

PAULA TEREZA VARDASCA DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE SEIS CIMENTOS
ENDODÔNTICOS AVALIADOS EM DOIS MÉTODOS.**

CAMPO GRANDE

2010

PAULA TEREZA VARDASCA DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE SEIS CIMENTOS
ENDODÔNTICOS AVALIADOS EM DOIS MÉTODOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Gregol da Silva

Co-orientadora: Profa. Ms. Adriana Mary Mestriner

CAMPO GRANDE
2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

PAULA TEREZA VARDASCA DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE SEIS CIMENTOS
ENDODÔNTICOS AVALIADOS EM DOIS MÉTODOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Gregol da Silva

Aprovada em ____ de _____ de ____, pela Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Pedro Gregol da Silva
FAODO-UFMS

Prof. Dr. André Afif Elossais
UNIGRAN DOURADOS-MS

Prof. Dr. José Luiz Guimarães de Figueiredo
FAODO-UFMS

DEDICO

Aos meus pais **Paulo Roberto da Cruz de Oliveira** e **Maria do Carmo Vardasca de Oliveira**, pelo apoio, amor, carinho e amizade, dedicados durante toda a vida, por todos os ensinamentos, conselhos e força que me fizeram alcançar mais um grande sonho.

Ao meu irmão **Felipe Vardasca de Oliveira**, meu grande amigo acima de tudo, por todos os momentos que me ajudou a superar e acreditar que esta etapa seria cumprida.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

Ao meu professor e orientador **Professor Doutor PEDRO GREGOL DA SILVA**, pela dedicação, paciência, disponibilidade durante todas as etapas deste trabalho, minha eterna gratidão.

A professora de microbiologia da UNIGRAN **Professora Mestre ADRIANA MARY MESTRINER FELIPE DE MELO**, minha co-orientadora, pela imensa ajuda, disponibilidade, paciência, amizade e oportunidade de estar realizando este trabalho.

A **FUNDECT**, pelo apoio financeiro durante estes dois anos como bolsista, o meu muito obrigado.

Ao meu amigo e estagiário **LUIZ FERNANDO BENITEZ MACORINI**, pela dedicação e apoio durante toda a pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

As minhas amigas e alunas **LETÍCIA MIEKO INOUE, LUCIANA ALMIRÃO SOBREIRA e GRAZIELA PEREIRA DA SILVA**, por todo apoio, amizade, companheirismo e auxílio durante toda a pesquisa. Obrigado por estarem ao meu lado neste momento tão valioso.

A aluna e estagiária **MAÍSA** o meu muito obrigado pelo suporte e auxílio dentro do laboratório de microbiologia da UNIGRAN.

Ao **CENTRO UNIVERSITÁRIO DA GRANDE DOURADOS (UNIGRAN)**, por possibilitar a realização de toda a pesquisa dentro do laboratório de microbiologia. Serei eternamente grata por esta imensa ajuda.

A minha amiga pessoal **PRISCILA CARRIJO**, por todos os momentos ao meu lado me ajudando e me socorrendo durante todo o período do curso.

Ao **Professor Doutor ANDRÉ AFIF ELOSSAIS**, por toda a força e companheirismo dedicados durante este último ano, meus singelos agradecimentos e eterna amizade.

Aos amigos **VAGNER ADRIANO, LARISSA HERMETO e MÁRCIA LOPES** por todas as idas e vindas de Dourados à Campo Grande. Pelo companheirismo, pelas horas de sono perdidas, pela amizade e força sempre prestadas. Obrigada por tudo.

Ao **Professor Doutor KEY FABIANO SOUZA PEREIRA**, pela oportunidade de estar concretizando este sonho, muito obrigada.

Ao **Professor Doutor RICARDO DUTRA AYDOS**, Coordenador do curso da Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste da FAMED/UFMS, pela realização deste nobre empreendimento.

A **Todos os Professores do CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FAMED/UFMS e aos meus professores de GRADUAÇÃO DA UNIDERP**, minha eterna gratidão por todo o conhecimento lecionado durante estes anos, pela paciência, carinho e disponibilidade concedidos. Sem o apoio de vocês hoje eu não estaria aqui realizando este sonho.

A **Todos os AMIGOS** que me ajudaram direta ou indiretamente na realização de mais esta etapa da minha carreira, o meu muito obrigado.

Aos meus **Colegas Professores da UNIGRAN** pela força e dedicação. Obrigado por contribuírem para meu crescimento profissional e pessoal.

A **EDNA e VERA**, pelo auxílio dentro da Faculdade, pela amizade, paciência e companheirismo durante todo o curso, muito obrigada.

Ao **Professor Doutor ALCIDES MOREIRA e Professora Doutora POLLYANNA KASSIA DE OLIVEIRA BORGES**, pelo apoio, dedicação, carinho, exemplo profissional e pessoal, demonstrado nesse último ano. Obrigado por fazerem parte da construção e concretização deste sonho.

Aos **DOUTOURANDOS, Professor Mestre ALLAN AUGUSTO KALIFE COELHO e a Professora Mestre DAISILENE BAENA** pela atenção, disponibilidade e auxílio na correção do trabalho, e pela participação na qualificação, o meu muito obrigada e eterna gratidão.

**"A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a
delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que
alguém acredita e confia em você."**

Ralph Emerson

"O verdadeiro homem mede a sua força quando se defronta com o obstáculo."

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

VARDASCA DE OLIVEIRA PT. **Atividade antimicrobiana *in vitro* de seis cimentos endodônticos avaliados em dois métodos** Campo Grande; 2010. [Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Objetivo: O presente estudo avaliou a atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos Endofill[®], Acroseal[®], Sealer 26[®], Sealapex[®], Endomethasone N[®] e AH plus[®] frente as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e a levedura *Candida albicans*. **Método:** Para as análises antimicrobianas foram utilizadas duas metodologias: teste de difusão em ágar e contato direto em meio líquido. Para o teste de difusão foram confeccionados poços no ágar, inseridos os cimentos e armazenados em estufa bacteriológica à 37° C durante 48 horas. Após esse período foram medidos os halos de inibição microbiana através de um paquímetro digital. No teste de contato direto, os cimentos foram inseridos em tubos de ensaio contendo caldo TSB, seguidos 20 minutos, os microorganismo foram acrescentados e realizadas leituras medindo o grau de absorbância de cada cimento através de um espectrofotômetro, nos tempos de 24 e 48 horas. Realizou-se, para cada cepa, triplicata nos testes de difusão em ágar e duplicata nos testes de contato direto em meio líquido. Para análise dos resultados foram utilizados os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e de Student-Newman-Keuls. **Resultados:** Dentro dos resultados observou-se que no teste de difusão em ágar todos os cimentos apresentaram atividade antimicrobiana frente a algum microorganismo, sendo que os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol obtiveram melhores capacidades antimicrobianas quando comparados com os outros, destacando-se o Endomethasone N[®] que demonstrou halos de inibição maiores que o restante dos materiais frente às bactérias *S. aureus*, *E.coli* e *E. faecalis*, não havendo diferenças significativas com os grupos controle-positivo, que foram respectivamente: Vancomicina, Cloranfenicol e Ampicilina ($p>0,05$). No teste de contato direto, o Endomethasone N[®] e o Endofill[®] também obtiveram menores graus de absorbância, demonstrando maior capacidade antimicrobiana; sem nenhuma diferença significativa entre os materiais e os grupos controle-positivo citados anteriormente; acrescentando o antimicrobiano Ketoconazol (controle positivo), utilizado para o teste do fungo *C. albicans* ($p>0,05$). **Conclusão:** Diante do exposto foi concluído que os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol demonstraram maior capacidade antimicrobiana contra os microorganismos testados nas duas metodologias citadas, destacando-se o material Endomethasone N[®].

PALAVRAS-CHAVE: Ação Antimicrobiana; Cimentos Endodônticos; Obturação do Canal Radicular; Bactéria, Endodontia.

ABSTRACT

VARDASCA DE OLIVEIRA PT. **In vitro antimicrobial activity of six cements endodontics evaluated in two methods.** Campo Grande; 2010. [Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Objective: The present study evaluated the antimicrobial activity of sealers Endofill[®], Acroseal[®], Sealer 26[®], Sealapex[®], Endomethasone N[®] and AH plus[®] front the bacteria *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and the yeast *Candida albicans*. **Method:** For the antimicrobial tests, was used two different methods: ágar diffusion test and direct contact in liquid. For the diffusion test in ágar wells were prepared, the cements were inserted and stored in the bacteriological incubator at 37 ° C for 48 hours. After this period were measured the inhibition of microbial through a digital caliper. In direct contact test, the sealers were placed in test tubes containing broth TSB, passed the 20 minutes after, the microorganism were added and reading was performed by measuring the absorbance of each grade cement using a spectrophotometer, in times of 24 and 48 hours. Was carried out, for each strain, triplicate in ágar diffusion tests, and duplicate tests in direct contact in a liquid medium. For analysis of results, was performed statistical tests of Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keuls. **Results:** Within the results can be observed that in the ágar diffusion test all sealers showed antimicrobial activity against some microorganisms, and sealers based on zinc oxide and eugenol had better antimicrobial capabilities compared to others, detaching the Endomethasone N[®] that demonstrated inhibition zones larger than the rest of the materials front the bacteria *S. aureus* and *E. coli faecalis* with no significant differences with the positive control groups, which were respectively: Vancomycin, Chloramphenicol and Ampicillin ($p > 0,05$). In direct contact test, the Endomethasone N[®] and Endofill[®] also had lower levels of absorbance, demonstrating high antimicrobial activity, with no significant difference between the materials and the positive control groups mentioned above by adding the antimicrobial Ketoconazole (positive control), used for testing against *C. albicans* ($p > 0,05$). **Conclusion:** Given the above it was concluded that the sealers based on zinc oxide and eugenol showed higher antibacterial activity within 48 hours, against the tested microorganisms in the two methods mentioned, highlighting the material Endomethasone N[®].

KEYWORDS: Antimicrobial Activity; Root Canal Sealers; Root Canal Filling; Bacteria; Endodontics.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ensaio para o teste de contato direto em meio líquido.....	50
Tabela 2 - Medidas dos halos de inibição (em cm), dos cimentos endodônticos G1 - Endofill®; G2 - Acroseal®; G3 – Sealapex®; G4 – Sealer 26®; G5 - Endomethasone N®; G6 – AH Plus®; G7 – Controle Positivo (Clorafenicol) frente à bactéria <i>E. coli</i>	53
Tabela 3 - Médias em ordem decrescente da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos e controles frente a <i>E. coli</i>	53
Tabela 4 - Medidas dos halos de inibição (em cm), dos cimentos endodônticos G1 - Endofill®; G2 - Acroseal®; G3 – Sealapex®; G4 – Sealer 26®; G5 - Endomethasone N®; G6 – AH Plus®; G7 – Controle Positivo (Vancomicina) frente à bactéria <i>S. aureus</i>	54
Tabela 5 - Médias em ordem decrescente da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos e controles frente ao <i>S. aureus</i>	54
Tabela 6 - Medidas dos halos de inibição (em cm), dos cimentos endodônticos G1 - Endofill®; G2 - Acroseal®; G3 – Sealapex®; G4 – Sealer 26®; G5 - Endomethasone N®; G6 – AH Plus®; G7 – Controle Positivo (Ketoconazol) frente ao fungo <i>C. albicans</i>	55
Tabela 7 - Médias em ordem decrescente da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos e controles frente a <i>C. albicans</i>	55
Tabela 8 - Medidas dos halos de inibição (em cm), dos cimentos endodônticos G1 - Endofill®; G2 - Acroseal®; G3 – Sealapex®; G4 – Sealer 26®; G5 - Endomethasone N®; G6 – AH Plus®; G7 – Controle Positivo (Ampicilina), frente à bactéria <i>E. faecalis</i>	56
Tabela 9 - Médias em ordem decrescente da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos e controles frente a <i>E. faecalis</i>	56

Tabela 10 - Medidas dos graus de absorbância analisados em espectrofotômetro, dos cimentos endodônticos G1 - Endofill®; G2 - Acroseal®; G3 – Sealapex®; G4 – Sealer 26®; G5 - Endomethasone N®; G6 – AH Plus®; G7 – Controle positivo (Vancomicina); G8 - controle negativo (bactéria), frente a *S.aureus*..... 57

Tabela 11 - Médias em ordem crescente da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos e controles frente a *S.aureus*..... 57

Tabela 12 - Medidas dos graus de absorbância analisados em espectrofotômetro, dos cimentos endodônticos G1 - Endofill®; G2 - Acroseal®; G3 – Sealapex®; G4 – Sealer 26®; G5 - Endomethasone N®; G6 – AH Plus®; G7 – Controle positivo (Ketoconazol); G8 - controle negativo (Fungo), frente a *C. albicans*..... 58

Tabela 13 - Médias em ordem crescente da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos e controles frente a *C. albicans*..... 58

Tabela 14 - Medidas dos graus de absorbância analisados em espectrofotômetro, dos cimentos endodônticos G1 - Endofill®; G2 - Acroseal®; G3 – Sealapex®; G4 – Sealer 26®; G5 - Endomethasone N®; G6 – AH Plus®; G7 – Controle positivo (Ampicilina); G8 - controle negativo (bactéria), frente a *E. faecalis*..... 59

Tabela 15 - Médias em ordem crescente da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos e controles *E. faecalis*..... 59

Tabela 16 - Medidas dos graus de absorbância analisados em espectrofotômetro, dos cimentos endodônticos G1 - Endofill®; G2 - Acroseal®; G3 – Sealapex®; G4 – Sealer 26®; G5 - Endomethasone N®; G6 – AH Plus®; G7 – Controle positivo (Clorafenicol); G8 - controle negativo (bactéria), frente a *E. coli*..... 60

Tabela 17 - Médias em ordem crescente da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos e controles frente a *E. coli*..... 60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Câmara de fluxo laminar.....	45
Figura 2 - Cimentos utilizados para os testes de difusão em ágar e contato direto em meio líquido. a) Cimento AH Plus® à base de resina epóxica; b) Acroseal®, à base de hidróxido de cálcio; c) Endofill®, à base de óxido de zinco e eugenol; d) Sealapex®, à base de hidróxido de cálcio; e) Endomethasone N®, à base de óxido de zinco e eugenol; f) Sealer 26®, à base de resina e hidróxido de cálcio.....	46
Figura 3 - a) Escala de McFarland mostrando turbidez do meio; b) inserção das suspensões microbianas na superfície do ágar Mueller Hinton; c) Confecção dos poços para posterior colocação dos cimentos; d) inserção dos cimentos; e) Placas mostrando a análise dos halos de inibição frente à três cimentos endodônticos; f) Placa demonstrando o halo de inibição do controle positivo Vancomicina.....	47
Figura 4 - a) soluções salinas com os inóculos microbianos; b) estufa microbiológica onde foram armazenados os ensaios c) tubos contendo cimentos + meio líquido + microorganismo; d) Espectrofotômetro; e) meio estéril onde foi realizado todo o experimento.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

S	Desvio Padrão
Rx	Raios X
Bio	Polpa viva
CDC	Cimento dentina
Necro	Polpa necrosada
MIC	Medicação intracanal
TSB	Tryptcase Soy Both
BHI	Brain Heart Infusion
NaOC	Hipoclorito de Sódio
CRT	Comprimento real de trabalho
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
PCR	Reação em cadeia da polimerase
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético
VMGA	Viability Medium, Göteborg, Anaerobically prepared III

LISTA DE SÍMBOLOS

mm	Milímetro
ml	Mililitro
μm	Micrometro
μl	Microlitro
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
g	Grama
=	Igual
<	Menor
$\leq$	Igual ou Menor
>	Maior
n ^o	Número

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Microorganismos encontrados dentro do sistema de canais radiculares.....	20
2.2 Citotoxicidade dos cimentos endodônticos.....	25
2.3 Atividade antimicrobiana.....	26
3 OBJETIVOS.....	42
4 MATERIAIS E MÉTODO.....	43
4.1 Materiais.....	43
4.1.1 Cimentos.....	43
4.1.2 Microorganismos.....	43
4.1.3 Meios de cultura.....	43
4.2 Métodos.....	44
4.2.1 Método de difusão em àgar.....	44
4.2.1.1 Preparação do inóculo.....	44
4.2.1.2 Preparo do àgar.....	44
4.2.1.3 Inoculação das bactérias.....	44
4.2.1.4 Preparo dos cimentos.....	45
4.2.1.5 Incubação.....	48
4.2.1.6 Leitura dos halos de inibição.....	48
4.2.2 Método de inibição em caldo.....	48
4.2.2.1 Preparo das suspensões microbianas.....	48
4.2.2.2 Preparo dos caldos ou meio líquido.....	49
4.2.2.3 Preparo dos cimentos.....	49
4.2.2.4 Inoculação dos microorganismos.....	49
4.2.2.5 Leitura e interpretação dos resultados.....	50
4.3 Análise estatística.....	52
4.3.1 Análise de Variância ANOVA.....	52
4.3.1.1 Hipóteses.....	52
5 RESULTADOS.....	53
5.1. Teste de difusão em àgar.....	53
5.1.1. <i>Escherichia coli</i>	53

5.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	54
5.1.3. <i>Candida albicans</i>	55
5.1.4. <i>Enterococcus faecalis</i>	56
5.2. Contato direto em meio líquido	57
5.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	57
5.2.2. <i>Candida albicans</i>	58
5.2.3 <i>Enterococcus faecalis</i>	59
5.2.4 <i>Escherichia coli</i>	60
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÕES	67
8 REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	73
APÊNDICE	74

1 INTRODUÇÃO

A endodontia é a área da odontologia que visa prevenir e controlar as infecções microbianas dentro do sistema de canais radiculares. Todas as etapas do tratamento endodôntico são de fundamental importância, ao serem considerados atos operatórios interdependentes, especialmente no que concerne ao selamento, sendo que o material e a técnica de obturação do sistema de canais radiculares interferem positivamente no sucesso do tratamento.

Neste sentido, diferentes técnicas de obturação dos canais radiculares estão sendo propostas, onde a guta-percha está sendo dissolvida, aquecida, resfriada, termocompactada e plastificada, com a finalidade de melhor se acomodar no espaço do canal radicular preparado. Dentro da filosofia endodôntica existem as bios e as necropulpectomias, nas biopulpectomias (vitalidade pulpar e ausência de contaminação) objetiva-se modelar, instrumentar e obturar os canais radiculares, já nas necropulpectomias (morte pulpar e contaminação microbiana) preconiza-se limpar, eliminar e prevenir reinfecções almejando o sucesso do tratamento (LEAL, 2008).

A dificuldade de tornar a extensão do canal radicular um meio livre de microorganismos está relacionada com a complexidade e variabilidade de sua morfologia. O sistema é composto de um canal principal e inúmeras ramificações constituindo-se de canais laterais, acessórios, secundários e deltas apicais. Essas ramificações dificultam a sanificação durante o tratamento, podendo levar a permanência de bactérias e seus subprodutos no interior dos túbulos dentinários e região periapical (SOARES; GOLDBERG, 2001).

Existe um número considerável de bactérias anaeróbias presentes nos canais radiculares, especialmente em infecções persistentes, podendo estar relacionado ao fato dessas bactérias apresentarem boa adaptação frente à sobrevivência em meios com necrose pulpar e em túbulos dentinários onde o suprimento de sangue e oxigênio é limitado ou inexistente (ESTRELA, 2004).

A obturação tem papel fundamental dentro do tratamento endodôntico, pois cria um vedamento apical, lateral e coronário, fazendo com que os materiais obturadores confinem os agentes irritantes dentro do sistema de canais radiculares, bloqueando seu egresso para os tecidos periapicais. Um selamento ideal previne a recontaminação coronária por saliva e evita que os fluidos do tecido perirradicular entrem no canal, impedindo a nutrição dos microorganismos remanescentes.

Na maioria das técnicas obturadoras têm-se a utilização de um material sólido, associado a um cimento endodôntico, a fim de proporcionar o selamento. O material de escolha para realização desse procedimento, geralmente é a guta-percha, introduzida por Bowman em 1867, tendo aproximadamente 75% de óxido de zinco em sua composição. Quando comparada a outros materiais obturadores apresenta várias vantagens, tais como: facilidade de emprego, custo reduzido, boa radiopacidade, não ser solubilizada e ser facilmente removida nos casos de insucessos (LEAL, 2008; MACHADO *et al.*, 2007).

Autores descreveram a importância dos cimentos endodônticos no selamento hermético do sistema de canais radiculares que, embora utilizados como materiais coadjuvantes vêm demonstrando influência no sucesso da terapia. Os cimentos são utilizados para prevenir que os exudatos periapicais se difundam para as partes vazias (não obturadas pela guta-percha), e previne que bactérias residuais cheguem até os tecidos periapicais eliminando os espaços entre o material principal (guta-percha) e as paredes do canal radicular. As características biológicas e físico-químicas destes materiais vão ditar sua utilização dentro de um tratamento (LEONARDO, 2008; SIQUEIRA Jr. *et al.*, 2010).

Grossman, em 1958 *apud* Leonardo (2008), considerou as propriedades ideais de um cimento endodôntico: ser homogêneo, promover selamento adequado, ser radiopaco, possuir partículas finas de pó, não sofrer retração após endurecimento, não manchar a estrutura dentária, ser bactericida ou bacteriostático, tomar presa lentamente, ser insolúvel aos fluídos bucais, bem tolerado pelos tecidos periapicais e ser solúvel aos solventes comuns.

Com o ato obturador, tem-se o vedamento da margem dentina-obturação através do cimento. Ao possuir propriedades antimicrobianas, o cimento obturador visa minimizar a presença bacteriana e fúngica nas áreas mais complexas dos canais radiculares. Ao realizar um tratamento endodôntico, as expectativas de sucessos são promissoras, portanto, para se utilizar um material obturador, suas propriedades biológicas e físico-químicas devem ser reconhecidas para a obtenção de resultados satisfatórios perante o ato operatório.

Turk *et al.*, em 2009, avaliaram através de um experimento clínico que nos casos de necropulpectomias I e II, onde se tem a contaminação do canal em toda sua extensão, o preparo químico e mecânico e as medicações intracanaís muitas vezes não são suficientes para eliminação dos microorganismos. Assim, o uso de cimentos com ação antimicrobiana poderá proporcionar menores chances das bactérias e fungos, que ainda permanecem dentro dos canais radiculares, proliferarem e ocasionarem uma reinfecção (SLUTZKY-GOLDBERG *et al.*, 2008).

Existem atualmente no mercado inúmeros cimentos obturadores baseados nos mais diversos materiais, tais como: óxido de zinco e eugenol, resina plástica, hidróxido de cálcio, ionômero de vidro e silicone. Dentre eles, as propriedades variam sendo que nenhum cimento satisfaz todos os critérios. Os cimentos endodônticos mais utilizados nas clínicas odontológicas são aqueles a base de óxido de zinco e eugenol, não somente em sua fórmula original, mas também em formulações diversas. Atualmente, o material obturador Endofill[®] tem se destacado no mercado, pois apresenta impermeabilidade, tempo de presa adequado e baixo custo (SANDINI *et al.*, 2004).

O Endofill[®] é composto por resina hidrogenada, prata de sódio anidro e óleo de amêndoas doces, componentes que retardam seu tempo de endurecimento, aumentando o tempo de trabalho e podendo ocasionar efeitos indesejados. Dentre os efeitos pode-se citar: irritação dos tecidos periapicais, devido ao excesso de eugenol que resulta em uma quelação incompleta ou pode servir de causa da contração do material (SENNE *et al.*, 2009).

Outro cimento á base de óxido de zinco e eugenol é o Endomethasone[®], que possui características como plasticidade, radiopacidade, poder anti-séptico e ação anti-inflamatória. Este material sofreu uma modificação pela remoção de seu componente, o paraformaldeído, devido a sua extrema citotóxicidade, passando a ser nomeado como Endomethasone N[®] (ERSEV *et al.*, 1999).

O AH Plus[®] é um cimento composto por polímeros de resina epóxica. Apresenta bom desempenho como selante, boa aderência aos canais radiculares, baixa solubilidade e potencial desinfetante. Já o cimento Sealer 26[®], à base de resina epóxica e hidróxido de cálcio, vem demonstrando boa capacidade seladora como material obturador de canais radiculares. O Acroseal[®] é um material também constituído de resina epóxica e hidróxido de cálcio, apresentando-se para uso em forma de pasta base e catalisadora (LEONARDI *et al.*, 2009).

Introduzido no Brasil em 1984, o cimento Sealapex[®] apresenta-se em duas bisnagas (pasta-pasta) e tem como algumas de suas características a boa infiltração marginal, o selamento apical e excelente tolerância tecidual, demonstrando propriedades biológicas acentuadamente superiores aos cimentos à base de óxido de zinco e eugenol e resina plástica. Possui pó de óxido de cálcio, que em contato com o fluido tissular é convertido em hidróxido de cálcio (MACHADO *et al.*, 2007)

Com o objetivo de avaliar as propriedades antimicrobianas dos diferentes cimentos obturadores, a fim de minimizar o aparecimento de insucessos pós-operatórios devido à recolonização de microrganismos no canal radicular, mais precisamente, em suas paredes

dentinárias ou ainda em suas ramificações, a pesquisa buscou testar *in vitro* diferentes cimentos endodônticos frente a culturas puras bacterianas e fúngicas, como forma de triar sua avaliação quando aplicado *in vivo*, através do método de difusão em agar e contato direto em meio líquido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microorganismos encontrados dentro do sistema de canais radiculares

O conhecimento sobre as espécies microbianas que habitam o interior dos canais radiculares é de extrema importância, pois é através deste que é estipulado a forma e quais materiais irão colaborar para o sucesso do tratamento endodôntico. Kobayachi *et al.* (1990) avaliaram a flora bacteriana de bolsas subgengivais e canais radiculares de dentes desvitalizados afetados por doença periodontal. Quinze dentes hígidos, necrosados e com doença periodontal foram selecionados. Para coleta do material os dentes foram isolados, desinfetados, abertos, explorados com limas nº 15 à 25 (Dentsply De Trey, Konstanz, Germany). Posteriormente foram inseridos cones de papel absorvente dentro dos canais radiculares e em seguida os mesmos foram colocados em contato com 2ml de meio de cultura contendo 10% H₂, 10%CO₂ e Nitrogênio. As soluções foram misturadas, retirado 0,1ml de diluição e colocado em placas contendo ágar sangue. Os experimentos foram feitos em triplicatas, sendo que duas eram incubadas em condições de anaerobiose e uma amostra durante 7 dias a 37°C. Após incubação as colônias foram contadas em uma proporção de 10 a 300 e o número de bactérias por milímetro de cultura foi calculado. A observação morfológica foi realizada avaliando quatro tipos de bactérias (coccos, bastonetes, espiroquetas e outros). As espécies foram determinadas através de testes de diferenciação biomecânica, kit de diferenciação de anaeróbios, teste de produção de gases e teste de resistência ao calor. Nos resultados foi demonstrado que as bactérias anaeróbias estritas foram o tipo predominante nos canais radiculares. Excluindo ‘outros’, os coccos foram os espécimes prevalentes do canal radicular (28,9%), seguidos dos bastões e espiroquetas. *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Bacteróides* e *fusobacterium* foram detectados na maioria dos casos.

Analizando ainda o perfil microbiológico das infecções endodônticas, Molander *et al.*, em 1998 analisaram 100 dentes tratados endodonticamente com periodontite apical crônica (grupo P) e 20 dentes com tratamento endodôntico satisfatório, sem sinais clínicos (grupo T). Os dentes foram isolados, realizada abertura coronária, desobturados, colhidas amostras de dentro dos canais radiculares e transferidas para o meio de transporte (VMGA III). As culturas foram preparadas e as cepas anaeróbias foram identificadas através de micromorfologia, morfologia da colônia, testes físico e biomecânico e através de cromatografia. Cepas facultativas e aeróbias foram identificadas através de coloração de gram, morfologia da colônia e meio seletivo. O crescimento foi quantificado em meio muito

pesado, pesado, moderado, esparso e muito esparso nas placas de ágar. Dentro dos resultados, no grupo P, 117 cepas de bactérias foram reconhecidas em 68 dentes. Houve uma predominância de Gram-positivo anaeróbio facultativo (69%). A espécie mais comumente encontrada foi *Enterococcus*. Tipos Gram-negativos anaeróbios facultativos como a *Escherichia coli* e fungos como *Candida albicans* também foram encontrados.

No intuito de estudar a flora microbiana encontrada em insucessos endodônticos, Pinheiro *et al.*, em 2003 selecionaram 60 dentes tratados endodonticamente com lesão periapical persistente. Foi realizado, assepsia, isolamento absoluto do dente a ser estudado, desobturação dos canais e em seguida os materiais coletados foram levados para análise microbiana. Nos resultados foram detectados microorganismos dentro de 51 canais radiculares. Na maioria dos casos uma ou duas espécies foram encontradas em cada canal. Das cepas isoladas 57,4% eram anaeróbias facultativas e 83,3% eram microorganismos Gram-positivos. A bactéria mais encontrada foi a *Enterococcus faecalis*. Anaeróbios obrigatórios somaram 42,6% e a bactéria mais frequentemente encontrada foi *Peptostreptococcus*, que foi associado aos sintomas clínicos. Associações significantes foram observadas entre: dor ou história de dor e infecções polimicrobianas ou anaeróbias; sensibilidade á percussão e *Prevotella intermédia* e *P. nigrescens*; fístulas e *Streptococcus* ou *Actinomyces* e infiltrações coronárias e *Streptococcus* ou *Candida*.

Na tentativa de identificar a presença de *Enterococcus faecalis* nas patologias periapicais, Rôças *et al.* (2004) realizaram um estudo molecular. Foram selecionados 80 pacientes onde havia 21 casos de dentes sem tratamento endodôntico com lesão periapical, 10 casos de periodontite apical aguda, 19 casos de abscesso periapical agudo e 30 casos de dentes tratados endodonticamente com lesão periapical crônica. Os dentes foram isolados, desinfetados, realizada abertura coronária, os canais foram explorados até 1mm aquém do ápice e para coleta do material foram inseridos cones de papel durante 1 minuto. Após os procedimentos, os materiais foram armazenados em tubos contendo 1ml com 5% de dimetilsulfato em caldo TSB e coagulados à -20°C. Os dentes tratados endodonticamente foram desobturados e o material armazenado em caldo TSB contendo 5% dimetilsufóxido também congelados. Nos abscessos, após desinfecção da mucosa, realizou-se a aspiração do pus e congelou a coleta. O DNA foi extraído das amostras, e a reação em cadeia da polimerase 16S rDNA foi utilizada para identificar o tipo bacteriano. Nos resultados pode-se observar que a espécie *Enterococcus faecalis* ocorreu em 7 dos 21 canais associados a lesão periapical crônica, um em 10 casos com lesão periapical aguda, um em 19 abscessos periapicais agudos. Na análise estatística foi avaliado que *Enterococcus faecalis* é

significativamente mais associado a casos assintomáticos. A bactéria foi detectada em 20 de 30 casos de infecção periapical persistente associada a dentes tratados endodonticamente. Quando comparada a frequência dessa espécie nos casos de infecção persistente com os casos de infecção primária, a análise estatística demonstrou que o *Enterococcus faecalis* foi fortemente associado com infecções persistentes. Os resultados deste estudo indicaram que *Enterococcus faecalis* é mais associada com os casos de infecção primária assintomática e em insucessos endodônticos.

Ferrari *et al.* (2005) pesquisaram a presença de *Enterococcus*, bactérias entéricas e leveduras em infecções endodônticas primárias, antes e após o preparo do canal radicular. Foram utilizados 25 dentes unirradiculares com necrose pulpar e lesão periapical. As amostras foram coletadas dos canais antes e depois da etapa de instrumentação. Após isolamento dos microrganismos de dentro dos canais, somente os *Enterococcus*, as bactérias entéricas e as leveduras foram identificadas através de um teste bioquímico: API 20 Strep (Bio Minéux AS, Marcy l'Étoile, France) para *Streptococcus* e *Enterococcus*; API 20E (Bio Minéux AS) para bactérias entéricas; API Candida (Bio Minéux AS) e API 20C AUX (Bio Minéux AS) para leveduras. Dentro dos resultados, os microrganismos foram isolados em 92% das amostras antes do preparo apical, sendo que 22% eram *Enterococcus*, bactérias entéricas e leveduras. Após preparo biomecânico, estas espécies não foram detectadas. Após 7 dias sem medicação intracanal 100% dos canais continham microorganismos, sendo que 52% eram as espécies alvo. Entretanto, após utilização da medicação intracanal com pasta PRP – Paramonoclorofenol [PRP (2,0g), Rinossoro® e Polietilenoglicol (400 partes para 100ml)], bactérias entéricas e leveduras não foram detectadas, sendo que somente os *Enterococcus* continuavam presentes. Os autores concluíram que tanto *Enterococcus* quanto bactérias entéricas e leveduras estão presentes em infecções primárias. Bactérias com *E. faecalis* e *E. faecium* foram resistentes a remoção após instrumentação e medicação intracanal.

Sedgley *et al.* (2005) avaliaram a possibilidade dos *Enterococcus faecalis* sobreviverem a longo prazo, sem presença de nutrientes e ‘sepultados’ nos canais radiculares tratados endodonticamente. Foram utilizados 150 dentes hígidos, que foram previamente esterilizados e tratados. Após obturação endodôntica as bactérias foram inoculadas nos espécimes, os canais foram selados com cimento de ionômero de vidro Ketac-Fil Plus® (3M-ESPE, AG, Seefeld, Germany) e os mesmos foram incubados a 37°C nos tempos de 48 horas, 6 e 12 meses. Após período de incubação os dentes foram cortados e adicionados o caldo de cultura Todd-Hervitt both (THB) (Difco, Becton Dickinson and Company, Sparks, Mo, USA), misturados e incubados a 37°C por 72 horas a fim de medir a densidade ótica a 660nm

para avaliar a incidência de *E. faecalis* dentro das condições de crescimento microbiano. Dentro dos resultados, após 6 e 12 meses de incubação todas as obturações apresentaram a bactéria *E. faecalis*, demonstrando que a mesma mantém sua viabilidade por 12 meses sem nutrientes adicionais.

Investigando a coagregação da bactéria *E. faecalis* com microorganismos também encontrados em periodontites apicais, Johnson *et al.* (2006) verificaram as seguintes bactérias: *Peptostreptococcus anaerobius*, *Prevotella oralis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus anginosus*. As bactérias foram ativadas e volumes iguais (0,2ml) de cada suspensão microbiana foram combinados dentro de tubos de polyetileno e misturados durante 10 segundos. Após a mistura, imediatamente foi avaliada a coagregação. As suspensões foram armazenadas em temperatura ambiente e novamente avaliadas no período de 1 hora e 24 horas. Dentro dos resultados foi observado que imediatamente, nos períodos de 1 e 24 horas todos os experimentos contendo *E. faecalis* e *F. nucleatum* coagregaram. Não houve coagregação entre *E. faecalis* e *P. aeruginosus*. Um único modelo de *E. faecalis* coagregou com *P. oralis* na primeira hora de incubação, concluindo no estudo a associação de *E. faecalis* e *F. nucleatum* nas periodontites apicais.

Paradella *et al.* (2007) constataram bibliograficamente que a bactéria *Enterococcus faecalis* compõe um grupo de Gram-positiva que associa-se às infecções endodônticas. Em infecções iniciais com polpa necrótica ela corresponde a uma porcentagem muito pequena, porém frequentemente encontrada em canais obturados, exibindo sinais de periodontite crônica apical. Do ponto de vista microbiológico, os *Enterococcus* apresentam poucas exigências para seu crescimento, sendo capazes de crescer em temperatura de 10 à 45°C, pH 9,6 em 6,5% de solução salina e de sobreviver a 60°C, durante 30 minutos. São microrganismos facultativos e catalase-negativos. É uma bactéria patogênica que tem a capacidade de se aderir aos tecidos, invadí-los, multiplicar-se e sobreviver aos mecanismos de defesa do hospedeiro e de outras bactérias em competição e então produzir dano tecidual. Consegue resistir á medicação intracanal, como o hidróxido de cálcio, pois penetra com profundidade nos túbulos dentinários em direção a polpa, não sendo atingido pelo hidróxido de cálcio. A presença de suas toxinas e bactericinas, como catalisina, explica o porquê de não existir muitas outras espécies em associação nas infecções endodônticas. Apesar do canal radicular, ser pobre em nutrientes, o *E. faecalis* obtém a sua nutrição do ácido hialurônico presente na dentina por meio da degradação por hialuronidase, e, nos casos de selamento inadequados de conduta, a entrada de fluidos potencializa a ação da bactéria. A habilidade de sobreviver a períodos extremos em ambientes nutricionais limitados representa uma

importante característica da patogênese desta espécie em processos patológicos de falhas no tratamento endodôntico.

Métodos mais avançados para identificação de microorganismos permitem a detecção de bactérias específicas nas infecções endodônticas. Beatrice *et al.*, em 2008, através de uma revisão de literatura comprovaram que o método PCR é mais preciso na avaliação das espécies microbianas do sistema de canais radiculares, concluindo que bactérias como *Porphyromonas endodontalis* e *Enterococcus faecalis* estão presentes na maioria dos casos de insucesso dentro dos tratamentos endodônticos.

Utilizando a técnica de PCR, Pirani *et al.* (2008) investigaram a presença de *E. faecalis* identificando a bactéria nas infecções endodônticas primárias e secundárias. O estudo consistiu em 102 pacientes, com idade entre 16 e 73 anos, onde foram selecionados 79 dentes com lesão periapical primária (menor que 3 no índice periapical – PAI) e 23 com lesões periapicais secundárias. Os dentes foram isolados, desinfetados com hipoclorito de sódio 5,25% e realizada a abertura coronária e o acesso ao canal radicular. Para obter os espécimes microbianos, dois ou mais cones de papel foram introduzidos dentro do canal radicular e deixados durante 40 segundos. Em seguida, os cones foram transferidos para tubos estéreis de 1,5ml com 500ul de solução salina tamponada. Os espécimes foram incubados à -20°C e armazenados por um a dois meses antes de serem testados através do PCR. Por meio deste método foi avaliada a presença ou ausência de *E. faecalis*. Nos resultados, de 79 dentes com lesão primária, 7,6% apresentaram presença da bactéria analisada, enquanto que nas lesões periapicais secundárias 39,1% apresentaram *E. faecalis*, confirmando o alto índice desta bactéria nas lesões secundárias.

No intuito de avaliar a presença de microorganismos em dentes tratados endodonticamente com lesão periapical associada, Schirrmeister *et al.* (2009) selecionaram 18 pacientes, entre 25 e 75 anos, encaminhados para retratamento endodôntico. Os dentes foram colocados dentro das condições sépticas, isolados, abertos, desobturados, realizada a odontometria, irrigados com solução salina estéril à 0,9% e, por conseguinte, os fluidos existentes foram coletados dentro do canal com pontas de papel absorvente. As bactérias foram identificadas através de análises de características biológicas e morfológicas e através da sequência de genes 16S rRNA. Foram detectados microorganismos em 10 dos 18 dentes. A maioria das espécies positivas revelam cultura mista de 2 à 8 espécies. Em dois dentes *E. faecalis* foi a única espécie detectada. Pela primeira vez, a bactéria *Vagococcus fluvialis* foi encontrada nos canais radiculares. As cepas prevalentes foram *Selobacterium meorei* e

Fusobactérium nucleatum, sendo que a presença destas duas associadas aparece em 5 dos 7 casos.

2.2 Citotoxicidade dos cimentos endodônticos

A liberação de formaldeído em cimentos endodônticos foi avaliada por Leonardo *et al.* (1999). Os cimentos antigos AH 26[®] (DeTrey Frères AS, Zurich, Switzerland) e Endomethasone[®] (Specialités-Septodont, Paris, France) e dois cimentos mais recentes AH Plus[®] (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Germany) e Top Seal[®] (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Switzerland) foram analisados através de infravermelho e espectroscopia eletrônica. Os cimentos foram espatulados e armazenados em temperatura ambiente por 72 horas. A leitura com ultravioleta e espectro visível foi obtida através do uso de espectrofotômetro (Hitachi model U-3501). A quantidade de 0,05g de cada cimento foi inserida em 50ml de água deionizada, agitado por 30 minutos e filtrada com papel filtro. Todos os espectros foram obtidos em temperatura ambiente utilizando 1-cm “quartos de célula”. A existência do comprimento de onda entre 242 e 288nm foi usada para indicar a presença de formaldeído. Cada amostra foi analisada e os gráficos obtidos. As análises mostraram que os cimentos AH 26[®] e o Endomethasone[®] liberaram formaldeído. Entretanto, o TopSeal[®] e o AH Plus[®] possuem a mesma formulação química e liberaram formaldeído em concentração mínima.

Eldeniz *et al.* (2007) testaram *in vitro* o nível de pH e a liberação de íons cálcio de três cimentos endodônticos à base de hidróxido de cálcio (Sealapex[®], Apexit[®] e Acroseal[®]). Os materiais foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes e colocados em tubos de 1cm de extensão e 4mm de diâmetro. Os tubos foram imersos em um balão de vidro com 10ml de água bidestilada, selado e armazenado à 37°C. O pH do meio foi medido nos intervalos de 14, 96 horas, 7, 15 e 28 dias através de um pHmetro e o cálcio foi avaliado através de espectrofotometria, observando a diferença de coloração das substâncias quando colocadas em contato com reagentes. Os dados foram analisados utilizando teste estatístico a fim de comparar os materiais em cada período. Dentro dos resultados, o Sealapex[®] apresentou alto pH e liberação significativa de amostra de cálcio maior que os outros dois materiais durante todos os períodos. O Apexit[®] apresentou maior liberação de cálcio que o Acroseal[®] durante o período dos últimos 15 dias. Não houve diferenças significativas entre o pH do Apexit[®] e do Acroseal[®]. Os autores concluíram que o Acroseal[®] apresentou menor liberação de cálcio quando comparado aos outros dois cimentos.

Através de uma meta-análise, Estrela *et al.* (2007) avaliaram a influência do cimento obturador no sucesso do tratamento endodôntico. Os autores realizaram uma busca de artigos de 1966 à 2008 no Medline, totalizando 456 artigos. Desses, somente 1 (hum) satisfaz os critérios de inclusão propostos pelos autores. Através deste levantamento concluíram que os cimentos à base de hidróxido de cálcio apresentaram melhores desempenhos, com elevada taxa de sucesso no processo de reparo clínico-radiográfico, devido a sua baixa citotoxicidade nos tecidos periapicais.

Ainda avaliando a citotoxicidade dos cimentos, Senne *et al.* (2009) estudaram *in vitro* os cimentos Endofill[®], Sealer 26[®] e AH Plus[®] sob a linhagem de células VERO (C1008 – CRL – 1586, ATCC, Rockville, MD, USA). A citotoxicidade foi avaliada através de corantes panótico rápido LB (labaclin) e fluoroquench AO (laranja de acridive)/EB (brometo de etídio). O uso dos corantes serviu para avaliar as alterações morfológicas nas células nos períodos de 24, 48 e 72 horas, após o contato com os cimentos. A aferição das amostras foi processada pelo software Image Pre Plus (Média Agbernetic) e submetida ao teste estatístico T de student. Todos os cimentos testados foram citotóxicos em algum momento, entretanto o cimento Endofill[®] foi altamente citotóxico. O Sealer 26[®] causou diminuição na densidade e morfologia celular e o AH Plus[®] provou ser menos tóxico, logo após a manipulação, e leve reação tóxica quando foi testado após o endurecimento.

2.3 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana é uma importante propriedade dentro das ideais de um cimento endodôntico. Orstavik (1981) avaliou a atividade antimicrobiana de 24 materiais (cimentos obturadores, cimentos e pastas) através de vários testes. Dentre os materiais estudados estavam: AH 26[®] (DeTrey AG, Zurich), Diaket (ESPE, Seefeld, PRG), Endomethasone[®] (Septodent, Paris), Kerr Pulp Canal Sealer[®] (Kerr, Romulus, MI), TubliSeal[®] (Kerr, Romulus, MI), Óxido de Zinco e Eugenol. Para os testes foi utilizada saliva humana constituinte em sua composição de *Streptococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Para o teste de difusão em gel, 1ml de saliva foi misturado com 19ml de caldo TSB (Trypticase Soy Both) em ágar mantido em temperatura de 50°C. Foram realizados 7 poços de 5mm de diâmetro, em cada placa, e os materiais foram inseridos, incubados por 24 horas, a 37°C, e os halos de inibição microbiana foram mensurados. Os materiais também foram armazenados e em seguida foi realizado o teste da atividade antimicrobiana. Para isto, 0,1ml de saliva foi diluído em 1/50 de água destilada e semeados

em placas com ágar sangue, incubadas a 37°C, por 24 horas. Após o tempo, o material foi triturado e misturado com cimento. As porções foram colocadas nos poços e os halos de inibição foram medidos. O autor também avaliou se a atividade antimicrobiana era bactericida ou bacteriostática removendo 1mm³ do ágar sangue das zonas de inibição dos materiais, adicionando os mesmos em tubos contendo 5ml de TSB, incubando a 37°C, durante 7 dias, sendo que se no tubo não houvesse crescimento microbiano era considerado bactericida e quando o mesmo era positivo, era considerado bacteriostático. Por último, foi realizado um teste de eluição dos componentes antibacterianos de alguns materiais, através de 0,2ml dos cimentos Endomethasone e Óxido de Zinco e Eugenol misturando os mesmos com 20ml de solução salina e incubado a 37°C, durante 0,1,3,5,28 e 71 dias. Após, os materiais foram lavados e secos com papel absorvente e colocados em contato com as placas de ágar sangue contaminadas com saliva, avaliando os halos de inibição. Dentro dos resultados, no teste de difusão em gel, todos os materiais tiveram alguma atividade antimicrobiana. Após 24 horas de armazenamento, os materiais testados também apresentaram halos de inibição, sendo que o Endomethasone foi o que apresentou melhor resposta. No teste de avaliação da atividade bacteriostática ou bactericida, na maioria dos casos a ação antimicrobiana dos cimentos frescos era bactericida. No teste de eluição dos componentes antimicrobianos, o Endomethasone mostrou maior atividade antimicrobiana, inicialmente. Entretanto, a atividade foi diminuindo com o passar dos dias, sendo que, com 71 dias nenhuma atividade antimicrobiana foi observada pelo cimento Endomethasone[®]. Dentro de todos os testes foi observado que alguns materiais foram mais ativos contra a Gram-negativa *P. aeruginosa*, enquanto, que outros demonstraram maior atividade contra os Gram-positivos *S. aureus* e *S. faecium*. Os materiais que continham paraformaldeído em sua composição mostraram melhor atividade antimicrobiana em todos os testes.

A atividade antimicrobiana *in vitro* também foi avaliada por Siqueira Jr.; Gonçalves, em 1996. Quatro cimentos endodônticos Fill Canal[®], Sealapex[®], Sealer 26[®] e Apexit[®], além de uma medicação intracanal de hidróxido de cálcio com soro fisiológico foram testados. Foram realizadas perfurações nas placas de petri contendo ágar, previamente contaminadas com os microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces israeli*, *Actinomyces neislundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Propionibacterium acnes* e *Wolinella recta*. Posteriormente, os cimentos foram inseridos nos poços e as placas prontas foram incubadas na estufa durante 7 dias. Os halos de inibição foram medidos e nos resultados foi avaliado que o Fill Canal[®] apresentou grandes áreas de inibição para todos os m.o. e o Sealer 26[®] não foi efetivo contra *P. endodontalis* e *P.*

gingivalis. Não houve grandes diferenças entre as medidas dos halos do cimento Sealapex® e da MIC à base de hidróxido de cálcio. O Apexit® foi inefetivo contra todas as bactérias, concluindo que os cimentos Fill Canal® e o Sealer 26® apresentaram melhores resultados quando comparados com os outros materiais.

Abdulkader *et al.* (1996), avaliaram a susceptibilidade de três bactérias diante de cinco cimentos endodônticos. Os cimentos utilizados foram: Apexit® (Vinadent, Liechtenstein); Sealapex®; Tubliseal® (Kerr, Rumulus, MI, USA); Roth Root Canal Cement® (Root International, Chicago, IL, USA) (Elite grade) e Ketac Endo® (ESPE, Seefeld, Germany), testados frente as bactérias: *Porphyromonas gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea* e *Peptostreptococcus micros*. As placas de ágar foram preparadas, contaminadas e realizados poços de 7mm de diâmetro. Os cimentos foram espatulados e colocados frescos em contato com o ágar. As placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas e em seguida foram realizadas 6 (seis) medidas de cada zona de inibição microbiana. Foram realizados testes estatísticos e comparados. O cimento Roth® apresentou melhor atividade antimicrobiana seguido dos materiais Ketac-Endo®, Tubliseal®, Apexit® e Sealapex®.

Vários métodos *in vitro* são utilizados para avaliar a capacidade antimicrobiana dos materiais endodônticos. Weiss *et al.* (1996) estudaram as propriedades de dois cimentos, avaliando a técnica de contato direto, comparando os resultados obtidos com o teste de difusão em ágar. Os cimentos utilizados foram o AH 26® (De Trey Division Dentsply, Weybridge, England) e Endoflas FS® (Sanlor Labs, Cali, Columbia). Para o experimento utilizou-se a bactéria *Enterococcus faecalis*. Os cimentos foram previamente espatulados, inseridos na parede lateral dos poços e aproximadamente 20 minutos depois, 10µl de suspensão bacteriana foi colocada em contato com os cimentos e, posteriormente, os ensaios foram armazenados durante 1 hora, a 37°C. Em seguida, 245µl de caldo BHI foi inserido nas células e formado o Grupo A (cimento+bactéria+caldo). Após, misturados por 2 minutos, 15µl do grupo A foram transferidos para poços adjacentes. A microplaca foi encubada a 37°C no Termomax microplate reader, e a densidade óptica em cada poço foi avaliada automaticamente por 18 horas. O mesmo experimento foi realizado com o material 24 horas após espatulado. Para o teste de difusão em ágar foram confeccionados poços com 5mm de diâmetro e nas placas previamente contaminadas com *Enterococcus faecalis*, os materiais espatulados foram inseridos. As placas foram incubadas a 37°C em estufa durante 24 horas e, posteriormente, medidos os halos de inibição bacteriana. Nos resultados do contato direto o Endoflas® foi significativamente o mais potente inibidor de crescimento bacteriano comparado com o AH 26®. Entretanto, na técnica de difusão em ágar o AH26® foi capaz de

produzir um halo de inibição bem maior do que o Endoflas[®]. Os autores concluíram que o contato direto é mais adequado para ensaio de substâncias sólidas.

Ainda utilizando a comparação de duas técnicas antimicrobianas, Shalhav *et al.* (1997) avaliaram a atividade antimicrobiana do cimento endodôntico a base de ionômero de vidro, Ketac Endo[®], comparando-o ao cimento à base de óxido de zinco e eugenol, Roth[®]. A capacidade antimicrobiana dos cimentos frente ao *Enterococcus faecalis* foi avaliada através das técnicas de difusão em ágar e contato direto. Para o contato direto os cimentos foram espatulados e colocados na parede lateral dos poços das microplacas. A suspensão bacteriana foi colocada sobre as amostras testadas 20 minutos, 24 horas ou 7 (sete) dias após a mistura. Foram acrescentados os meios frescos e, em seguida, foi medido o crescimento bacteriano em cada poço, a cada 30 minutos durante 15 horas. Para a técnica de difusão em ágar foram confeccionados poços, inseridos os cimentos e medidos os halos de inibição. Os resultados mostraram que na técnica da difusão em ágar o halo provocado pelo cimento Ketac Endo[®] foi praticamente o dobro do tamanho quando comparado com o resultante de cimento Roth[®] ($p < 0,05$). Já na técnica de contato direto, imediatamente após espatulação, ambos os cimentos inibiram o crescimento bacteriano. Com 24 horas e 7 (sete) dias somente o cimento Roth[®] inibiu completamente o crescimento bacteriano.

Fuss *et al.* (1997) investigaram a atividade antimicrobiana de cimentos à base de hidróxido de cálcio: CRCS[®] (Hygenic, Akron, OH, USA) e Sealapex[®] e o cimento a base de óxido de zinco e eugenol Roth Root Canal Cement[®] (Roth International Ltd, Chicago, IL, USA). Foi utilizado o teste de contato direto em três diferentes condições: amostras utilizadas dentro de 20 minutos, amostras incubadas a 37°C durante 24 e 48 horas e envelhecidas em solução salina tamponada com fosfato, durante 5 dias, a 37°C. A bactéria *Enterococcus faecalis* foi utilizada no experimento. O crescimento microbiano e padronização foram realizados através do espectrofotômetro (Thermomax, Molecular Devices Corporation, Menlo Oaks Corporate Centre, Menlo Park, CA, USA). Em seguida, 10µl de suspensão bacteriana foi adicionada aos cimentos nos tempos fresco, 24 horas e 7 dias após espatulação. As amostras foram incubadas por 1 hora, a 37°C, e inoculados 245 µl de caldo BHI (grupo A). Posteriormente, 15µl de inóculo foi transferido para outra célula contendo 215µl de meio fresco (grupo B). A placa foi incubada a 37°C no Thermomax microplate reader e a cada 30 minutos, durante 15 horas, foram realizadas as leituras de crescimento microbiano. Nos resultados, no grupo A, em meio fresco e 24 horas, todos os materiais demonstraram completa inibição de crescimento microbiano. Com 7 (sete) dias, somente o Roth[®] e o Sealapex[®] demonstraram inibição de crescimento. No grupo B, no cimento fresco os materiais CRCS e

Roth exibiram inibição de crescimento e com 24 horas, somente o Roth[®] inibiu a atividade. Dentro de 7 (sete) dias, somente o Sealapex[®] mostrou inibição bacteriana, concluíram que cimentos à base de óxido de zinco possuem maior inibição após espatulados, enquanto cimentos à base de hidróxido de cálcio possuem atividade tardia pela liberação de íons hidroxila a longo prazo.

Kaplan *et al.* (1999) pesquisaram o efeito antimicrobiano de seis cimentos endodôntios em contato com quatro tipos de microrganismos nos períodos de 2, 20 e 40 dias após a obturação. Os cimentos estudados foram Apexit[®] (Vivadent, Liechtenstein), Endion[®] (Voco, Cuchaven, Germany), AH 26[®] (Dentsply De Trey, Konstanz, Germany), AH Plus[®] (Dentsply De Trey), Procosol[®] (Star Denta Lancaster, PA, USA) e Ketac-Endo[®] (Espe, Seefeld, Germany). As bactérias utilizadas foram *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Actinomyces israelii*. Foram confeccionados poços em placas de ágar esterilizadas e os cimentos foram preparados e inseridos nos poços. As placas foram armazenadas a 37°C por 24 horas. Após o período de endurecimento dos materiais, os mesmos foram retirados do ágar, imersos em 4ml de meio de cultura e divididos em três grupos. No grupo 1, os materiais foram armazenado por 2 dias a 37°C, já as amostras 2 e 3 foram armazenadas a 4°C por 20 e 40 dias, respectivamente. Para realizar o experimento, a suspensão bacteriana foi preparadas através a escala de Mc Farland chegando a 9×10^8 germes/ml. Foi inoculada 0,5ml da suspensão no meio de cultura com os cimentos e realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) nos tempos preconizados. Nos resultados, os cimentos Apexit[®], Endion[®] e AH Plus[®] produziram ligeira inibição do *S. mutans* até 20 dias e frente a *A. israelii* durante todo o período. Nenhuma atividade antimicrobiana foi encontrada frente a *C. albicans* e *S. aureus*. O cimento Ketac-Endo[®] produziu efeito antimicrobiano somente no *A. israelii* entre 2 e 40 dias. AH 26[®] e Procosol[®] mostraram atividade antimicrobiana até 40 dias contra *C. albicans*, de 20 e 40 dias frente *S. mutans* e *S. aureus* e nenhuma inibição contra *A. israelii*. Os autores concluíram que os cimentos avaliados mostraram diferentes efeitos inibitórios dependendo do tempo e do tipo de microorganismo. Entretanto, os cimentos contendo eugenol e formaldeído apresentaram melhor efeito frente às cepas nos intervalos testados.

Avaliando a ação antimicrobiana e o grau de escoamento dos cimentos Kerr Pulp Canal Sealer[®], Fill Canal[®], ThermaSeal[®], Sealer 26[®], AH Plus[®] e Sealer Plus[®], Siqueira Jr. *et al.* (2000) realizaram o teste de difusão em ágar dos cimentos contra as bactérias *Prevotella nigrexens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus baris*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacilus casei*, *Escherichia coli* e *Cândida albicans*.

Foram preparadas placas de petri com ágar sólido, contaminadas e confeccionados poços onde foram colocados os cimentos previamente espatulados. As culturas anaeróbicas foram armazenadas em estufa bacteriológica durante 5 dias e os outros foram armazenados a 37°C por 24 a 48 horas. As zonas de inibição foram medidas e os resultados avaliados em duplicata. Para o teste de escoamento foram utilizados 2 placas de vidro com peso de 500g, entre elas colocados os cimentos espatulados (0,5ml de cada cimento) e avaliados durante 1 minuto. O diâmetro formado pelo escoamento do cimento foi mensurado 3 vezes e realizado o cálculo. Em relação à atividade antimicrobiana, todos os cimentos demonstraram ação contra os microrganismos. Não houve diferenças significativas entre os cimentos testados ($p>0,05$). Todos os cimentos demonstraram escoamento (dentro das condições testadas), porém, a análise estatística revelou que os cimentos AH Plus® e Kerr Pulp Canal Sealer® demonstraram melhores valores em relação ao escoamento obtendo diferenças estatísticas significativas em comparação com os outros cimentos.

Testando a atividade antimicrobiana através do teste de difusão em ágar, Lai *et al.* (2001) estudaram quatro cimentos endodônticos: Sealapex®; AH 26® (Dentsply De Try, Konstanz, Germany); AH Plus® (Dentsply De Try, Konstanz, Germany) e N2® (Indrag Agsa, Switzerland), contra bactérias comumente encontradas nas infecções endodônticas, sendo estas: *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. sanguis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *P. endodontalis*. Para o teste, foram confeccionados poços de 6mm de diâmetro e 4mm de profundidade nas placas de ágar previamente preparadas e contaminadas pelas bactérias citadas acima. Em seguida, os cimentos foram inseridos nas células e após 24 horas os ensaios foram avaliados quanto ao tamanho do halo de inibição formado. Nos resultados, os cimentos N2®, AH 26® e AH Plus® demonstraram zonas de inibição contra todas as bactérias testadas. Não houve diferença significativa entre o N2® e o AH 26® contra *S. mutans* e *S. aureus*. Sealapex® demonstrou baixa atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. Em adição, o mesmo foi inefetivo contra *S. sanguis*. Os dados demonstraram que em geral o N2® foi o cimento que apresentou melhor atividade antimicrobiana seguido pelos cimentos AH 26®, AH Plus® e Sealapex®, concluindo que os cimentos contendo formaldeído e eugenol apresentaram melhor ação antimicrobiana.

Cruz *et al.*, em 2001, avaliaram *in vitro* a capacidade antimicrobiana dos cimentos de obturação Rickert®, N-Rickert® e Sealer 26® frente às seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Candida albicans* e microrganismos coletados do sulco gengival de pacientes com periodontite crônica. Foram realizados os poços em placas de ágar, inseridas as bactérias e posteriormente os cimentos foram adicionados aos

ensaios. As placas com os materiais foram colocadas em estufa bacteriológica a 37°C e os halos de inibição foram medidos com um paquímetro. Os resultados foram avaliados com o teste T que demonstraram maior halo de inibição do cimento N-Rickert® frente ao *Staphylococcus aureus*. Em relação aos microorganismos *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* e *Candida Albicans* os maiores halos foram respectivamente para os cimentos N-Rickert®, Rickert® e N-Rickert®. O cimento Sealer 26® apresentou maiores halos frente as cepas coletadas no sulco gengival, concluindo que todos os cimentos apresentaram atividade antimicrobiana frente a todas as bactérias testadas.

Comparando o efeito antimicrobiano dos materiais Roth 811®, Kerr EWT®, Sealapex® e AH Plus® frente a *Enterococcus faecalis*, Mickel *et al.* (2003) testaram a eficácia através do método de difusão em ágar. Para o experimento os cimentos foram preparados e inseridos em discos de papel. Os discos foram colocados em contato com as bactérias e levados à estufa à 37°C sendo avaliados após 48 horas. As zonas de inibição foram mensuradas após 24 e 48 horas, nos resultados os cimentos Roth 811®, Kerr EWT® e Sealapex® evidenciaram zonas de inibição. O cimento AH Plus® não demonstrou atividade antimicrobiana frente ao microrganismo testado, o cimento Roth 811® demonstrou maior halo de inibição (1,1mm) seguido pelo Sealapex® (0,8mm) e Kerr EWT® (0,5mm), concluíram que os cimentos a base de óxido de zinco e eugenol possuem efeito antimicrobiano maior que os demais.

Através de dois testes sobre atividade antimicrobiana, Çobankara *et al.* (2004) analisaram *in vitro* cinco cimentos endodônticos (Roeko seal®, Ketac-endo®, AH Plus®, Sealapex®, Sultan®) frente aos *Enterococcus faecalis* por meio dos testes de difusão em ágar e de contato direto. Para o teste de contato direto, os cimentos foram espatulados e colocados em contato direto com uma suspensão de 10µl de bactérias mantida por 1 hora em estufa à 37°C. Após esse período, o crescimento bacteriano foi mensurado com um espectrofotômetro a cada 30 minutos, durante 19 horas, utilizando o aparelho Anthos Labtec HT2(Instruments GmbH, Àustria). Para o teste de difusão em ágar, foi utilizado 200µl de suspensão bacteriana nas placas e, em seguida, foram confeccionados orifícios. Os cimentos foram espatulados e inseridos nos poços. Após um período de incubação a 37°C, durante 24 horas, as zonas de inibição foram medidas. Para o contato direto, os cimentos Ketac-Endo®, Sultan® e AH Plus® apresentaram resultados semelhantes. Esses cimentos obtiveram maior efeito antimicrobiano quando comparados ao Sealapex® e Roeko Seal®. De acordo com o teste de difusão em ágar, o Roeko Seal® não demonstrou atividade antimicrobiana, não houve diferenças significativas entre o AH Plus®, Sealapex® e o Sultan® (p>0,05). Ketac Endo® demonstrou menor atividade

antimicrobiana do que os outros cimentos ($p < 0,05$), o tempo não teve efeito direto na atividade antimicrobiana dos cimentos ($p > 0,05$) e o efeito antimicrobiano variou de acordo com os testes utilizados. Os autores concluem que a técnica, tempo e substâncias contidas nos materiais testados podem interferir nos resultados dos estudos microbiológicos.

Cinco cimentos endodônticos Endofill[®], Endomethasone[®], Endomethasone N[®], Sealer 26[®], e AH Plus[®] foram testados contra os microrganismos: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces naeslundii*, avaliando a atividade antimicrobiana dos mesmos. Os materiais foram avaliados imediatamente, 24h, 48h e 7 dias após a manipulação através métodos contato direto e difusão em ágar. No contato direto os ensaios (BHI+inoculo+cimento; BHI+inoculo; BHI+cimento) foram testados de hora em hora, durante 11 horas, com auxílio de um espectofotômetro. Alíquotas contendo 10µl de cada sistema eram coletadas de hora em hora e inoculados em 5% sangue + placas de ágar BHI, onde eram incubadas por 18-24 horas a fim de avaliar o crescimento microbiano. No método de difusão em ágar as placas foram mantidas por 2 horas em local com temperatura suficiente para difundir os agentes no meio, e depois incubadas a 37°C no período de aeróbios 24 a 48 horas. As zonas de inibição de crescimento microbiano foram medidas e a análise estatística realizada. No teste de contato direto, imediatamente após a manipulação, Endofill[®], Endomethasone[®] e Endomethasone N[®] apresentaram a maior atividade antimicrobiana, sem diferenças significativas entre eles. Sendo que o Endomethasone N[®] apresentou-se mais efetivo para *A. naeslundii*, *S. sanguis* e *C. albicans*, o Endofill[®] para *S. aureus*, *S. sanguis*, e o Endomethasone[®] para *E. faecalis* e *C. albicans*. Para o microrganismo *S. sanguis*, o Endofill[®] e Endomethasone N[®] mostraram a mesma efetividade, assim como o Endomethasone[®] e Endomethasone N[®] para *C. albicans*. Os microrganismos mais susceptíveis para todos os cimentos testados foram *S. sanguis* e *S. aureus*. *Enterococcus faecalis* foi o microrganismo mais resistente contra todos os cimentos testados, sendo mais afetado pelo Endomethasone[®]. No teste de difusão em ágar, os maiores halos de inibição foram respectivamente Endofill[®], Endomethasone[®] e Endomethasone N[®]. Nenhum dos cimentos testados inibiu totalmente o crescimento microbiano e a atividade antimicrobiana dos mesmos diminuíram com o tempo (GOMES *et al.*, 2004).

A atividade antimicrobiana dos cimentos Sealapex[®], Apexit[®] (Vivadent, Schaan Liechtenstein), Grossman's sealer[®] (by prescription, NIOM laboratory, Haslum, Norway), AH Plus[®] e MCS Canal Sealer[®] (Lone Star Technologies, Westport, CT, USA) foi avaliada frente a bactéria *Enterococcus faecalis*. Após realizada padronização das bactérias, discos de filtro de papel (Whatman nº 3; 4mm de diâmetro) foram imersos na suspensão bacteriana por

10 minutos e, em seguida, os mesmos foram removidos e colocados em uma superfície com poços teflon com 5mm de diâmetro e 3mm de profundidade. Aproximadamente 15µl de cimento fresco espatulado foi inserido nos discos contaminados e, posteriormente, incubados durante 30 minutos, a 37°C. Em seguida à exposição, os discos foram retirados do contato com cimento e foram transferidos para vias contendo 2ml de solução salina. Após diluições, duas gotas de 25µl foram inseridas em placas de ágar. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas e as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas. Nos resultados foi avaliado que o número de bactérias reduziu significativamente nos cimentos MCS[®], AH Plus[®] e cimento de Grossman[®] (KAYAOGLU *et al.*, 2005).

Eldeniz *et al.* (2006-a) avaliaram a atividade antimicrobiana de materiais retro-obturadores através da técnica de contato direto. Foram avaliados Cavex Avalloy[®] (Cavex, Haarlem, Holland), Clearfil AP-X[®] (Kuraray, Okayama, Japan), Dyract[®] (Dentsply, DeTrey, Konstanz, Germany), Geristore[®] (Den-Mat, Santa Maria, CA), IRM[®] (Caulk Dentsply, Milford, DE), ProRoot MTA[®] (Dentsply, Tulsa Dental, Germany), Protect Bond[®] (Kuraray, Okayama, Japan), SE Bond[®] (Kuraray, Okayama, Japan) e Super Bond C&B[®] (Sun Medical, Japan) frente as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os cimentos foram colocados em microplacas e 10µl de suspensão bacteriana foi adicionado. Após incubação por 1 hora a 37°C, 245 µl de caldo BHI foi inserido e misturado, formando o Grupo A. Desta solução foi retirada 15 µl de suspensão e inoculada em outro poço juntamente com 215 µl de caldo BHI, formando o grupo B. O crescimento microbiano foi mensurado através do espectrofotômetro (Anthos Labtec HT 2, Elisa Reader, Anthos Labtec Inst., Salzburg, Áustria), durante 15 horas realizando leituras a cada 30 minutos. Nos resultados do grupo A no tempo imediatamente após espatulação, não houve diferença estatística significativa frente ao *Enterococcus faecalis*. Os materiais SE Bond[®], Protect Bond[®] e Geristore[®], demonstraram melhor atividade frente ao *S. aureus*. Contra *P. aeruginosa* os materiais com melhores resultados foram IRM[®], ProRoot MTA[®] e amalgama. Nos experimentos após três dias de incubação dos cimentos, o IRM[®] e o ProRoot MTA[®] foram os que apresentaram melhor atividade contra *Enterococcus faecalis*. Contra a bactéria *S. aureus*, os melhores materiais foram IRM[®] e Geristore[®] sendo que somente o IRM[®] e o ProRoot[®] tiveram completa inibição microbiana contra *P. aeruginosa*. Os autores concluíram que houve uma grande variação nas atividades antimicrobianas entre os materiais testados.

Em outro trabalho avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana de seis cimentos endodônticos: EndoRez[®], AH 26[®], Diaket[®], Sultan[®], Apexit[®] e RoekoSeal[®] frente as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foram

realizados dois testes: o de difusão em ágar e de contato direto. Para o teste de difusão, foram realizados poços nas placas com ágar previamente contaminadas. Os cimentos foram espatulados e inseridos 0,1ml do material em cada poço. As placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica e as leituras dos halos de inibição foram realizados com régua milimetrada após 24, 48 horas, 7 e 10 dias. O teste do contato direto foi realizado utilizando microplacas. Os cimentos foram espatulados, inseridos nas células, e após 20 minutos a suspensão bacteriana foi colocada em contato com o cimento. Em seguida, foi adicionado o caldo BHI nas células e misturados por 2 minutos. O crescimento bacteriano foi monitorado a cada hora utilizando espectrofotômetro (Elisa Reader, Anthos Labtec HT 2, Salzbrerg, áustria). Nos resultados do teste de difusão em ágar, nenhuma zona de inibição foi avaliada nos cimentos EndoRez[®], Apexit[®] e RoekoSeal[®]. O cimento Diaket[®] demonstrou larga zona de inibição contra *E. faecalis* e *P. aeruginosa* seguidos do AH 26[®] e do Sultan[®]. No teste de contato direto nos materiais frescos, o cimento AH 26[®] demonstrou completa inibição frente ao *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Os experimentos com 24 horas de armazenamento exibiram completa inibição de crescimento de *E. faecalis* nas primeiras 10 horas e dos *S. aureus* e *P. aeruginosa* nas 13 horas, concluindo que os cimentos AH 26[®], Diaket[®] e Sultan[®] demonstraram maior potencial inibidor antimicrobiano do que os outros materiais testados (ELDENIZ *et al.*, 2006-b).

Autores avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana de 6 cimentos endodônticos (Epiphany[®], AH 26[®], Sealapex[®], Diaket[®], Endomethasone[®] e o Sultan[®]) através do teste de difusão em ágar frente a *Enterococcus faecalis*. Após a inserção do microrganismo nas placas, foram confeccionados poços de 5mm de diâmetro. Os cimentos foram espatulados, inseridos nos poços e avaliados os halos de inibição bacteriana com 24, 48 e 72 horas. Os resultados foram avaliados com testes de ANOVA e Tukey e demonstraram que os cimentos com maior atividade antimicrobiana foram o Endomethasone[®] e o Sultan[®]. Os materiais Sealapex[®] e Diaket[®] demonstraram atividade antimicrobiana razoável contra *E. faecalis*, enquanto que os cimentos Epiphany[®] e AH 26[®] demonstraram ser pouco efetivos contra a bactéria. Os resultados após 48 e 72 horas demonstraram que a efetividade dos cimentos decresce ligeiramente com o tempo. Com os dados relatados neste experimento, foi concluído que o cimento Epiphany[®] é inferior em termos de atividade antimicrobiana quando comparado com 4 dos 5 cimentos testados. O cimento Epiphany[®] tem efeito antimicrobiano igual ou pouco melhor que o AH 26[®], não oferecendo vantagens antimicrobianas melhores que os outros cimentos (BODRUMLU; SEMIZ, 2006).

Hoelscher *et al.* (2006) realizaram um estudo *in vitro* avaliando os efeitos antimicrobianos de cinco antibióticos (amoxicilina, penicilina, clindamicina, metronidazol e doxacicilina) quando adicionados ao cimento endodôntico Kerr Pulp Canal Sealer EWT[®] contra a *Enterococcus faecalis*. Trinta placas de ágar foram preparadas e inoculadas com *E. faecalis*. Discos de papel estéreis contendo a combinação cimento-antibiótico foram colocados em contato com o ágar e três discos, com cimento Kerr[®], e três discos, em branco (vazios), foram utilizados para controle positivo e negativo. As placas foram incubadas a 37°C, durante 48 horas e, em seguida, as zonas de inibição foram medidas e os resultados revelaram que as combinações cimento-antibiótico contendo amoxicilina, penicilina, clindamicina e doxacicilina obtiveram diferença significativa ($p < 0,001$), quando comparadas com as amostras que continham apenas o cimento Kerr EWT[®]. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a combinação cimento-metronidazol e somente o cimento Kerr EWT[®]. Concluíram que o uso de alguns antibióticos adicionados ao cimento Kerr[®] podem potencializar a ação antimicrobiana, porém, mais estudos devem ser realizados no intuito de avaliar até onde os antibióticos não vão influenciar em outras propriedades do cimento, tais como: capacidade seladora, tempo de presa e de trabalho, substantividade, grau de escoamento, entre outras.

A atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos AH plus[®], cimento Portland[®], N-rickert[®], Pro Root MTA[®] e Sealapex[®] foi avaliada na presença dos m.o. *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Placas de petri contendo ágar foram contaminadas com as bactérias e em seguida orifícios foram realizados para a colocação dos cimentos. Após a inserção dos materiais as placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas e após o tempo de incubação, os halos de inibição formados ao redor dos cimentos foram medidos. Foi realizado o teste não paramétrico e os resultados estatísticos revelaram diferenças significantes (5%) quando comparados os cimentos AH plus[®], MTA[®], Portland[®] e Sealapex[®]. Nenhuma diferença significativa foi encontrada quando comparado o AH plus[®] com o cimento N-Rickert[®]. Quando comparado o N-Rickert[®] com MTA[®], Portland[®] e Sealapex[®] a diferença significativa foi de 1%. De acordo com a metodologia deste experimento os autores concluíram que nenhum material testado apresentou atividade antimicrobiana contra o *E. faecalis*. Os cimentos AH plus[®] e N-Rickert[®] apresentaram atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*. Nenhuma atividade foi observada com MTA[®], Sealapex[®] e cimento Portland[®] (MIYAGAKI *et al.*, 2006).

Tanomaru-Filho *et al.*, em 2007 avaliaram a atividade antimicrobiana do Sealer 26[®], Sealapex[®] + Óxido de Zinco, Óxido de Zinco e Eugenol, Cimento Portland[®] cinza, Cimento

Portland[®] branco, MTA[®] cinza, MTA[®] branco, ProRoot MTA[®] cinza, quando em contato com os microrganismos *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* através do método de difusão em ágar. As placas foram inoculadas com os microrganismos, e os orifícios foram feitos sob o ágar já enrijecido. Os materiais foram manipulados e acomodados imediatamente após as perfurações. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 2 horas, para pré-difusão dos materiais, e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida uma camada de 5ml de meio preparado com 1% de ágar e 0,05% de triphenyltetrazolium chloride foi adicionado para otimização dos resultados. Depois da solidificação as placas foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Esta técnica diferenciada permite visualizar as zonas de crescimento e de inibição microbiana. Dentre os resultados todas as espécies microbianas usadas no teste foram inibidas pelos materiais avaliados. Os testes estatísticos demonstraram que o Sealer 26[®], Sealapex[®] + Óxido de Zinco e cimento de Óxido de Zinco e Eugenol apresentaram halos de inibição microbiana maiores que os cimentos baseados no MTA[®] e cimento Portland[®] (P<0,05).

Kopper *et al.*, em 2007, avaliaram, *in vitro*, a atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos AH plus[®], Endofill[®] e Sealer 26[®], frente culturas com os microrganismos *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida Albicans*. Foram confeccionados 2 discos de papel filtro de 5mm de diâmetro para cada cimento e colocados nas placas de petri contaminadas previamente com cada microorganismo. Os cimentos foram inseridos nos discos, colocados em contato direto com as bactérias e levados a estufa bacteriológica durante 48 horas e os halos de inibição provocados pelos cimentos foram medidos com um paquímetro digital. Os resultados demonstraram que para o *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* a ordem crescente de diâmetro dos halos de inibição foram AH plus[®], Sealer 26[®] e Endofill[®]. Para o *S. aureus* a ordem crescente foi AH plus[®], Endofill[®] e Sealer 26[®], sendo que todos os cimentos testados apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as culturas avaliadas.

Mendonça *et al.* (2007) através do teste de difusão em ágar, avaliaram associações do Gel de Metronidazol com hidróxido de cálcio e cimento Portland[®] como medicação intracanal frente a bactérias anaeróbias facultativos. Nos resultados constataram que princípios ativos como hidróxido de cálcio mesmo com seu pH extremamente alcalino, não mostra espectro para o microrganismos anaeróbios tais como *Enterococcus faecalis*. O metronidazol gel quando associado ao hidróxido de cálcio e cimento Portland[®] não obteve respostas antimicrobianas melhores do que a ação do hidróxido de cálcio puro, tendo o cimento Portland[®] apenas melhorado as propriedades físico-químicas dessa pasta.

Tanomaru *et al.* (2008) testaram a atividade antimicrobiana do cimento Acroseal[®] e MTA[®] em comparação com os cimentos Sealapex[®], Sealer 26[®], Intrafill[®] e MTA[®] Branco (Angelus), contra os microorganismos *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. O método para análise foi a difusão em ágar. Após resfriamento das placas de petri, foram confeccionados poços de 4mm no ágar previamente contaminado. Os cimentos foram espatulados, inseridos nos poços e deixados à temperatura ambiente durante 2 horas, em seguida, as placas foram colocadas em estufa à 37°C durante 24 horas e os halos de inibição foram medidos após esse período. Nos resultados pode-se observar que os cimentos Sealapex[®], Sealer 26[®] e MTA[®] branco apresentaram atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos. O cimento Acroseal[®] foi inefetivo contra *P. aeruginosa* e *C. albicans* e o cimento Intrafill[®] não apresentou atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa*. Os autores concluíram que o cimento Acroseal[®] apresentou baixa ação antimicrobiana e formulação parecida com o cimento Sealer 26[®], porém, não demonstrando mesma atividade antimicrobiana.

A fim de comparar a atividade antimicrobiana de 4 cimentos: AH Plus[®], Apexit Plus[®], Epiphany SE[®] e Roeko Seal[®], contra a bactéria *Enterococcus faecalis*, Slutzky-Goldberg *et al.* (2008) utilizaram o método de contato direto. O crescimento bacteriano foi avaliado a cada 30 minutos por 16 horas. Os cimentos, previamente espatulados, foram colocados em paredes laterais nos poços, inoculadas as bactérias e, após período de 20 minutos, inserido o caldo BHI. A placa foi armazenada a 37°C na Versamax Linte (General Electric, Virgínia, USA) e a densidade óptica em cada poço foi avaliada durante 16 horas a cada meia hora. Foi realizada uma curva de crescimento bacteriano para cada cimento e os dados foram avaliados estatisticamente pelo ANOVA e Tukey. O mesmo experimento foi realizado com 1, 2, 7 e 14 dias. Nos resultados, os cimentos testados frente *Enterococcus faecalis*, imediatamente após espatulação do material, o Apexit Plus[®] foi o único que inibiu o potencial microbiano. Após um dia de espatulado, o Apexit[®] ainda conteve um crescimento bacteriano. Apexit[®], AH Plus[®] e Roeko Seal[®] não diferiram do grupo controle negativo no tempo de 2 dias, entretanto o sistema Epiphany SE[®] não conteve crescimento bacteriano. Após 7 dias o Epiphany[®] foi o único que continuou a ter o crescimento bacteriano, enquanto os outros materiais ficaram similares ao grupo controle negativo e em 14 dias já não havia qualquer reação do material à bactéria. Os resultados indicaram que dentro das condições de estudo o uso do Epiphany[®] pode ser um desafio.

Através do método de difusão em ágar, Yassuda *et al.* (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana dos cimentos: SB Sealer[®] (Sun Medical, Shiga, Japan), Sealapex[®], AH Plus[®],

RoekoSeal Automix[®] (Coltene/Whaledent, Germany), Canals N[®] (Showa Yakuhin Kako, Tokyo, Japan) e ProRoot Mineral Trioxide Aggregate[®] (MTA) (Dentsply, Jonhson City, TN, USA), frente aos microorganismos *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*, *S. mutans* e *S. sanguinis*. Placas foram preparadas com ágar BHI e os microorganismos foram adicionados de acordo com a escala 0,5 de McFarland. Sob o ágar, seis perfurações de 7mm de diâmetro e 2mm de profundidade foram confeccionadas, os cimentos manipulados e em seguida inseridos nos orifícios. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, em seguida, uma camada de 5ml de triphenyltetrazolium chloride gel (TTC) preparado com 1% de ágar BHI e 0,05% de TTC foi adicionada para otimização dos resultados. Após solidificação, foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Os diâmetros das zonas de inibição foram acurados em milímetros e os resultados mostraram que a atividade antimicrobiana do SB Sealer[®] foi significativamente baixa quando comparada com os outros cimentos, com exceção do ProRoot MTA[®] sobre *S. aureus*, *C. albicans*, *S. mutans* e *S. sanguinis*. Porém, a atividade sobre o *E. faecalis* não foi detectada. O AH Plus[®] mostrou atividade antimicrobiana superior frente a *C. albicans* e *S. Mutans*. O cimento Canals N[®] apresentou atividade antimicrobiana alta frente a *S. aureus* e *S. sanguinis*, semelhante a mostrada pelo AH Plus[®]. Sealapex[®] e Roeko Seal[®] exibiram moderada inibição sobre todos os microrganismos. Não foi detectada atividade do ProRoot MTA[®] sobre os espécimes testados. O *E. faecals* mostrou-se mais resistente sobre os cimentos.

Sabendo que as infecções endodônticas são poli microbianas e mais resistentes, Turk *et al.* (2009) testaram a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio com diferentes veículos pelo método de difusão em ágar contra a bactéria *E. faecalis* e *C. albicans*. Foram utilizados os medicamentos: hidróxido de cálcio em pó (Merck, Darmstadt, Germany), misturados com glicerina 100%, 50% e 20% (Merck, Darmstadt, Germany), digluconato de clorexidina 2% (CHX; Sigma Aldrich, St. Louis, MO), cetrimida 2% (Arcos Organics, Geel, Bélgica) e diluído em água destilada. As cepas foram inoculadas e incubadas a 37°C durante 24 horas. As células microbianas foram suspensas em solução salina até chegar à concentração final de $1,5 \times 10^8$ células/ml. Para o teste de difusão em ágar, nas placas de petri com 20 ml de Tryptic Soy Ágar (Merck, Darmstadt, Germany) foram inoculadas 0,1ml de cada uma das suspensões microbianas nos poços de 5mm de profundidade e 6mm de diâmetro, previamente confeccionados nos meios. Para o controle positivo, foram utilizados os antibióticos Nistatina e Ceftazidima. Os halos de inibição microbiana foram mensurados em milímetros através de uma régua milimetrada. Dentre os resultados contra *E. faecalis* os efeitos antibacterianos das pastas de hidróxido de cálcio em ordem decrescente foram:

Ceftazidima, digluconato de clorexidina 2% com hidróxido de cálcio, cetrimida com hidróxido de cálcio, água destilada com hidróxido de cálcio. A combinação da glicerina com hidróxido de cálcio não demonstrou nenhuma atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*. Essa bactéria demonstrou maior resistência às medicações intracanaais quando comparada com a levedura *C. albicans*. Os efeitos antifúngicos das pastas de hidróxido de cálcio em ordem decrescente foram: glicerina 100% com hidróxido de cálcio, digluconato de clorexidina 2% com hidróxido de cálcio, glicerina 50% com hidróxido de cálcio, glicerina 20% com hidróxido de cálcio e água destilada com hidróxido de cálcio. O poder antifúngico foi maior nas pastas de glicerina e digluconato de clorexidina do que o controle Nistatina, cetrimida 2% e água destilada.

Zhang *et al.* (2009) utilizaram a técnica de contato direto modificada para avaliar a atividade antimicrobiana de 7 cimentos: AH Plus[®], Apexit Plus[®], iRoot SP[®], TubliSeal[®], Sealapex[®], Epiphany SE[®] e Endo Rez[®] contra os *Enterococcus faecalis*. As bactérias em suspensão eram expostas aos materiais por 2, 5, 20 e 60 minutos, utilizando os cimentos preparados imediatamente ou após 1,3 e 7 dias. Após os períodos, era realizada a contagem de UFC/ml de cada tipo de cimento. Imediatamente após a espatulação, o cimento iRoot SP[®] eliminou todas as bactérias em 2 minutos, AH Plus[®] em 5 minutos, Endo Rez[®] em 20 minutos e Sealapex[®] e Epiphany[®] em 60 minutos. Os meios frescos contendo Apexit Plus[®] e TubliSeal[®] não conseguiram eliminar as bactérias dentro de 60 minutos. Dentro dos períodos 1 e 3 dias de experimento, iRoot SP[®] e EndoRez[®] tiveram as melhores atividades antimicrobianas, seguidos de Sealapex[®] e Epiphany[®]. Os cimentos TubliSeal[®] e AH Plus[®] não demonstraram nenhuma atividade antimicrobiana significativa. Dentre todos os experimentos, Apexit Plus[®] apresentou a menor atividade antimicrobiana, concluindo que os cimentos frescos iRoot SP[®], AH Plus[®], e EndoRez[®] eliminaram o *Enterococcus faecalis* efetivamente, sendo que o iRoot SP[®] e o EndoRez[®] continuaram efetivos por 3 a 7 dias após sua espatulação. Os cimentos Sealapex[®] e EndoRez[®] foram os únicos que permaneceram com atividade antimicrobiana após 7 dias.

Leonardi *et al.* (2009) pesquisaram a ação antimicrobiana dos cimentos endodônticos Endofill[®], Sealer 26[®], AH Plus[®] e Acroseal[®], contra as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, utilizando o método de difusão em ágar. Após agitação e crescimento, as bactérias selecionadas foram inoculadas em placas de petri com ágar, previamente preparadas, e escavados poços com 6mm de diâmetro. Os cimentos foram espatulados e colocados e as placas ficaram em repouso em temperatura ambiente por 2 horas, para difusão do material obturador no meio de cultura, e, em seguida,

foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C, por 48 horas. Os halos de inibição de crescimento bacteriano foram medidos com auxílio de uma régua milimetrada transparente e dentre os resultados, o cimento Acroseal[®] não demonstrou atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *E. faecalis* e atividade mediana contra *B. cereus* e *S. aureus*; o AH Plus[®] e o Endofill[®] evidenciaram alto poder antimicrobiano contra *E. coli* e o Sealer 26[®] apresentou moderada atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos empregados. Os autores concluíram que os cimentos AH Plus[®] e Endofill[®] demonstraram maior poder antimicrobiano dentro da metodologia empregada no trabalho.

No intuito de avaliar a atividade antimicrobiana, *in vitro*, através do teste de difusão em ágar, Pinheiro *et al.* (2009) testaram os seguintes cimentos: Epiphany[®] (Penton clinical technologies, Wallingford, CT, USA), Primer[®] (Epiphany self-etching primer – Penton clinical technologies), Acroseal[®] (Septodont, Saint Maur Desfosses, France), Polifil[®] (Araraquara Dental School, São Paulo State University, Araraquara, SP, Brasil) e para controle positivo foi utilizado cimento de óxido de zinco e eugenol (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Placas contendo ágar foram preparadas e, posteriormente, a bactéria *E. faecalis* foi inoculada em toda sua superfície. Em seguida, foram confeccionados poços na superfície e inseridos os cimentos, previamente espatulados. As placas de ágar com cimento foram deixadas em temperatura ambiente durante 2 horas, para uma pré-difusão do cimento no ágar e, depois colocado em estufa bacteriológica. Foram realizadas medidas dos halos de inibição nos tempos de 24 e 48 horas. Nos resultados foi avaliado que não houve diferença nas mensurações de 24 e 48 horas, sendo que os cimentos Epiphany[®] e Polifil[®] não mostraram ação antimicrobiana (não houve halo de inibição bacteriana). O Primer[®] produziu o maior halo de inibição seguido pelo Acroseal[®] e o óxido de zinco e eugenol. Concluíram que neste estudo o *E. faecalis* foi resistente aos cimentos Epiphany[®] e o Polifil[®], sendo que o Primer[®] e o cimento Acroseal[®] foram efetivos contra a bactéria testada.

3 OBJETIVOS

Levando-se em consideração a importância da atividade antimicrobiana *in vitro* dos cimentos endodônticos Endofill[®], Endomethasone N[®], Acroseal[®], Sealapex[®], Sealer 26[®] e AH-Plus[®], frente aos microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*, no tempo imediatamente após espatulação dos materiais, o objetivo desta pesquisa foi:

- Analisar *in vitro* a capacidade antimicrobiana dos cimentos endodônticos através do teste de difusão em ágar no tempo de 48 horas após incubação;
- Verificar *in vitro* a capacidade antimicrobiana dos cimentos endodônticos utilizando o teste de contato direto em meio líquido.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, protocolo nº1331, conforme anexado.

4.1 Materiais

4.1.1 Cimentos (Apêndice I)

Os cimentos obturadores analisados neste trabalho foram:

- G1 - ENDOFILL[®] (Dentsply, Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis – RJ/ Brasil);
- G2 - ACROSEAL[®] (Specialités – Septodont – Saint Maur – Paris/França).
- G3 - SEALAPEX[®] (Kerr, Rumulus, MI/USA);
- G4 - SEALER 26[®] (Dentsply, Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis – RJ/Brasil);
- G5 - ENDOMETHASONE N[®] (Specialités – Septodont – Saint Maur – Paris/França);
- G6 - AH-PLUS[®] (Dentsply – DeTrey GmbH D-78467, Konstanz/ Suíça);

4.1.2 Microorganismos

Levedura

- *Candida albicans* (ATTC 25212)

Bactérias anaeróbias facultativas

- *Enterococcus faecalis* (ATCC 29121)
- *Escherichia coli* (ATCC 8739),

Bactéria aeróbia

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

4.1.3 Meio de culturas (Apêndice II)

- Brain Heart Infusion (BHI) – Oxoid, Unipath Ltda, Basingstoke, UK

- Brain Heart Infusion Agar - Oxoid, Unipath Ltda, Basingstoke, UK
- Muller-Hinton Ágar (MHA) - Oxoid, Unipath Ltda, Basingstoke, UK
- Caldo Triptcaseína de Soja (TSB) - Oxoid, Unipath Ltda, Basingstoke, UK

4.2 Métodos

4.2.1 Método de difusão em ágar

4.2.1.1 Preparação do inóculo

A atividade antimicrobiana foi realizada através do meio de difusão radial em ágar e posterior leitura dos halos de inibição de crescimento microbiano, de acordo com a metodologia descrita por Siqueira Jr; Gonçalves (1996), Abdulkader *et al.* (1996), Weiss *et al.* (1996).

Os microrganismos foram, inicialmente, reativados em caldo Ágar (BHI) e, posteriormente, subcultivados em placas de Ágar Mueller Hinton durante 18 a 24 h, a 37°C, em estufa microbiológica (Odontobras, São Paulo/Brasil).

Após o crescimento em meio sólido, preparou-se a suspensão microbiana a partir da homogeneização de uma colônia em tubos contendo 3 ml de solução salina 0,9% estéril. Seguiu-se a agitação mecânica e a suspensão foi ajustada até atingir a concentração equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland (1.5×10^8 bactéria/ml).

4.2.1.2 Preparo do Ágar

As placas com 60 X 15mm de diâmetro foram preparadas com 21 ml de ágar Mueller Hinton, previamente esterilizados, conforme recomendação do fabricante. Após a solidificação do ágar, os microrganismos foram impregnados conforme descrição abaixo.

4.2.1.3 Inoculação das bactérias

A suspensão bacteriana, previamente padronizada ao tubo $1,5 \times 10^8$ ufc/ml (0,5 da escala de MacFarland) (Figura 3a), foi inoculada no ágar por meio de um Swab (Figura 3b). O processo foi realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar (Veco, Campinas, Brasil), a fim

de evitar a contaminação por outros microorganismos, resultar em falhas na pesquisa, e aguardar a dispersão do material no meio de cultura (Figura 1).

Seguido este passo, com no máximo quinze minutos, confeccionaram-se orifícios com 6 mm de diâmetro com auxílio de tubos de inox estéreis para posteriormente acrescentar os cimentos a serem testados (Figura 3c).



Figura 1 - Câmara de Fluxo Laminar.

4.2.1.4 Preparo dos cimentos

Os cimentos endodônticos (Figura 2), foram espatulados em placas de vidro com espátulas de aço inoxidável estéreis, de número 24F. Os cimentos, tanto pó e líquido, quanto pasta/pasta foram manipulados conforme as recomendações do fabricante. Após manipulação, os cimentos foram inseridos dentro dos poços com o auxílio de uma seringa centrix (DFL, São Cristovão, Brasil) (Figura 3d), previamente desinfetadas com álcool 70%, até preenchimento total dos mesmos. Os testes foram realizados em triplicata (os cimentos foram testados três vezes frente à cada microorganismo).



Figura 2 - Cimentos utilizados para os testes de difusão em ágar e contato direto em meio líquido. **a)** Cimento AH Plus® à base de resina epóxica; **b)** Acroseal®, à base de hidróxido de cálcio; **c)** Endofill®, à base de óxido de zinco e eugenol; **d)** Sealapex®, à base de hidróxido de cálcio; **e)** Endomethasone N®, à base de óxido de zinco e eugenol; **f)** Sealer 26®, à base de resina e hidróxido de cálcio.



Figura 3 - a) Escala de McFarland mostrando turbidez do meio; **b)** inserção das suspensões microbianas na superfície do ágar Mueller Hinton; **c)** Confecção dos poços para posterior colocação dos cimentos; **d)** inserção dos cimentos; **e)** Placas mostrando a análise dos halos de inibição frente à três cimentos endodônticos; **f)** Placa demonstrando o halo de inibição do controle positivo Vancomicina.

4.2.1.5 Incubação

Após inoculação dos cimentos, as placas foram deixadas durante 20 minutos, conforme Weiss *et al.* (1996), em temperatura ambiente, e, em seguida foram armazenadas em estufa microbiológica a 37°C, durante 48 horas.

4.2.1.6 Leitura dos halos de inibição

Após 48 horas de incubação, os halos das zonas de inibição microbiana foram medidos e corresponderam à menor distância entre a superfície externa do poço e o início da região de crescimento microbiano (Figura 3e). Eles foram aferidos com o auxílio de um paquímetro milimetrado (Mitutoyu, Santo Amaro, São Paulo).

4.2.2 Método de inibição em caldo

A fim de confirmar os resultados obtidos no teste de difusão em ágar e devido alguns cimentos serem mais solúveis que outros, foi realizado o teste de contato direto em meio líquido, conforme Weiss *et al.*, 1996; Shalhav *et al.*, 1997; Çobankara *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2004; Eldeniz *et al.*, 2006-a.

4.2.2.1 Preparo das suspensões microbianas

Os inóculos foram preparados de acordo com a metodologia citada anteriormente.

Os organismos aeróbios facultativos foram subcultivados em placas de ágar Müeller Hinton e incubados, por 24 horas, em estufa bacteriológica, a 37°C. Após crescimento em meio sólido, colônias isoladas de aeróbios facultativos foram suspensas em tubos, contendo 3 ml de solução salina a 0,9% estéril (Figura 4a). Após agitação mecânica, a suspensão foi ajustada até atingir a concentração equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ bactéria/ml). O volume final da suspensão foi mantido em 3 ml.

4.2.2.2 Preparo dos caldos ou meio líquido

Os tubos de ensaio foram previamente lavados e colocados em contato com álcool 70% para desinfecção. Em seguida foram voltados com sua embocadura para baixo, a fim de secar e, em seguida, acrescidos com 10 ml de caldo Triptcaseína de Soja (TSB).

Os tubos foram tampados com algodão e esterilizados em autoclave durante 15 min. (121° C).

4.2.2.3 Preparo dos cimentos

Os cimentos foram preparados de acordo com a metodologia descrita previamente. Entretanto, para obtenção do mesmo volume de cimento (0,2ml) em todos os tubos, foram utilizadas seringas de insulina de 1ml (estéreis).

4.2.2.4 Inoculação dos microorganismos

Cada tubo, contendo 10ml de caldo TSB, recebeu o acréscimo de 0,2ml de cimento e, logo em seguida, o tubo recebeu o 10µl de inóculo, previamente padronizado, 0,5 da escala de MacFarland (Figura 4c). O cimento ficou em contato direto com os microorganismos em estufa bacteriológica (Figura 4b) a 37°C, durante 48 horas. O procedimento foi realizado respeitando as condições assépticas. Cada teste foi realizado em duplicata (os cimentos foram testados duas vezes frente à cada bactéria) e divididos conforme descrição da tabela abaixo.

TABELA 1 - Ensaios para o teste de contato direto em meio líquido, divididos conforme foi realizado o experimento.

<i>Teste</i>	<i>Ensaios</i>	<i>Número de tubos utilizados para cada parte do experimento</i>	<i>Total de tubos para cada teste</i>
m.o 1	<i>Staphylococcus aureus</i> + Cimento + caldo TSB	2	12
m.o 2	<i>Escherichia coli</i> + Cimento + Caldo TSB	2	12
m.o 3	<i>Enterococcus faecalis</i> + Cimento + Caldo TSB	2	12
m.o 4	<i>Candida Albicans</i> + Cimento + Caldo TSB	2	12
C.P.M	Antibiótico testado frente a cada cepa + Caldo TSB + Microorganismo	2	8
C.N	Microorganismo + Caldo TSB	2	8

m.o - microrganismo; C.P.M - Controle positivo do meio; C.N - Controle negativo.

4.2.2.5 Leitura e interpretação dos resultados

As leituras foram realizadas através de espectrofotometria (Femto, São Paulo/Brasil) (Figura 4d) em dois momentos distintos, uma primeira leitura após 24 horas e outra decorrido 48 horas do teste, a fim de avaliar o poder antimicrobiano, por meio indireto da medida de turbidez dos meios, pela alteração das absorbâncias (turbacão do meio devido a crescimento microbiano). Para isso, cada suspensão foi previamente misturada através de um aparelho agitador, Vortex QL 901 (Biomixer, São Paulo/Brasil) e, em seguida, retirou-se 3 ml das mesmas, colocando-as no aparelho para leitura. As aferições foram realizadas por um único operador previamente treinado para o procedimento e o valor da absorbância foi mensurado de cada ensaio.

Os controles de crescimento microbiano, bem como o controle positivo (utilizando-se antibióticos padrões) foram realizados em paralelo. Os tubos contendo caldo TSB mais inóculo foram avaliados para constatar que houve o crescimento microbiano. Os tubos contendo caldo TSB mais cimento também foram utilizados na pesquisa para confirmar a manutenção da cadeia asséptica durante a execução dos experimentos (Figura 4e).



Figura 4 - a) soluções salinas com os inóculos microbianos.; **b)** estufa microbiológica onde foram armazenados os ensaios.; **c)** tubos contendo cimentos + meio líquido + microorganismo; **d)** Espectrofotômetro.; **e)** meio estéril onde foi realizado todo o experimento

4.3 Análise estatística

4.3.1 Hipóteses

H₀: Os níveis de eficiência da inibição das atividades bacterianas não são alterados com as aplicações de cimentos e são iguais à eficiência do efeito do controle:
 $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$.

H₁: Os níveis de eficiência da inibição das atividades bacterianas são alterados com as aplicações de cimentos, isto é, pelo menos dois dos Grupos são diferentes, incluindo o controle.

Durante a aplicação do teste ANOVA constatou-se que as variâncias entre as amostras eram desiguais, isto é $p \leq 0,05$, não sendo aconselhável a continuação do mesmo. Dessa forma optou-se por aplicar um teste não-paramétrico, que não exige a normalidade dos tratamentos, sendo este o teste de Kruskal-Wallis, para as mesmas hipóteses H₀ e H₁, e o teste de Student-Newman-Keuls, que substitui o teste de Análise de Variância, para a determinação dos grupos com diferenças de médias significativas ($P < 0,05$) ou altamente significativas ($P < 0,01$).

5 RESULTADOS

5.1 Teste de difusão em Ágar

5.1.1 *Escherichia coli*

TABELA 2 - Medidas dos halos de inibição (em cm), dos cimentos endodônticos **G1** – Endofill[®]; **G2** – Acroseal[®]; **G3** – Sealapex[®]; **G4** – Sealer 26[®]; **G5** – Endomethasone N[®]; **G6** – AH Plus[®]; **G7** – Controle Positivo (Clorafenicol) frente à bactéria *E. coli*.

<i>E. coli</i>	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Halo 1	1,3	1,1	1,4	1,2	2,4	0,8	2,5
Halo 2	1,4	0,9	1,1	1,2	2,3	0,8	3
Halo 3	1,4	1	1,3	1,2	2,1	0	2,2

TABELA 3 - Médias em ordem decrescente da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos e controles frente a *E. coli*.

<i>E. coli</i>	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Clorafenicol (Controle-positivo)	2,5667	0,4041
Endomethasone N [®]	2,2667	0,1528
Endofill [®]	1,3667	0,0577
Sealapex [®]	1,2667	0,1528
Sealer 26 [®]	1,2000	0,0000
Acroseal [®]	1,0000	0,1000
Ah Plus [®]	0,5333	0,4619

Observando os resultados através do teste verificou-se a existência de diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos Endofill[®] e AH Plus[®], Acroseal[®] e Endomethasone N[®], Sealer 26[®] e Clorafenicol, e variações altamente significativas ($P < 0,01$) nos grupos Acroseal[®] e Clorafenicol, Endomethasone N[®] e AH Plus[®], AH Plus[®] e Clorafenicol. Entretanto, as variáveis das comparações entre os demais grupos não se expuseram em significância ($P > 0,05$). Nota-se, também, que os melhores resultados foram apresentados pelos cimentos Endomethasone N[®] e Endofill[®].

5.1.2 *Staphylococcus aureus*

TABELA 4 - Medidas dos halos de inibição (em cm), dos cimentos endodônticos **G1** - Endofill[®]; **G2** - Acroseal[®]; **G3** - Sealapex[®]; **G4** - Sealer 26[®]; **G5** - Endomethasone N[®]; **G6** - AH Plus[®]; **G7** - Controle Positivo (Vancomicina) frente à bactéria *S. aureus*.

<i>S.aureus</i>	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Halo 1	1,5	1,8	1,8	1,6	2,2	0,8	4
Halo 2	1,5	1,8	1,8	1,7	1,9	1	4,2
Halo 3	1,5	1,8	2	1,7	2	1	4

TABELA 5 – Médias em ordem decrescente da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos e controles frente ao *S. aureus*.

<i>S. aureus</i>	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Vancomicina (controle-positivo)	4,0667	0,1155
Endomethasone N [®]	2,0333	0,1528
Sealapex [®]	1,8667	0,1155
Acroseal [®]	1,8000	0,0000
Sealer 26 [®]	1,6667	0,0577
Endofill [®]	1,5000	0,0000
AH plus [®]	0,9333	0,1155

Neste caso, constatou-se a existência de diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos Endofill[®] e Endomethasone N[®], Acroseal[®] e AH Plus[®], Sealapex[®] e AH Plus[®], e Sealer 26[®] e Vancomicina e variações altamente significativas ($P < 0,01$) nos grupos Endofill[®] e Vancomicina, Endomethasone N[®] e AH Plus[®] e AH Plus[®] e Vancomicina. Entretanto, as variáveis das comparações entre os demais grupos não se expuseram em significância ($P > 0,05$). Além disso, o cimento que apresentou os melhores resultado foi também o Endomethasone N[®].

5.1.3 *Candida albicans*

TABELA 6 - Medidas dos halos de inibição (em cm), dos cimentos endodônticos **G1** - Endofill[®]; **G2** – Acroseal[®]; **G3** – Sealapex[®]; **G4** – Sealer 26[®]; **G5** - Endomethasone N[®]; **G6** – AH Plus[®]; **G7** – Controle Positivo (Ketoconazol) frente ao fungo *C. albicans*.

<i>C. albicans</i>	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Halo 1	3	1,8	0	1,4	2,6	1	2,5
Halo 2	3	2,1	0	1,3	2,2	1,3	2,4
Halo 3	3	2,1	0	1,3	2,8	1,2	3

TABELA 7 – Médias em ordem decrescente da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos e controles frente a *C. albicans*.

<i>C. albicans</i>	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Endofill [®]	3,000	0.0000
Ketoconazol (controle-positivo)	2,633	0.3215
Endomethasone N [®]	2,533	0.3055
Acroseal [®]	2,000	0.1732
Sealer 26 [®]	1,667	0.1528
Ah Plus [®]	1,333	0.0577
Sealapex [®]	0,000	0.0000

As diferenças significativas ($P < 0,05$) existentes dentro deste grupo foram entre os cimentos Endofill[®] e Sealer 26[®], Endomethasone N[®] e AH Plus[®] e AH Plus[®] e Ketoconazol, e variações altamente significativas ($P < 0,01$) foram encontradas nos grupos Endofill[®] e Sealapex[®], Endofill[®] e AH Plus[®], Sealapex[®] e Endomethasone N[®] e Sealapex[®] e Ketoconazol. Nota-se dentro dos resultados frente à levedura que o cimento Endofill[®] apresentou os melhores resultados, seguido do grupo controle e posteriormente pelo Endomethasone N[®], não havendo diferenças significativas entre estes três materiais ($P > 0,05$).

5.1.4 *Enterococcus faecalis*

TABELA 8 - Medidas dos halos de inibição (em cm), dos cimentos endodônticos **G1** – Endofill[®]; **G2** – Acroseal[®]; **G3** – Sealapex[®]; **G4** – Sealer 26[®]; **G5** – Endomethasone N[®]; **G6** – AH Plus[®]; **G7** – Controle Positivo (Ampicilina), frente à bactéria *E. faecalis*.

<i>E. faecalis</i>	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
Halo 1	1,1	1,1	1,5	1,1	2,1	1,5	2
Halo 2	0,9	1,2	1,3	1,2	2,1	1,3	2,1
Halo 3	1,3	1,2	1,5	1,1	2,2	1,3	1,9

TABELA 9 - Médias em ordem decrescente da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos e controles frente a *E. faecalis*.

<i>E. faecalis</i>	MÉDIA ARITMÉTICA	DESVIO PADRÃO
Endomethasone N [®]	2,1333	0,0577
Ampicilina (Controle-positivo)	2,0000	0,1000
Sealapex [®]	1,4333	0,1155
Ah Plus [®]	1,3667	0,1155
Acroseal [®]	1,1667	0,0577
Sealer 26 [®]	1,1333	0,0577
Endofill [®]	1,1000	0,2000

Observando os resultados das tabelas 8 e 9 constatou-se a existência de diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos Endofill[®] e Sealapex[®] e variações altamente significativas ($P < 0,01$) nos grupos Endofill[®] e Endomethasone N[®], Endofill[®] e Ampicilina, Acroseal[®] e Endomethasone N[®], Acroseal[®] e Ampicilina, Sealapex[®] e Endomethasone N[®], Sealapex[®] e Ampicilina, Sealer 26[®] e Endomethasone N[®], Sealer 26[®] e Ampicilina, Endomethasone N[®] e AH Plus[®] e AH Plus[®] e Ampicilina. Neste caso, o cimento Endomethasone N[®] mais uma vez demonstrou os melhores resultados, sendo que sua atividade antimicrobiana foi melhor que o controle positivo (Ampicilina), não demonstrando diferenças significativas entre os mesmos ($P > 0,05$).

5.2 Contato Direto em Meio Líquido

5.2.1 *Staphylococcus aureus*

TABELA 10 - Medidas dos graus de absorbância analisados em espectrofotômetro, dos cimentos endodônticos **G1**-Endofill[®]; **G2** - Acroseal[®]; **G3**– Sealapex[®]; **G4** – Sealer 26[®]; **G5** – Endomethasone N[®]; **G6** – AH Plus[®]; **G7** – Controle positivo (Vancomicina); **G8** – controle negativo (bactéria), frente a *S.aureus*.

<i>S. aureus</i>	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
24 horas	0,114	1,118	0,721	1,276	0,024	1,215	0,011	1,469
24 horas	0,108	1,066	0,789	1,26	0,014	1,208	0,018	1,456
48 horas	0,197	1,118	0,996	1,322	0,047	1,338	0,124	1,721
48 horas	0,1966	1,066	0,956	1,485	0,054	1,284	0,097	1,65

TABELA 11 - Médias em ordem crescente da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos e controles frente a *S.aureus*.

<i>S.aureus</i>	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Controle negativo (bactéria)	1,4125	0,4973
Sealer 26 [®]	1,0650	0,1300
Acroseal [®]	1,0000	0,0000
AH Plus [®]	1,0000	0,0000
Sealapex [®]	0,8655	0,1316
Endofill [®]	0,1539	0,0496
Vancomicina (controle-disco)	0,0625	0,0566
Endomethasone N [®]	0,0348	0,0189

No teste de contato direto frente à bactéria *Staphylococcus aureus*, constatou-se a existência de diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos Endofill[®] e Acroseal[®], Endofill[®] e Sealer 26[®], Endofill[®] e AH Plus[®], Endofill[®] e *S.aureus* e Sealer 26[®] e *S. aureus* e variações altamente significativas nos grupos Acroseal[®] e Endomethasone N[®], Acroseal[®] e Vancomicina[®], Sealer 26[®] e Endomethasone N[®], Sealer 26[®] e Vancomicina, Endomethasone N[®] e AH Plus[®], Endomethasone N[®] e *S. aureus*, AH Plus[®] e Vancomicina e Vancomicina e *S. aureus*. Mais uma vez os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol apresentaram os

melhores resultados, sem níveis de significância estatística quando comparados com o grupo controle-positivo, Vancomicina.

5.2.2 *Candida albicans*

TABELA 12 - Medidas dos graus de absorbância analisados em espectrofotômetro, dos cimentos endodônticos **G1** - Endofill®; **G2**-Acroseal®; **G3** -Sealapex®; **G4** – Sealer 26®; **G5** – Endomethasone N®; **G6** – AH Plus®; **G7** – Controle positivo (Ketoconazol); **G8** – controle negativo (Fungo), frente a *C. albicans*.

<i>Candida albicans</i>	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
24 horas	0,018	0,242	0,445	0,712	0,012	0,04	0,023	0,91
24 horas	0,02	0,312	0,401	0,841	0,017	0,011	0,028	0,71
48 horas	0,084	0,662	0,907	1,092	0,057	0,052	0,102	1,1
48 horas	0,034	0,706	0,908	0,856	0,092	0,048	0,09	1

TABELA 13 - Médias em ordem crescente da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos e controles frente a *C. albicans*.

Cândida albicans	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Controle negativo (<i>C. albicans</i>)	0,9300	0,1659
Sealer 26®	0,8753	0,1583
Sealapex®	0,6653	0,2803
Acroseal®	0,4805	0,2374
Ketoconazol (controle-disco)	0,0608	0,0410
Endomethasone N®	0,0445	0,0375
Endofill®	0,0390	0,0308
AH Plus®	0,0378	0,0185

Dentro dos testes realizados, constata-se a existência de diferenças significativas entre os grupos Endofill® e Sealapex®, Sealapex® e Endomethasone N®, Sealapex® e AH Plus® e Sealer 26® e Ketoconazol e variações altamente significativas nos grupos Endofill® e Sealer 26®, Endofill® e *Cândida albicans*, Sealer 26® e Endomethasone N®, Endomethasone N® e *Cândida albicans*, AH Plus® e *Cândida albicans* e Ketoconazol e *Cândida albicans*. Os

cimentos Endomethasone N[®], Endofill[®] e AH Plus[®], tiveram os menores níveis de absorvância, sem diferença significativa com o grupo controle positivo (Ketoconazol).

5.2.3 *Enterococcus faecalis*

TABELA 14 - Medidas dos graus de absorvância analisados em espectrofotômetro, dos cimentos endodônticos **G1** - Endofill[®]; **G2**-Acroseal[®]; **G3**-Sealapex[®]; **G4** – Sealer 26[®]; **G5** – Endomethasone N[®]; **G6** – AH Plus[®]; **G7** – Controle positivo (Ampicilina); **G8** – controle negativo (bactérias), frente a *E. faecalis*.

<i>E. faecalis</i>	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
24 horas	0,021	0,267	0,083	0,75	0,027	0,152	0	0.963
24 horas	0,01	0,386	0,082	0,745	0,02	0,15	0	1
48 horas	0,103	0,267	0,091	0,833	0,251	0,632	0,211	1
48 horas	0,101	0,403	0,201	0,821	0,25	0,65	0,24	1

TABELA 15 - Médias em ordem crescente da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos e controles *E. faecalis*.

<i>E. faecalis</i>	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Controle negativo (bactéria)	0,9908	0,0185
Sealer 26 [®]	0,7873	0,0462
AH Plus [®]	0,3960	0,2830
Acroseal [®]	0,3308	0,0739
Endomethasone N [®]	0,1370	0,1311
Sealapex [®]	0,1143	0,0580
Ampicilina(controle positivo)	0,1128	0,1307
Endofill [®]	0,0588	0,0501

Frente à bactéria *E. faecalis* no teste de contato direto em meio líquido, constata-se a existência de diferenças significativas entre os grupos Endofill[®] e Acroseal[®], Sealapex[®] e Sealer 26[®] e Sealer 26[®] e Endomethasone N[®], e variações altamente significativas nos grupos Endofill[®] e Sealer 26[®], Endofill[®] e *E.faecalis*[®], Sealapex[®] e *E.faecalis*, Sealer 26[®] e Ampicilina, Endomethasone N[®] e *E.faecalis* e Ampicilina e *E.faecalis*. O cimento Endofill[®]

foi o que apresentou melhores resultados, não demonstrando diferenças significativas em relação ao controle positivo Ampicilina, Sealapex[®] e Endomethasone N[®].

5.2.4 *Escherichia coli*

TABELA 16 - Medidas dos graus de absorbância analisados em espectrofotômetro, dos cimentos endodônticos **G1** –Endofill[®]; **G2** –Acroseal[®]; **G3**– Sealapex[®]; **G4** – Sealer 26[®]; **G5** – Endomethasone N[®]; **G6** – AH Plus[®]; **G7** – Controle positivo (Clorafenicol); **G8** – controle negativo (bactéria), frente a *E. coli*.

<i>E.coli</i>	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
24 horas	0,183	0,513	0,356	0,801	0,019	0,66	0	1,268
24 horas	0,238	0,556	0,128	0,812	0,011	0,613	0	1,01
48 horas	0,41	0,759	0,408	0,815	0,384	0,631	0,18	0,907
48 horas	0,367	0,679	0,215	0,89	0,387	0,65	0,21	0,67

TABELA 17 - Médias em ordem crescente da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos e controles frente a *E. coli*.

<i>E. coli</i>	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Controle negativo (bactéria)	0,9638	0,2478
Sealer 26 [®]	0,8295	0,0408
AH Plus [®]	0,6385	0,0208
Acroseal [®]	0,6268	0,1128
Endofill [®]	0,2995	0,1066
Sealapex [®]	0,2768	0,1284
Endomethasone N [®]	0,2003	0,2139
Clorafenicol (Controle positivo)	0,0975	0,1132

Nos testes estatísticos realizados constata-se a existência de diferenças significativas entre os grupos Endofill[®] e Sealer 26[®], Acroseal[®] e Clorafenicol e AH Plus[®] e Clorafenicol e variações altamente significativas nos grupos Endofill[®] e *E.coli*, Sealapex[®] e Sealer 26[®], Sealapex[®] e *E.coli*, Sealer 26[®] e Endomethasone N[®], Sealer 26[®] e Clorafenicol, Endomethasone N[®] e *E.coli* e Clorafenicol e *E.coli*. Nota-se que o Endomethasone N[®]

apresentou melhores resultados não demonstrando diferenças significativas quando comparado com o controle positivo Clorafenicol.

Foi observado, que dentro dos testes do método de contato direto em meio líquido, o cimento Sealer 26[®] foi o que apresentou maiores graus de absorvância, demonstrando baixa atividade antimicrobiana.

6 DISCUSSÃO

A obturação do sistema de canais radiculares é a última etapa do tratamento endodôntico, sendo considerada de extrema valia, pois determinará o êxito ou não do tratamento. A maior parte dos insucessos da terapia endodôntica está intimamente relacionada com falhas na obturação, pois nem sempre o material obturador se adere adequadamente às paredes dentinárias, podendo resultar em espaços vazios no interior dos canais e subsequente recontaminação dos mesmos devido a microorganismos que escaparam da ação da instrumentação, soluções irrigadoras e medicação intracanal. A ação antimicrobiana dos cimentos obturadores é de extrema importância, pois vem complementar e diminuir os riscos de insucessos endodônticos (CRUZ *et al.*, 2001; ÇOBANKARA *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2004; MIYAGAK *et al.*, 2006; ESTRELA *et al.*, 2007; LEONARDO, 2008; SLUTZKY-GOLDBERG *et al.*, 2008; LEONARDI *et al.*, 2009).

O método de difusão em ágar tornou-se um dos métodos mais utilizados para analisar a atividade antimicrobiana de substâncias empregadas na terapia endodôntica, conforme trabalhos de Siqueira Jr; Gonçalves (1996); Abdulkader *et al.* (1996); Siqueira Jr *et al.* (2000); Lai *et al.* (2001); Cruz *et al.* (2001); Mickel *et al.* (2003); Bodrumlu; Semiz (2006); Hoelsher *et al.* (2006); Miyagak *et al.* (2006); Tanomaru-Filho *et al.* (2007); Kopper *et al.* (2007); Mendonça *et al.* (2008); Tanomaru *et al.* (2008); Yasuda *et al.* (2008); Leonardi *et al.* (2009). Por ser um meio sólido e permitir a sobrevivência e o crescimento dos microorganismos, foi utilizado o meio de cultura àgar Mueller-Hinton, semelhante aos trabalhos de Siqueira Jr; Gonçalves (1996); Cruz *et al.* (2001); Bodrumlu; Semiz (2006); Tanomaru-Filho *et al.* (2007); Tanomaru *et al.* (2008); Leonardi *et al.* (2009). Esse método permite a avaliação do poder antimicrobiano de diversos materiais, e por isso foi utilizado na pesquisa. Porém, apesar da importância da composição química de um cimento e da consolidação científica do método de estudo utilizado, o emprego do mesmo torna-se duvidoso pelo fato deste não depender somente da toxicidade de determinado cimento frente à bactéria, mas também da alta influência que a difusibilidade do material possui para adentrar ao meio de cultura. Sendo assim, o material com maior capacidade de difusão irá, provavelmente, ocasionar maiores halos de inibição e, por conseguinte, podem ocasionar falsos resultados (ORSTAVIK 1981; WEISS *et al.*, 1996; SHALHAV *et al.*, 1997; FUSS *et al.*, 1997; KAPLAN *et al.*, 1999; ÇOBANKARA *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2004; ELDENIZ *et al.*, 2006-a). Além disso, existem outras limitações que interferem nesta

metodologia como a falta de padronização da pesquisa, viscosidade do ágar e tamanho e número de microorganismos em cada placa (LAI *et al.*, 2001).

Neste experimento os cimentos foram inseridos nas placas de ágar e deixados dentro da câmara de fluxo laminar durante 15 minutos em temperatura ambiente para dispersão do material no meio de cultura. Após este período foram incubados em estufa bacteriológica, à 37°C, e em 48 horas foram realizadas as leituras dos halos de inibição semelhante ao realizado no trabalho de Kopper *et al.* (2007). Para a padronização do número de colônias dos microorganismos inoculados, foi utilizada a escala de McFarland semelhante à utilizada nos trabalhos de Cruz *et al.* (2001); Miyagak *et al.* (2006); Kopper *et al.* (2007); Leonardi *et al.* (2009).

O teste de contato direto utilizado neste estudo foi baseado na leitura do grau de absorbância avaliado no espectrofotômetro, onde através da turbidez do meio se determina o nível de crescimento microbiano. Quanto maior a turbidez, menor a capacidade antimicrobiana do cimento endodôntico. Esta metodologia é adaptada dos trabalhos de Weiss *et al.* (1996) e Shalhav *et al.* (1997).

O teste de contato direto propicia o contato entre o microorganismo e o material testado, independente das propriedades de difusão do material e do meio, o que acaba sendo uma vantagem em relação à metodologia citada anteriormente (WEISS *et al.*, 1996). Neste estudo foi realizado o teste imediatamente após os materiais serem espatulados, sendo necessário um experimento adicional de contato direto em meio líquido medindo o grau de absorbância através de curvas de crescimento microbiano, testando os materiais em tempos de espatulações diferentes para se analisar a capacidade antimicrobiana à longo prazo.

A bactéria *Enterococcus faecalis* é classificada como gram positiva anaeróbia facultativa e é freqüentemente encontrada em casos de insucessos endodônticos (MOLANDER *et al.*, 1998; PINHEIRO *et al.*, 2003; RÔÇAS *et al.*, 2004; FERRARI *et al.*, 2005; JOHNSON *et al.*, 2006; PARADELA *et al.*, 2007; BEATRICE *et al.*, 2008; PIRANI *et al.*, 2008). É considerado um microorganismo resistente a determinados agentes microbianos, incluindo a medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio, como comprovado no trabalho de Turk *et al.* em 2009, permanecendo no interior do canal radicular, mesmo após preparo biomecânico (LEONARDI *et al.*, 2009) e sobrevivendo sem nutrição por longos períodos de tempo dentro dos túbulos dentinários (SEDGLEY *et al.*, 2005; TURK *et al.*, 2009).

Apesar de não ser muito comum na cavidade bucal, à bactéria gram negativa facultativa *Escherichia coli* pode estar presente em indivíduos mais velhos ou clinicamente

comprometidos (MOLANDER *et al.*, 1998; LEONARDI *et al.*, 2009). *S. aureus* é um microorganismo gram positivo, comumente encontrado em pele, mas juntamente com *E. coli* tem sido amplamente utilizado em testes de antibiograma, ambos são considerados como controle para esse tipo de teste pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

O fungo *Candida albicans* foi isolado em culturas puras provenientes de infecções dos canais radiculares, indicando que é um patógeno encontrado na maioria dos casos em periodontites apicais (MOLANDER *et al.*, 1998; PINHEIRO *et al.*, 2003; FERRARI *et al.*, 2005). Deste modo, foi concluído que existe uma diversidade ecológica e fisiológica de microorganismos encontrados na cavidade bucal, o que possibilitou a escolha dos quatro microorganismos apresentados anteriormente.

Por meio da análise dos resultados desta pesquisa, foi possível observar que, no teste de difusão em ágar, o cimento que melhor apresentou capacidade antimicrobiana foi o Endomethasone N[®], contra as bactérias, *E. coli*, *E. faecalis* e *S. aureus*, concordando com trabalho de Gomes *et al.* em 2004, onde o autor testou esta metodologia e o contato direto entre material e microorganismo, demonstrando o poder antibacteriano dos cimentos à base de óxido de zinco e eugenol. O cimento Endofill[®] demonstrou alta atividade antimicrobiana contra *E. coli* e ótima atividade contra a levedura *C. albicans*, no último, superando o controle positivo (Ketoconazol). Esses resultados corroboram com o trabalho de Leonardi *et al.* (2009) onde, também, pode-se observar a alta capacidade do material contra as bactérias *S. aureus* e *E. faecalis*.

Notou-se que no teste de difusão em ágar, o cimento Sealapex[®] teve alta capacidade antimicrobiana contra *S. aureus* e relativa atividade contra a *E. coli* e do *E. faecalis* e nenhuma atividade contra *C. albicans*, discordando do trabalho de Lai *et al.* (2009) e Siqueira Jr; Gonçalves (1996), onde contra a bactéria *S. aureus* esse cimento apresentou baixa atividade. A ausência de atividade contra o fungo *C. albicans* vem discordar da pesquisa de Yassuda *et al.* (2008) onde o material apresentou a capacidade antimicrobiana. O cimento obturador Acroseal[®], também à base de hidróxido de cálcio, apresentou relativa capacidade antimicrobiana contra os quatro microorganismos, porém sem nenhuma significância maior. No trabalho de Leonardi *et al.* (2009) o Acroseal[®] não apresentou nenhuma atividade contra as bactérias *E. coli* e *E. faecalis*. O baixo poder antimicrobiano desse material pode ser resultado da baixa capacidade de dissolubilidade dos íons hidroxila (TURK *et al.*, 2009).

O cimento resinoso à base de hidróxido de cálcio, Sealer 26[®], apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias *E. faecalis*, *E. coli*, *S. aureus* e a levedura *C. albicans*, concordando com o trabalho de Tanomaru-Filho *et al.* (2007), onde por meio da mesma

metodologia o cimento apresentou halos de inibição, porém em ambos os experimentos os resultados foram medianos. Já o cimento AH Plus[®] apresentou baixa atividade antimicrobiana contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, discordando dos trabalhos de Gomes *et al.* (2004) e Miyagak *et al.* (2006), onde o material apresentou alta atividade contra as bactérias. O baixo poder inibidor de microrganismos observado nos resultados deste estudo pode ser explicado pelo fato desse cimento não possuir componentes com alto poder antimicrobiano (LEONARDI *et al.*, 2009).

No teste de contato direto, os cimentos foram testados nos períodos de 24 e 48 horas, diferentemente de todos os trabalhos revistos na literatura segundo Weiss *et al.*, 1996; Shalhav *et al.*, 1997; Fuss *et al.*, 1997; Kaplan *et al.*, 1999; Çobankara *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2004; Eldeniz *et al.*, 2006a; Slutzky-Goldberg *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009), onde foram realizados testes de contato direto medindo os graus de absorbância em diferentes tempos formando curvas de inibição de crescimento antimicrobiano. No presente trabalho o intuito foi verificar a atividade antimicrobiana através de teste de contato direto somente no tempo imediatamente após espatulação dos cimentos, o que proporcionou uma adaptação das metodologias empregadas pelos trabalhos citados, impossibilitando deste modo a comparação dos resultados.

O cimento Sealer 26[®] foi o que apresentou maior grau de absorbância contra todas as bactérias testadas, demonstrando seu baixo poder antimicrobiano diante dessa metodologia. O cimento Acroseal[®] demonstrou baixa capacidade antimicrobiana e o Sealapex[®] demonstrou capacidade moderada de ação. Esse fato pode ser explicado devido aos íons hidroxila, provenientes dos cimentos à base de hidróxido de cálcio, possuírem baixa capacidade de se dissolubilizarem ao meio (MICKEL *et al.*, 2003). Um importante requisito para um material dentário utilizado em tratamentos permanentes é a resistência à solubilidade e degradação quando exposto a um ambiente por um tempo prolongado (WEISS *et al.*, 1996).

Os cimentos Endomethasone N[®] e Endofill[®] foram os que apresentaram melhores resultados dentro do teste de contato direto, sendo efetivos contra todos os microorganismos empregados, não resultando em diferenças significativas em comparação com os controles positivos utilizados. Nota-se, também, que esses materiais obtiveram resultados melhores que os controles positivos de *C. albicans*, *S. aureus* e *E. faecalis*, demonstrando a alta eficácia contra os microorganismos citados. O fato pode ser explicado pela presença do eugenol na composição dos mesmos, pois esse componente tem a capacidade de coagular proteínas (FUSS *et al.*, 1997; KAPLAN *et al.*, 1999; CRUZ *et al.*, 2001). Além disso, Siqueira *et al.* (2010) explicaram essa ação pelo fato dos dois cimentos apresentarem o zinco na composição,

que por ser um metal pesado, em altas concentrações, pode desestabilizar a parede da membrana bacteriana, assim, fazendo com que ocorra a lise da mesma.

O Endomethasone N[®] é um cimento que foi desenvolvido através da modificação dos componentes do Endomethasone[®]. Na composição antiga havia a presença de paraformaldeído, um potente antimicrobiano que agredia demasiadamente os tecidos periapicais quando extravasado. O alto poder antimicrobiano do Endomethasone N[®] sugere que o paraformaldeído não melhora a capacidade antimicrobiana contra as cepas testadas. A ausência deste agente segue a tendência mundial de remover substâncias tóxicas da composição de materiais biológicos (GOMES *et al.*, 2004).

O presente estudo testou a atividade antimicrobiana de seis cimentos endodônticos contra microorganismos considerados comuns e resistentes nas infecções endodônticas. Portanto, o cimento efetivo contra as cepas testadas, provavelmente será eficiente contra outros tipos de microorganismos que também podem vir a ser encontrados no sistema de canais radiculares. A incorporação de componentes antimicrobianos na composição de cimentos endodônticos pode tornar-se um fator essencial na prevenção da recontaminação e controle microbiano. Os estudos da atividade antimicrobiana dos cimentos *in vitro* proporcionam aos cirurgiões dentistas informações relacionadas à qualidade e propriedades desses materiais.

Ao considerar a literatura científica, é possível constatar que há um grande número de pesquisas realizadas para avaliar a atividade antimicrobiana de cimentos obturadores de canais radiculares. Porém, os trabalhos encontrados empregam diversos métodos de estudo, cimentos com diferentes composições e microorganismos variados, o que pode levar a uma dificuldade de compreender a real ação antimicrobiana dos materiais testados.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e nas condições experimentais utilizadas podemos concluir que a atividade antimicrobiana de cada cimento depende da vulnerabilidade do microorganismo envolvido.

Em relação ao método de difusão em ágar:

- ✓ Todos os cimentos endodônticos tiveram ação antimicrobiana frente a algum microorganismo;
- ✓ O cimento Sealapex[®] não demonstrou nenhuma atividade antimicrobiana frente à levedura *Candida albicans*;
- ✓ Os cimentos que apresentaram melhores resultados antimicrobianos foram os à base de óxido de zinco e eugenol, destacando-se o Endomethasone N[®].

Em relação ao método de contato direto:

- ✓ Os cimentos Endofill[®] e Endomethasone N[®] foram os mais eficazes contra todos os microorganismos testados, não havendo diferença estatística entre eles em nenhum dos testes;
- ✓ O cimento Sealer 26[®] foi o que apresentou menor atividade antimicrobiana frente às três bactérias e a levedura testada;
- ✓ Os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol foram os que apresentaram maiores atividades antimicrobianas frente aos microorganismos testados, destacando-se o Endomethasone N[®] que em certos momentos obteve maior poder antimicrobiano do que os controles positivos.

REFERÊNCIAS¹

Abdulkader A, Duguid R, Saunders E. The antimicrobial activity of endodontic sealers to anaerobic bacteria. *Int Endod J* 1996; 29(4): 280-3.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [<http://www.anvisa.gov.br>]. Brasília. Manual de controle Interno da qualidade para testes de sensibilidade a antimicrobianos [Documento online]. 2006 [Acesso em 04 jan 2010]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/manuais.htm>.

Beatrice L, Aguiar C, Silva C, Correia A, Cavalcanti R. PCR e o perfil microbiológico das infecções endodônticas: realidade ou utopia? *Odontol Clín Científ Recife* 2008; 7(4): 295-8.

Bodrumlu E, Semiz M. Antibacterial activity of a new endodontic sealer against *Enterococcus faecalis*. *JCDA* 2006; 72(7): 637-c.

Çobankara F, Altınöz H, Erganis O, Kav K, Belli S. *In vitro* antibacterial activities of root-canal sealers by using two different methods. *J Endod* 2004; 30(1): 57-60.

Cruz C, Moura P, Habitante S, Zöllner N, Jorge A. Avaliação do efeito antibacteriano *in vitro* dos cimentos obturadores Rickert, N-rickert e Sealer 26. *Rev. Bioc. Taubaté* 2001; 7(1): 49-53.

Eldeniz A, Hadimli H, Ataoglu H, Orstavik D. Antibacterial effect of selected root-end filling materials. *J Endod* 2006a; 32(4): 345-9.

Eldeniz A, Erdemir A, Hadimli H, Belli S, Erganis O. Assessment of antibacterial activity of EndoREZ. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006b; 102(1): 119-26.

Eldeniz A, Erdemir A, Kurtoglu F, Esener T. Evaluation of pH and calcium ion release of Acroseal sealer in comparison with Apexit and Sealapex sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 103: 86-91.

Ersev H, Schmalz G, Bayirli G, Schweikl H. Cytotoxic and mutagenic potencies of various root canal filling materials in eukaryotic and prokaryotic cells *in vitro*. *J Endod* 1999; 25(5): 359-63.

¹ Estilo Vancouver apresentado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas, publicadas inicialmente em 1979.

Estrela C. Obturação do canal radicular. In Estrela C. Ciência Endodôntica. São Paulo: Artes Médicas; 2004; 539-88. Vol II.

Estrela C, Morais A, Alencar A, Guedes O, Decúrcio D. Influência do cimento obturador no sucesso endodôntico. Robrac 2007; 16(42): 28-36.

Ferrari P, Cai S, Bombana A. Effect of endodontic procedures on *enterococci*, *enteric bacteria* and *yeasts* in primary endodontic infections. Int Endod J 2005; 38(6): 372-80.

Fuss Z, Weiss E, Shalhav M. Antibacterial activity of calcium hydroxide-containing endodontic sealers on *Enterococcus faecalis* *in vitro*. I Endod J 1997; 30(6): 397-402.

Gomes B, Pedroso J, Jacinto R, Vianna M, Ferraz C, Zaia A, Souza-Filho F. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. Braz Dent J 2004; 15(1): 30-5.

Hoelscher A, Bahcall J, Maki J. *In vitro* evaluation of the antimicrobial effects of a root canal sealer-antibiotic combination against *Enterococcus faecalis*. J Endod 2006; 32(2):145-7.

Johnson E, Flannagan S, Sedgley C. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodantitis. J Endod 2006; 32(10): 946-50.

Kaplan A, Picca M, Gonzales M, Macchi R, Molgatini S. Antimicrobial effect of six endodontic sealers: an *in vitro* evaluation. Endod Dent Traumatol. 1999; 15(1): 42-5.

Kayaoglu G, Erten H, Alaçam T, Orstavik D. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. I Endod J 2005; 38(7): 483-8.

Kobayashi T, Hayashi A, Yoshikawa R, Okuda K, Hara K. The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. I Endod J 1990; 23(2): 100-6.

Kopper P, Rosa R, Figueiredo J, Pereira C, Tartarotti E, Filippini H. Avaliação, *in vitro*, da atividade antimicrobiana de três cimentos endodônticos. Rev Odont Ciênc 2007; 22(56): 106-11.

Lai C, Huang F, Yang H, Chan Y, Huang M, Chou M, Chang Y. Antimicrobial activity of four root canal sealers against endodontic pathogens. Clin Oral Invest 2001; 5(4): 236-9.

Leal J. Obturação dos canais radiculares (definição, importância, objetivos, limite apical e momento). In Leonardo M. Endodontia: tratamento de canais radiculares: Princípios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes Médicas; 2008. 1029-42.

Leonardi, D, Battisti, J, Klimiont, D, Tomazinho P, Baratto Filho P, Haragushiku, G, Tomazinho F. Avaliação *in vitro* da ação antimicrobiana de alguns cimentos endodônticos. Rev Sul-bras Odontol 2009; 6(4): 367-73.

Leonardo M, Leal J. Materiais obturadores de canais radiculares. In Leonardo M. Endodontia: Tratamento de canais radiculares: Princípios técnicas e biológicas. São Paulo: Artes Médicas; 2008. 1043-126.

Leonardo M, Silva L, Tanomaru-Filho M, Silva R. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology 1999; 88(2): 221-5.

Machado M, Souza A, Britto M, Palotta R. Obturação do sistema de canais radiculares. In Machado M. Endodontia: da biologia à técnica. São Paulo: Santos; 2007. 321-53.

Maia Filho E, Maia C, Bastos A, Novais T. Efeito antimicrobiano *in vitro* de diferentes medicações endodônticas e própolis sobre *Enterococcus faecalis*. RGO 2008; 56(1): 21-5.

Mendonça E, Lima M, Steinhäuser H, Carneiro S, Sperança P. Atividade antimicrobiana do metronidazol gel associado ao hidróxido de cálcio e ao cimento Portland frente às bactérias anaeróbias relacionadas a reações periapicais do tipo crônica. Rev Odont Ciênc 2007; 22(55): 23-9.

Mickel A, Nguyen T, Chogle S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. J Endod 2003, 29(4): 257-8.

Miyagak D, Carvalho E, Robazza C, Chavasco J, Levorato G. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of endodontic sealers. Braz Oral Res 2006; 20(4): 303-6.

Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical peridontitis. I Endod J 1998; 31(1): 1-7.

Orstavik D. Antibacterial properties of root canal sealers, cements and pastes. I Endod J 1981; 14(1):125-33.

- Paradella T, Koga-Ito C, Jorge A. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. Rev Odont UNESP 2007; 36(2): 163-8.
- Pinheiro E, Gomes B, Ferraz C, Souza E, Teixeira F, Souza-Filho F. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. I Endod J 2003; 36(1): 1-11.
- Pinheiro C, Guinesi A, Pizzolitto A, Bonetti-Filho I. *In vitro* antimicrobial activity of Acroseal, Polifil and Epiphany against *Enterococcus faecalis*. Braz Dent J 2009; 20(2): 107-11.
- Pirani C, Bertacci A, Cavrini F, Foschi F, Acquiva G, Prati C, Sambri V. Recovery of *Enterococcus faecalis* in root canal lumen of patients with primary and secondary endodontic lesions. New Microbiol 2008; 31(2): 235-240.
- Rôças I, Siqueira jr, J, Santos, K. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J Endod 2004; 30(5): 315-20.
- Sandini V, Queiroz M, Philipps M, Heil Jr D. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos á base de óxido de zinco e eugenol. J Bras Endodontia 2004; 5(17): 115-20.
- Schirrmeister J, Liebenow A, Pelz K, Wittmer A, Serr A, Hellwig E, Al-Abmad A. New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. J Endod 2009; 35(2): 169-74.
- Sedgley C, Lennan S, Appelbe O. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals *ex vivo*. I Endod J 2005; 38(10): 735-41.
- Senne M, Lemos N, Fidel S, Fidel R. Avaliação da citotoxicidade dos três cimentos endodônticos empregados na obturação do sistema de canais radiculares. Rev Sul-bras Odontol 2009; 6(1): 71-6.
- Shalhav M, Fuss Z, Weiss E. *In vitro* antibacterial activity of a glass ionomer endodontic sealer. J Endod 1997; 23(10): 616-9.
- Siqueira Jr. J, Gonçalves R. Antibacterial activities of root canal sealers against selected anaerobic bacteria. J Endod 1996; 22(2): 79-80.

Siqueira Jr, J, Favieri A, Gahyva S, Moraes S, Lima K, Lopes H. Antimicrobial Activity and Flow Rate of Newer and Established Root Canal Sealers. J Endod 2000; 26(5): 274-7.

Siqueira Jr J, Roças I, Lopes H. Materiais obturadores. In Lopes H, Siqueira Jr J. Endodontia: biologia e técnica. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010: 613-40.

Slutzky-Goldberg I, Slutzky H, Solomonov M, Moshonov J, Weiss E, Matalon S. Antibacterial properties of four endodontic sealers. J Endod 2008; 34(6): 735-8.

Soares J & Goldberg F. Endodontia: técnica e fundamentos. Porto Alegre: Artmed; 183-7, 2001.

Sydney G, Ferreira M, Deonizio M, Leonardi D, Batista A. Análise do perfil de escoamento de seis cimentos endodônticos. RGO 2009; 57(1): 7-11.

Tanomaru J, Tanomaru-Filho M, Hotta J, Watanabe E, Ito I. Antimicrobial activity of endodontic sealers base on calcium hydroxide and MTA. Acta Odontol Latinoam 2008; 21(2): 147-51.

Tanomaru-Filho M, Tanomaru J, Barros D, Watanabe E, Ito I. *In vitro* antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Porthand cement. J Oral Sci 2007; 49(1): 41-5.

Turk T, Sen B, Ozturk T. In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide mixed with different vehicles against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009; 108(2): 297-301.

Weiss E, Shalhav M, Fuss Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. Endod Dent Traumatol 1996; 12(4): 179-84.

Yassuda Y, Kamaguchi A, Saito T. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a new resin-based endodontic sealer against endodontic pathogens. J Oral Sci 2008; 50(3): 309-13.

Zhang H, Shen Y, Ruse D, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. J Endod 2009; 35(7): 1051-5.

ANEXO 1



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS

*Carta de Aprovação*

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1331 do Pesquisador Pedro Gregol da Silva intitulado "Avaliação da habilidade seladora frente à infiltração microbiana em diferentes técnicas de obturação dos canais radiculares", foi revisado por este comitê e aprovado em reunião ordinária no dia 27 de novembro de 2008, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. ~~Odair Pimentel Martins~~

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 28 de novembro de 2008.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187

APÊNDICE 1

**ESPECIFICAÇÃO DOS CIMENTOS OBTURADORES
UTILIZADOS NO EXPERIMENTO.**

NOME	FABRICANTE	COMPOSIÇÃO
ENDOFILL [®]	Dentsply – DeTrey CmbH D-78467 Konstanz - Suíça	Pó Protóxido de zinco.....40,5g Resina hidrogenada.....25,0 Subcarbonato de bismuto.....16,0 Sulfato de bário15,0 Borato de sódio anidro.....0,5 Líquido Eugenol.....5ml Óleo de amêndoas doces.....1ml
ENDOMETHASONE N [®]	Specialites Septodont-França	Pó Óxido de zinco.....417,0mg Dexametasona.....0,1mg Acetato de hidrocortisona...10,0mg Di-iodocortimol.....250,0mg Paraformaldeído.....22,0mg Óxido de chumbo.....50,0mg Sulfato de bário q.s.p.....1,0g Estearato de magnésio q.s.p.....1,0g Subnitrato de bismuto q.s.p.....1,0g Líquido Eugenol
SEALER 26 [®]	Dentsply, Indústria e comércio Ltda., Brasil	Pó Hidróxido de cálcio Óxido de bismuto Hexametileno tetramina Dióxido de titânio Resina Éter de bisfenol A diglicidil
AH-PLUS [®]	Dentsply – DeTrey CmbH D-78467 Konstanz - Suíça	Pasta A Resina epóxica Tungstato de cálcio Óxido de zircônio Aerosil Óxido de ferro.....4ml Pasta B Amina adamantana N,N`-Dibencil-5-oxanomano-diamina-1,9 TCD-Diamina Tungstênio de cálcio Óxido de zircônio Aerosil Óleo de silicone4ml

ACROSEAL [®]	Specialites Septodont-França	Pasta Base Enoxolona Metenamina Excipiente radiopaco Pasta Catalisadora Hidróxido de cálcio DGEBA Excipiente radiopaco
SEALAPEX [®]	Kerr/SybronEndo – USA	Pasta Base Óxido de cálcio Óxido de zinco Composto à base de sulfonamida Sílica Pasta Catalisadora Resina polimetileno metilsalicilato Dióxido de Titânio Sílica Salicilato de isobutila Pigmentos

APÊNDICE 2

MEIOS DE CULTURA

2.1 Brain Heart Infusion Broth (BHI) – Caldo Infusão Cérebro-Coração (Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK – CM 225)

2.1.1 Descrição:

Meio de infusão isotônico rico com triptose (uma mistura de carne e peptones do leite) promovendo uma ampla gama de substratos. Uma concentração baixa de glicose é utilizada para estimular crescimento precoce. O meio é ligeiramente tamponado para impedir a morte rápida de algumas espécies devido a produção de ácido. O meio é adequado para uso como meio de cultura para sangue ou como um caldo enriquecido para organismos fastidiosos.

2.1.2 método para reconstituição:

Dispensar 18,5g do pó em 500ml de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10min e depois dissolvida sob aquecimento brando antes de ser distribuída em tubos ou frascos. E esterelizada por autoclavagem a 121°C por 15 minutos. O superaquecimento irá causar caramelização e escurecimento do meio.

2.1.3 Aparência:

Amarela clara (sem adição do sangue).

2.1.4 Armazenagem do meio preparado:

Frascos com tampa: até 3 meses a 15-20°C no escuro.

2.1.5 Inoculação (como meio de cultura para sangue):

Usar um volume mínimo de 50ml de meio e adicionar o sangue numa diluição de 1:10 a 1:20. Usar em conjunto com um meio de cultura anaeróbico (ex. Fastidious Anaerobe Medium – CL 70-1).

2.1.6 Incubação:

37°C aerobicamente de 7 a 15 dias.

2.1.7 Interpretação de crescimento microbiano:

Observar diariamente as subculturas (1, 2, 3, 7 e 15 dias) ou imediatamente após haver sinal de crescimento microbiano.

2.1.8 Fórmula:

Infusão de sólidos de cérebro-coração.....	17,5g/l
Proteose peptona.....	10,0g/l
Glicose.....	2,0 g/l
Cloreto de sódio.....	5,0 g/l
Fosfato di-sódio.....	2,5 g/l

pH: 7,4 ± 0,2

2.2 Brain Heart Infusion Agar (BHIA) – Agar Infusão Cérebro-Coração (Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK – CM 375)

2.2.1 Descrição:

Ágar base para todos os usos.

Este meio foi desenvolvido inicialmente para o isolamento de patógenos orais. Com o acréscimo de 5% de sangue desfibrinado, o meio permitirá o crescimento de uma variedade ampla de organismos fastidiosos. O fosfato tamponado permite neutralizar os ácidos produzidos pela utilização da glicose e então manter a viabilidade. Este meio não é recomendado para a determinação de reações hemolíticas por conter glicose.

2.2.2 Métodos para reconstituição:

Dispensar 23,5g do pó em 500 ml de água em 500 ml de água deonizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 mm e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 mm e resfriada a 47°C antes de ser distribuída nas placas de petri.

2.2.3 Aparência:

Amarela clara (sem adição de sangue)

2.2.4 Armazenagem do meio preparado:

Placas: até 7 dias a 4°C no escuro.

Frascos com tampa: até 3 meses a 15-20°C no escuro.

2.2.5 Inoculação:

Em superfície, plaqueando para obter colônias puras.

2.2.6 Incubação:

Tempo e temperatura favorável aos microrganismos.

2.2.7 Características de crescimento:

Colônias brancas / transparentes em meio sem sangue.

2.2.7.1 Características de crescimento (com sangue desfibrinado)

Organismos	Tamanho da Colônia (mm)	Forma & Superfície	Cor
<i>S. aureus</i>	1,0 – 1,5	CV..B.	Branca/dourada
<i>S. milleri</i>	PG – 0,1	CV..B.	Transparente/branca
<i>E. faecalis</i>	1,0 – 1,25	CV..B.	Cinza/esverdeada
<i>S. pneumoniae</i>	0,5 – 1,0	A. .B.	Cinza/esverdeada

A – achatada; **B** – brilhante; **CV** – convexa; **I** – inteira; **PG** - pontiaguda

2.2.8 Fórmula

Infusão de sólidos de cérebro-coração.....	17,5g/L
Proteose peptona.....	10,0 g/L
Glicose.....	2,0 g/L
Cloreto de sódio.....	5,0 g/L
Fosfato disódico.....	2,5 g/L
Agar no. 2.....	10,0 g/L

pH: 7,4 ± 0,2

2.3 Mueller-Hinton Agar (MHA) - (Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, UK – CM 337)

2.3.2 Descrição:

Meio para testes de sensibilidade antimicrobiana onde se utilizar todas as técnicas estandardizadas reconhecidas internacionalmente como, por exemplo o método de difusão usando discos ou poços. Este meio, usado na técnica de Bauer-Kirby, foi adotado pelo ``National Committee for Clinical Laboratory Standards`` (NCCLS) nos EUA como um meio ideal para teste de suscetibilidade. O meio tem uma pequena quantidade de timina e timidina, permitindo seu uso nos testes de trimetropim e sulfonamida para assegurar os tamanhos corretos dos halos de inibição obtidos pelos antibióticos aminoglicosídeos e tetraciclina. Foi originalmente formulado como um meio para isolamento de espécies patogênicas de *Neisseria*.

2.3.2 Método para reconstituição:

Dispensar 19,0g do pó em 500mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 mm e depois agita. E esterelizada por autoclavagem a 121°C por 15 mm e refisada a 47°C. Misturar bem e distribuir nas placas de Petri.

2.3.3 Aparência:

Amarela clara (sem sangue)

2.3.4 Armazenagem do meio preparado:

Placas: até 7 dias a 4°C no escuro.

2.3.5 Inoculação:

Em superfície, de acordo com o NCCLS.

2.3.6 Incubação

37°C aerobicamente por 16-18 h

2.3.7 Fórmula

Carne de vaca, de infusão desidratada.....	300,0 g/L
Hidrolisado de caseína.....	17,5 g/L
Amino.....	1,5 g/L
Agar no.1.....	17,0 g/L
Íons cálcio.....	50-100mg/L
Íons magnésio.....	20-35mg/L

pH: 7,4 ± 0,2

APÊNDICE 3**MEDIDAS REALIZADAS COM OS CIMENTOS NOS MEIOS DE
CULTURA (CALDO TSB) COMO CONTROLE POSITIVO****TABELA 3.1** – Medidas dos cimentos no meio de cultura TSB utilizados como controle positivo.

Cimentos	Valores
1.Endofill	0,049
2.Acroseal	0,048
3.Sealapex	0,259
4.Sealer 26	0,053
5.Endomethasone N	0,055
6.AH plus	0,048