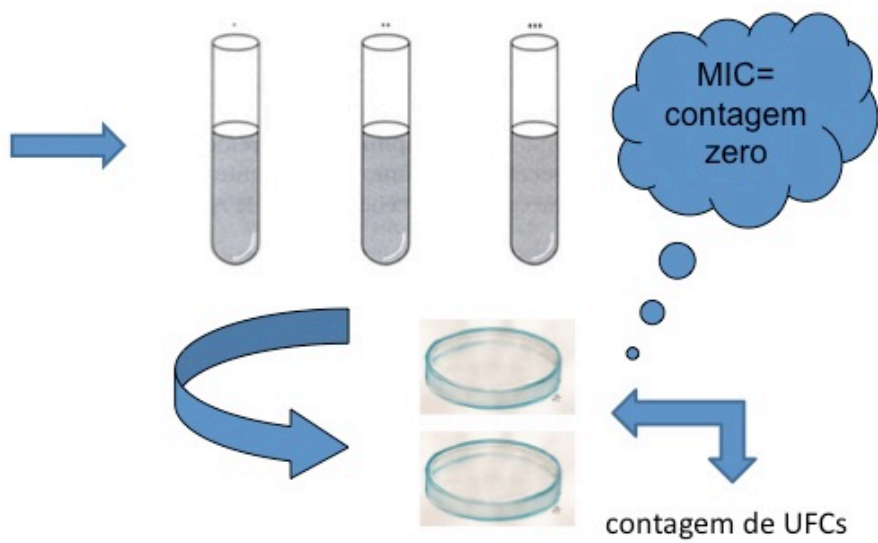
Retirado X mL da solução padrão e inserido em 3 tubos com Y mL de caldo Mueller Hinton obtendo-se a concentração a ser testada  $(X+Y)^*=10\text{mL} + \text{inóculo}$



- 1 - Vortex
- 2 - Estufa 37°C 24hs
- 3 - Diluições seriadas

\*Redução da quantidade de solução padrão (X) em 50% até chegar na concentração zero (controle positivo) e aumento da quantidade de caldo Muller Hinton (Y) até chegar a 10mL.

Alíquotas de 20 $\mu$ L dos tubos foram semeadas em placas contendo Agar para Contagem (PCA) e incubados na estufa por 48hs.



## ANEXO D. SUBMISSÃO DO ARTIGO

Dear Dr. Cogo,

Your submission entitled "POTENTIATION OF THE ACTION OF CALCIUM HYDROXIDE ON ENTEROCOCCUS FAECALIS BY THE PROTON PUMP INHIBITOR OMEPRAZOLE" has been received by the Journal of Endodontics.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Journal of Endodontics web site as an author.

The URL is <http://ees.elsevier.com/joe/>

Your username is: deborahcogo

If you need to retrieve password details,  
please go to: [http://ees.elsevier.com/joe/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/joe/automail_query.asp)

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to the Journal of Endodontics.

Kind regards,

Journal of Endodontics