

Artigo Original de Pesquisa**Original Research Article****Avaliação *in vitro* da permeabilidade dentinária do extrato da erva-mate (*Ilex paraguariensis*)*****In vitro* evaluation of dentinary permeability of the mate herb extract (*Ilex paraguariensis*)**

Flávia Ferreira Pogogelski¹
Natanael Henrique Ribeiro Mattos¹
Liliane Roskamp¹
Luciana Cristina Nowacki¹
Flares Baratto-Filho^{1, 2}
Juliana Pierdoná de Castro¹
Camila Paiva Perin¹

Autor para correspondência:

Camila Paiva Perin
Rua Sydney Rangel dos Santos, 238
CEP 82010-330 – Curitiba – PR – Brasil
E-mail: camilaperin@hotmail.com

¹ Departamento de Odontologia, Universidade Tuiuti do Paraná – Curitiba – PR – Brasil.

² Departamento de Odontologia, Universidade da Região de Joinville – Joinville – SC – Brasil.

Data de recebimento: 7 jul. 2020. Data de aceite: 3 ago. 2020.

Palavras-chave:

Ilex paraguariensis;
hidróxido de
cálcio; fitoterapia;
permeabilidade da
dentina.

Resumo

Introdução: A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta que possui propriedade antimicrobiana, por isso sua aplicabilidade como medicação intracanal na Endodontia. **Objetivo:** Considerando que ser permeável é requisito fundamental da medicação intracanal, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a difusão do extrato de erva-mate através da dentina radicular. **Material e métodos:** Sessenta raízes de dentes permanentes humanos foram preparadas com instrumentos Protaper até a lima F3. Os canais foram irrigados com hipoclorito de sódio 2,5% e, ao final, com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 17%. Os ápices foram selados com resina composta. Criaram-se sete grupos, de acordo com a medicação intracanal utilizada: G1 – canais vazios; G2 – hidróxido de cálcio 500 mg/ml; G3 – extrato de erva-mate 500 mg/ml; G4 – extrato de erva-mate 250 mg/ml; G5 – extrato de erva-mate 125 mg/ml; G6 – hidróxido de cálcio 500 mg/ml + extrato de erva-mate 125 mg/ml e G7 – água

destilada. Os espécimes foram acondicionados em tubos de ensaio tampados, contendo 20 ml de água destilada. Todas as amostras tiveram seu pH aferido nos dias 0, 3, 7, 14 e 30. **Resultados:** O G6 obteve resultado significativo no dia 3; o G3, no dia 30. Não houve diferença estatística entre os demais grupos. **Conclusão:** O extrato de erva-mate 500 mg/ml apresentou permeabilidade dentinária em longo período de contato. Observou-se também que o hidróxido de cálcio permeou a dentina mais rapidamente quando associado à erva-mate 125 mg/ml.

Keywords:

Ilex paraguariensis;
calcium hydroxide;
phytotherapy; dentin
permeability.

Abstract

Introduction: The herb Mate (*Ilex paraguariensis*), is a plant that has antimicrobial property, so its applicability as an intracanal medication in endodontics. **Objective:** Considering that being permeable is a fundamental requirement of intracanal medication, the present study aimed to evaluate the diffusion of the Extract of Herb Mate through the dentin root. **Material and methods:** Sixty root canals of human permanent teeth were prepared with Protaper instruments up to the F3 file. They were irrigated with 2.5% sodium hypochlorite and, in the end, 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The apices were sealed with composite resin. Seven groups were created according to the intracanal medication used: G1 – empty canals; G2 – calcium hydroxide 500 mg/ml; G3 – mate herb extract 500 mg/ml; G4 – herb mate extract 250 mg/ml; G5 – mate herb extract 125 mg/ml; G6 – calcium hydroxide 500 mg/ml + herb mate extract 125 mg/ml and G7 – distilled water. The specimens were packed in capped test tubes containing 20 ml of distilled water. The pH was measured on days 0, 3, 7, 14, and 30. **Results:** G6 obtained a significant result on day 3 and G3 on day 30. The other groups didn't present any statistical difference. **Conclusion:** The extract of mate herb 500 mg/ml showed dentin permeability in longer periods of contact. It was also observed that calcium hydroxide permeated the dentin more rapidly when associated with mate herb 125 mg/ml.

Introdução

O principal objetivo do tratamento endodôntico é eliminar bactérias do canal radicular de maneira definitiva. Mesmo após o tratamento endodôntico, é possível que bactérias residuais permaneçam no sistema de canais radiculares. A falta de nutrientes é capaz de levá-las à morte, mas algumas podem sobreviver e continuar a se proliferar. O preparo químico mecânico é um passo importante do tratamento na tentativa de eliminar essas bactérias, entretanto bactérias que permanecem no sistema de canais podem se multiplicar entre as consultas do tratamento endodôntico [2]. Por isso, a necessidade da utilização de uma medicação intracanal com qualidades específicas.

A medicação intracanal ideal que evitará a proliferação bacteriana entre as sessões deve ser

efetiva durante o período de aplicação, penetrar nos túbulos dentinários, eliminar bactérias presentes e apresentar baixa toxicidade aos tecidos perirradiculares [14]. Existem vários produtos disponíveis, mas nem todos apresentam índice de eficácia aceitável, ou ainda possuem efeitos tóxicos que prejudicam a reparação perirradicular. Atualmente têm se estudado plantas que possuem atividade antimicrobiana, como *Ilex paraguariensis* (erva-mate), uma árvore pertencente à família Aquifoleaceae, nativa da região sul da América do Sul. Pesquisas revelam diversas propriedades nutritivas e farmacêuticas, como antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, diurética, digestiva, cicatricial e estimulante [1].

Não existem estudos que avaliem o comportamento da erva-mate no interior do canal radicular. Por tal motivo, o primeiro passo a ser

avaliado é a sua capacidade de difusão pelos túbulos dentinários, já que esse é um dos pontos fundamentais para se obter uma medicação intracanal eficaz. Após constatação de que a erva-mate possui capacidade de permear a dentina, será possível avaliar sua capacidade antimicrobiana.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a permeabilidade dentinária do extrato de erva-mate por meio de técnica de aferição do pH.

Material e métodos

A amostra foi constituída por 60 dentes unirradiculares permanentes humanos extraídos, todos obtidos no Banco de Dentes da Universidade Tuiuti do Paraná. Foram confeccionados 60 blocos de dentina para o teste de permeabilidade dentinária. Os dentes foram imersos em hipoclorito de sódio a 1% por 24 horas. Após, foram lavados em cubas ultrassônicas contendo água e sabão enzimático. Tecidos moles e cálculos que estavam aderidos às raízes dentárias foram removidos com auxílio de curetas periodontais. Os espécimes foram então lavados em água corrente para a remoção do hipoclorito de sódio e mantidos em frascos com solução de timol até o momento de sua utilização.

O projeto, encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba (PR), foi aprovado sob parecer número 567.393.

Preparo dos dentes

Os segmentos radiculares (blocos de dentina) foram confeccionados com comprimento de 9 mm, a partir do ápice, com auxílio de disco diamantado dupla face em baixa rotação. O tecido cementário não foi removido. Obteve-se o comprimento de cada dente introduzindo-se uma lima K calibre 10 até o forame apical.

Os 60 dentes receberam preparo com limas 10 e 15, de acordo com o necessário, e instrumento rotatório Protaper (Dentsply-Sirona, Ballaigues, Suíça) 1 mm aquém do ápice, até o instrumento rotatório Protaper universal F3. A irrigação utilizada foi 10 ml de hipoclorito de sódio 2,5% (Asfer Indústria Química, São Caetano do Sul, Brasil). Após o preparo fez-se a remoção da *smear layer* mediante irrigação com 10 ml de EDTA trissódico 17% (Maquira Indústria de Produtos Odontológicos S.A., Maringá, Brasil) por 4 minutos. Os canais foram secos com cones de papel absorvente (Tanariman Industrial, Manaus, Brasil) e os ápices

selados com adesivo autocondicionante Bond Force (Tokuyama, Japão) e resina composta Fill Magic A2 (Vigodent S.A. Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, Brasil). Separaram-se os espécimes em sete grupos experimentais; o grupo 7 foi composto por tubos de ensaio com água destilada (controle) e dividiram-se os 60 espécimes da amostra em seis grupos, da seguinte forma: grupo 1 – canais vazios; grupo 2 – hidróxido de cálcio 500 mg/ml; grupo 3 – extrato de erva-mate 500 mg/ml; grupo 4 – extrato de erva-mate 250 mg/ml; grupo 5 – extrato de erva-mate 125 mg/ml; grupo 6 – hidróxido de cálcio 500 mg/ml + extrato de erva-mate 125 mg/ml. Todos os segmentos foram acondicionados em tubos de ensaio tampados, contendo 20 ml de água destilada. Os medicamentos foram injetados nos canais radiculares por meio de seringa plástica com agulha Endo-Eze (Ultradent do Brasil Produtos Odontológicos, Indaiatuba, São Paulo, Brasil), até seu total preenchimento. A pasta de hidróxido de cálcio foi compactada no interior dos canais radiculares com auxílio de pontas de papel absorvente.

Preparo das medicações

Empregou-se uma balança de precisão Bel Engineering (BEL Engineering, Piracicaba, Brasil) para pesar 1 g de extrato de erva-mate. Com auxílio de pipeta (Labmate Pro, HTL Solutions, Warszawa, Polônia) adicionaram-se 2 ml de propilenoglicol (Farmadoctor – Farmácia de Manipulação, Curitiba, Brasil), espatulado até completa dissolução, gerando o extrato de erva-mate 500 mg/ml. Dessa solução foi retirado 1 ml e adicionado 1 ml de propilenoglicol, gerando o extrato de erva-mate 250 mg/ml. Dessa solução foi retirado 1 ml e adicionado 1 ml de propilenoglicol, gerando o extrato de erva-mate 125 mg/ml. Pesou-se também 1 g de hidróxido de cálcio P.A. (Maquira Indústria de Produtos Odontológicos S.A., Maringá, Brasil) e adicionaram-se 2 ml de propilenoglicol, formando o hidróxido de cálcio 500 mg/ml. Foi utilizado 1 ml do extrato de erva-mate 125 mg/ml para a mistura com 1 ml de hidróxido de cálcio 500 mg/ml para formar o hidróxido de cálcio 500 mg/ml + extrato de erva-mate 125 mg/ml. Cada solução foi inserida em sua respectiva seringa, previamente identificada.

Para controle criaram-se dois grupos: um com dez amostras apenas com água destilada (controle positivo), para que pudéssemos perceber sua estabilidade ou não de acordo com o tempo, e outro com dez amostras com segmentos radiculares dentro da água destilada, sem qualquer preenchimento em seus canais, chamados canais vazios (controle negativo).

Obtenção das medidas de pH e análise estatística

As medidas de pH foram realizadas com peagômetro Quimis 400a (Quimis, Diadema, Brasil) previamente calibrado com soluções padrões (pH 7,0 e 4,0). As medidas foram registradas após um período de 30 segundos de contato do eletrodo com a água dos frascos. Entre uma e outra leitura, o eletrodo foi lavado com água destilada e secado com papel toalha. As medições ocorreram nos dias 0, 3, 7, 14 e 30. Os valores de pH registrados foram submetidos a análise estatística pelos testes Anova e Tukey, num nível de significância de 5%.

Resultados

A Anova, usada para comparação entre os grupos, mostrou que houve diferença significativa entre todos os grupos em algum momento. Para localizar as diferenças entre os grupos, recorre-se ao teste de comparação múltipla de Tukey. Todos os valores foram expressos em média e desvio padrão, sendo estipulado o nível alfa em $p < 0,05$ para as análises (tabelas I e II).

Tabela I - Comparação das médias dos medicamentos com os grupos água destilada e canais vazios

Amostras	dia 3	dia 7	dia 14	dia 30
Ca(OH) ₂ 500 mg/ml	ab	ab	ab	
Erva-mate 500 mg/ml		a		b
Erva-mate 250 mg/ml		a		
Erva-mate 125 mg/ml				
Ca(OH) ₂ + erva 125 mg/ml	ab	a	a	a

a) Diferença significativa com a média de pH da água destilada no mesmo período; b) diferença significativa com a média de pH dos dentes com canais vazios no mesmo período

Tabela II - Comparação das médias dentro de cada grupo de acordo com o tempo

Amostras	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 14	Dia 30
Água destilada	5,67±0,29	6,15±0,35	6,13±0,73	6,44±0,57 ^{a*}	5,88±0,44
Canais vazios	5,49±0,19 ^{bcd}	6,32±0,32 ^{abc}	6,71±0,17 ^{ae}	6,82±0,16 ^{abe}	6,50±0,27 ^{ad}
Ca(OH) ₂ 500 mg/ml	5,44±0,23 ^{bcd}	7,36±0,74 ^a	8,08±0,56 ^{ae}	7,57±0,93 ^{ae}	6,38±1,24 ^{cd}
Erva-mate 500 mg/ml	5,25±0,05 ^{bcd}	6,33±0,38 ^{ace}	7,00 ^{abde}	6,27±0,14 ^{ace}	5,67±0,36 ^{abcd}
Erva-mate 250 mg/ml	5,63±0,18 ^{bcd}	6,33±0,31 ^{ac}	6,93±0,22 ^{abde}	6,38±0,27 ^{ac}	6,23±0,22 ^{ac}
Erva-mate 125 mg/ml	5,65±0,10 ^{bcd}	6,73±0,24 ^a	6,60±0,19 ^a	6,81±0,15 ^{ae}	6,51±0,16 ^{ad}
Ca(OH) ₂ + erva 125 mg/ml	5,58±0,27 ^{bcd}	8,82±0,52 ^{bcd}	6,89±0,64 ^{ab}	7,15±0,16 ^{ab}	6,72±0,29 ^{ab}

a) Diferença significativa com o dia 0

b) Diferença significativa com o dia 3

c) Diferença significativa com o dia 7

d) Diferença significativa com o dia 14

e) Diferença significativa com o dia 30

* Pode sugerir alguma contaminação

O grupo água destilada evidenciou no dia 0 um valor de pH médio de $5,67 \pm 0,29$, que só apresentou diferença significativa em seus valores no dia 14. Já o grupo canais vazios apresentou no dia 0 um valor de pH médio de $5,48 \pm 0,19$, e no decorrer das medições seus valores se alteraram com diferença significativa entre todos os dias, tendendo a um pH mais próximo de neutro.

A maior medida de pH foi obtida com o grupo hidróxido de cálcio 500 mg/ml, no dia 7 ($8,08 \pm 0,56$). Já o grupo hidróxido de cálcio 500 mg/ml + erva-mate 125 mg/ml teve a média de pH mais alta de todos ($8,82 \pm 0,52$) no dia 3. Nos dias 14 e 30 não houve diferença estatística entre esses dois grupos.

Entre os grupos com diferentes concentrações da erva-mate não houve diferença significativa nos dias 3, 7 e 14, apresentando diferença no dia 30 entre os grupos erva-mate 500 mg/ml e erva-mate 125 mg/ml.

Quando os grupos de erva-mate foram comparados com os controles, observou-se que no dia 7 os grupos erva-mate 500 mg/ml e erva-mate 250 mg/ml apresentaram diferença estatística significativa com o grupo água destilada, porém em relação ao grupo canais vazios só houve diferença estatística expressiva no dia 30 com a concentração de 500 mg/ml.

O único grupo que evidenciou diferença significativa com o grupo controle positivo em todos os tempos foi o hidróxido de cálcio 500 mg/ml + erva-mate 125 mg/ml (dias 3, 7, 14 e 30), seguido pelos grupos hidróxido de cálcio 500 mg/ml (dias 3, 7 e 14), erva-mate 500 mg/ml e erva-mate 250 mg/ml (dia 7).

Em relação ao grupo controle negativo, o grupo hidróxido de cálcio 500 mg/ml apresentou maior diferença estatística (dias 3, 7 e 14), seguido pelos grupos hidróxido de cálcio 500 mg/ml + erva-mate 125 mg/ml (dia 3) e erva-mate 500 mg/ml (dia 30). Os outros não apresentaram diferença significativa.

Discussão

O tecido dentinário possui uma característica natural, a permeabilidade, que permite que fluidos transitem por sua matriz, principalmente através dos túbulos dentinários, que atuam como vias de transporte. É por meio destes que as substâncias irrigadoras e a medicação intracanal alcançam as regiões mais profundas da dentina até o cimento [5].

Alguns fatores afetam diretamente a permeabilidade dentinária, tais como: diâmetro do canal, idade do paciente, integridade do dente, natureza da substância química e magma dentinário formado durante o preparo químico-cirúrgico [5].

Fatores fisiológicos, como a idade do paciente, patológicos, como traumas e processos cariosos, bem como procedimentos endodônticos, podem reduzir a permeabilidade da dentina e, conseqüentemente, interferir na difusão dos íons [5]. Wang e Hume [16] e Çalt *et al.* [3] acreditam que o efeito tampão da dentina pode impedir a penetração mais profunda de íons, no interior dela. Segundo os autores, isso pode ocorrer quando doadores de prótons ($H_2PO_4^-$, H_2CO_3 e HCO_3^-) presentes na camada hidratada da hidroxiapatita fornecem prótons adicionais para manter o pH inalterado, funcionando como um tampão [3, 16].

Pashley e Livingston [12] verificaram que o tamanho da molécula de substâncias a serem difundidas na dentina influencia a permeabilidade dentinária. As substâncias com tamanho molecular menor permeiam a dentina mais facilmente, até mesmo na presença de barreira física, como o magma dentinário. Quanto maior o tamanho molecular, mais restrita será a penetração da substância. Quando se remove o magma dentinário, o trânsito das substâncias com maior tamanho molecular é facilitado [12].

A infecção no interior de canais radiculares não é eliminada de forma eficaz somente pelo preparo químico do canal (PQM) e pela obturação de canal radicular, estando o sucesso do tratamento dependente também da aplicação de uma medicação intracanal adequada após o PQM. Dessa forma, faz-se necessária a utilização de uma substância com o objetivo de destruir os microrganismos que sobreviveram. Assim, deverá ser aplicado um medicamento no interior do sistema de canais radiculares que atuará como um recurso auxiliar, visando à destruição dos microrganismos [13, 14].

O hidróxido de cálcio desempenha um importante papel na Endodontia em virtude de sua capacidade de estimular a formação de tecido duro e de suas propriedades antimicrobianas. Foi introduzido por Hermann, na Odontologia, em 1920; na Endodontia é usado rotineiramente como medicação intracanal. Hoje em dia tal substância é uma das mais efetivas medicações intracanal utilizadas durante o tratamento endodôntico. Sua ação se deve ao fato de estabelecer um pH altamente alcalino, de aproximadamente 12,5 dentro do canal, no qual a maioria dos microrganismos não consegue sobreviver. Além disso, o hidróxido de cálcio media a neutralização de lipopolissacarídeos, o que auxilia na limpeza dos canais radiculares. Já foi demonstrado que a ação biológica do hidróxido de cálcio depende da dissociação iônica de íons cálcio e hidroxila. O pH elevado, resultante da liberação de íons hidroxila, é capaz de alterar a integridade da membrana citoplasmática, provocando injúrias

químicas aos seus componentes orgânicos ou pela destruição de fosfolípidos e ácidos graxos insaturados da própria membrana citoplasmática bacteriana [10, 15].

Porém faz-se necessária a busca por outros medicamentos. Estudos com algumas plantas, sobretudo a erva-mate, revelam diversas propriedades nutritivas e farmacêuticas, tais como: antioxidante, antimicrobiana, diurética, digestiva, cicatricial e estimulante, conferindo um grande potencial de aproveitamento [1, 4, 7]. Isso motivou a realização do presente estudo, com o objetivo de avaliar a permeabilidade dentinária do extrato de erva-mate, para verificar a possibilidade de seu uso futuro como medicação intracanal. Interessante foram os resultados obtidos, que mostraram que houve diferença significativa entre todos os grupos analisados, em algum tempo.

Os valores sugerem que a própria estrutura dental consegue aumentar o pH da água, conforme observado por outros autores [8]. Ainda que os dentes tenham sido lavados com água destilada, também não se pode descartar a possibilidade de que resíduos da solução de hipoclorito de sódio tenham elevado o pH.

As maiores medidas de pH obtidas com o grupo hidróxido de cálcio 500 mg/ml confirmam a difusão dos íons hidroxila através da dentina radicular, como verificado por diversos autores [6, 11]. No presente estudo, o pH mais elevado ocorreu no dia 7. Já o grupo hidróxido de cálcio 500 mg/ml + erva-mate 125 mg/ml teve a média de pH mais alta de todos no dia 3, demonstrando que a difusão foi mais rápida.

Quando os grupos de erva-mate foram comparados com os controles, os resultados evidenciam que as concentrações de 250 mg/ml e 125 mg/ml talvez não tenham tido qualquer influência nos valores de pH e sim apenas a alteração dada pela própria estrutura dentária, como já citado anteriormente.

As diferenças de médias de pH dos diversos grupos mostram que a dentina de cada dente possui permeabilidade distinta. Variações no número, diâmetro e comprimento dos túbulos dentinários e a presença de canais laterais podem justificar as discrepâncias de valores registrados [9].

Conclusão

Os resultados sugerem que a concentração de 500 mg/ml de erva-mate pode apresentar aplicabilidade como medicação intracanal para maiores períodos de contato, desde que novos

estudos sejam feitos para comprovar sua ação antimicrobiana dentro da estrutura dentária. A associação hidróxido de cálcio 500 mg/ml + erva-mate 125 mg/ml também comprovou sua permeabilidade, além de ter acelerado o tempo de difusão do hidróxido de cálcio, potencializando sua ação. São necessários novos estudos para avaliar se a capacidade antimicrobiana do hidróxido de cálcio sofre alteração na presença da erva-mate.

Referências

1. Biasi B, Grazziotin N, Hofmann AE. Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis*. *Braz J Pharmac.* 2009; 19: 582-5.
2. Bystrom 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 Oct;1(5): 170-5.
3. Çalt S, Serper A, Özçelik B, Dalat MD. pH changes and calcium ion diffusion from calcium hydroxide dressing materials through root dentin. *J Endod.* 1999 May;25(5):329-31.
4. Carelle G, Macedo SMD, Valduga AT, Corazza ML, Oliveira JV, Franceschi E et al. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hill.) obtido por extração com CO₂ supercrítico. *Ver Bras Plantas Med.* 2011;13(1):110-5.
5. Carvalho AS, Camargo CH, Valera MC, Camargo SE, Mancini MN. Smear layer removal by auxiliary chemical substances in biomechanical preparation: a scanning electron microscope study. *J Endod.* 2008 Nov;34(11):1396-400.
6. Chamberlain TM, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. pH changes in external root surface cavities after calcium hydroxide is placed at 1, 3 and 5 mm short of the radiographic apex. *Dent Traumatol.* 2009;25:470-4.
7. Dartora N, Souza LM, Paiva SMM, Scoparo CT, Iacomini M, Gorin PAJ et al. Rhamnogalacturonan from *Ilex paraguariensis*: a potential adjuvant in sepsis treatment. *Carbohydr Polym.* 2013;92(2):1776-82.
8. Felipe MCS, Felipe WT, Espesim CS, Freitas SFT. Effectiveness of NaOCl alone or in combination with edta on the diffusion of hydroxyl ions released by calcium hydroxide paste. *J Appl Oral Sci.* 2006;1:1-5.

9. Fogel HM, Marshall FJ, Pashley DH. Effects of distance from the pulp and thickness on the hydraulic conductance of human radicular dentin. *J Dent Res.* 1988;67:1381-5.
10. Han GY, Park SH, Yoon TC. Antimicrobial activity of Ca(OH)₂ containing pastes with *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod.* 2001 May;27(5):328-32.
11. Hosoya N, Takahashi G, Arai T, Nakamura J. Calcium concentration and pH of the periapical environment after applying calcium hydroxide into root canals in vitro. *J Endod.* 2001 May;27(5):343-6.
12. Pashley DH, Livingston MJ. Effect of molecular size on permeability coefficients in human dentine. *Arch Oral Biol.* 1978;23(5):391-5.
13. Siqueira Jr JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999 Sep;32(5):361-9.
14. Siqueira JJ, Roças I. Present status and future directions in endodontic microbiology. *Endod Top.* 2014;(30):3-22.
15. Silva BM, Tomazinho FSF, Anele JA, Leonardi DP, Barata Filho F. A ação do hidróxido de cálcio frente ao *Enterococcus faecalis* nos casos de periodontite apical secundária. *Odonto.* 2010;18(36):95-105.
16. Wang JD, Hume WR. Diffusion of hydrogen ion and hydroxyl ion from various sources through dentine. *Int Endod J.* 1988 Jan;21(1):17-26.