



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

JÉSSICA COELHO CAIRES

**ANÁLISE DA AÇÃO ANTIMICROBIANA, EM
DIFERENTES PERÍODOS, DO CIMENTO
ENDODÔNTICO ACROSEAL EM COMPARAÇÃO COM
SEALAPEX, APÓS O USO DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO,
SOBRE BIOFILME DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*.**

Araçatuba-SP

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

JÉSSICA COELHO CAIRES

**ANÁLISE DA AÇÃO ANTIMICROBIANA, EM
DIFERENTES PERÍODOS, DO CIMENTO
ENDODÔNTICO ACROSEAL EM COMPARAÇÃO COM
SEALAPEX, APÓS O USO DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO,
SOBRE BIOFILME DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*.**

Trabalho de Conclusão de Curso, como parte dos requisitos, para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientador: Prof. Adj. Dr. Rogério de Castilho Jacinto

Araçatuba-SP

2017

DEDICATÓRIA

A Deus, que foi meu guia durante as dificuldades e surpresas da vida. Obrigado, por ter me dado uma família maravilhosa, saúde e disposição. Por ter me protegido, ter me garantido serenidade, paciência e perseverança, abrindo-me as portas em todos os momentos em que precisava de luz. Obrigada por estar sempre em meu caminho e colocando ao meu lado pessoas que sempre ajudaram a me levantar nos momentos onde a queda fez parte do aprendizado em minha jornada. Por todas as graças concedidas, por saber que posso Te encontrar em todos os momentos de minha vida, por não permitir que desistisse nesta longa caminhada, por me manter sempre nos melhores caminhos.

À minha família, pelo amor incondicional, pela confiança e por todos os exemplos de humildade, respeito, dedicação e coragem que me deram. Sem vocês não teria conseguido chegar até aqui. Obrigada por, mesmo longe, serem meu porto seguro e minha fonte de amor inesgotável. Agradeço todos os dias a Deus por ter me dado uma mãe maravilhosa, que sempre fez o possível e impossível para que eu e meus irmãos estivéssemos bem. Minha eterna gratidão a vocês que sempre estiveram ao meu lado me incentivando. Que por meio de muita renúncia, enorme incentivo e imenso amor compreenderam as minhas escolhas e tornaram possível esta conquista. Que nunca mediram os esforços para me proporcionar tudo o que fosse realmente importante. Obrigada pela paciência, ajuda, pelas orações e amor único na conquista de mais uma etapa. Espero poder retribuir tudo o que fizeram e fazem por mim. Jamais existirão palavras que descreva tudo o que representam para mim! Tenho orgulho de fazer parte dessa família, que são meus maiores exemplos de vida! Amo muito vocês.

Aos meus colegas e amigos, obrigada pela amizade sincera e pelo carinho de sempre! Estendo este agradecimento a todos que de alguma forma sonharam este sonho comigo

e tiveram a oportunidade de vivê-lo. Meus sinceros agradecimentos. Nada seria possível sem vocês!

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Adj. Dr. Rogério de Castilho Jacinto**, pela disponibilidade, oportunidade de convivência e por todo conhecimento partilhado. Agradeço imensamente pela confiança, paciência, preocupação e carinho comigo.

À **Gabriely Rezende**, por sua disponibilidade em me ajudar nesta pesquisa. Agradeço imensamente pela confiança, paciência, preocupação e carinho comigo.

Ao **Prof. Dr. Glauco Miyahara**, pelo constante apoio, carinho e amizade. Também o considero como orientador e vou sempre lembrar os seus conselhos e ensinamentos. Muito obrigada pela sua compreensão e apoio durante este curso.

Aos professores **Dr. Daniel Bernabé**, **Dr. Éder Biasoli**, **Dra. Janáina Zavistoski** e **Dra. Suzy**, agradeço pelos conhecimentos partilhados sempre, por seus ensinamentos transmitidos com a sabedoria e simplicidade de grandes mestres. Jamais esquecerei tudo o que fizeram e fazem por seus alunos, nos ensinando sempre, pelo carinho e pela amizade!

À professora **Dra. Sônia Regina P. Barioni**, pela oportunidade de convivência e privilégio de aprender diariamente. Levarei para sempre seu exemplo de profissionalismo, ética, dedicação e humanidade.

À aluna de iniciação científica **Jaqueline Barbosa**, e a todos do **Departamento de Odontologia Restauradora** por dividirem comigo a experiência com as pesquisas na área de endodontia, por toda ajuda e auxílio. Obrigada pela sempre agradável convivência que tivemos.

À **Disciplina de Odontopediatria** pela disponibilidade de seus equipamentos utilizados durante a pesquisa, assim como seus alunos e técnicos pelas experiências compartilhadas durante este processo.

Aos amigos que a Odontologia me deu, pelos bons momentos vividos. À turma 59, minha turma querida, na qual passei esses anos inesquecíveis da minha vida. Um agradecimento especial para meus amigos, **Lara, Laís, Paloma, Luiza, Sandy, Isabela, Erika, Karen, Letícia Brasil, Daniela Alvim, Jéssica Ferreira, Iana, William, Morgana, Camila, Jéssica Galbiati, Anelise, Ana Beatriz, Jaqueline Nakao, Amanda Fioravante, Marina, Pedro, Jéssica Bugiga**. A amizade de vocês é muito importante e será algo que levarei no meu coração, por toda a minha vida! Vocês contribuíram muito em todo meu aprendizado e caminhada nestes anos. Agradeço pela oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas e pela amizade de cada um de vocês.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, na pessoa do diretor **Prof. Titular Wilson Roberto Poi** e do Senhor Vice-Diretor **Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho** por proporcionarem a realização desta pesquisa e crescimento profissional, pela oportunidade de realização do curso de Graduação.

A todos os funcionários de todos os setores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por proporcionarem o conforto e o bom funcionamento desta instituição.

Aos professores da Graduação da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, pelos ensinamentos durante todo o decorrer do curso.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram durante todo o decorrer do curso e que passaram em minha vida e colaboraram no desenvolvimento da pessoa que hoje sou.

Mais uma vez, agradeço a **Deus**, ser superior, por ter me concedido essa oportunidade e ter colocado todas essas pessoas maravilhosas em meu caminho.

OBRIGADA!

CAIRES, J.C. **Análise da ação antimicrobiana, em diferentes períodos, do cimento endodôntico Acroseal em comparação com Sealapex, após o uso de hidróxido de cálcio sobre biofilme de *Enterococcus faecalis*.** 2017. 31 f. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

O insucesso do tratamento endodôntico está relacionado com a persistência de infecções no sistema de canais radiculares. O uso de cimentos endodônticos com ação antimicrobiana auxilia na eliminação de microrganismos remanescentes. Entretanto estudos têm mostrado que o uso prévio de medicação intracanal, como o hidróxido de cálcio, aumenta o índice de sucesso do tratamento endodôntico. Diante dessa realidade, o presente estudo teve por objetivo avaliar comparativamente a ação antimicrobiana dos cimentos endodônticos Acroseal e Sealapex pós-presas, após o uso de hidróxido de cálcio em um modelo de biofilme *in vitro*. Para a realização do estudo foram confeccionados espécimes de dentina que permaneceram em placas contendo meio de cultura inoculado com *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) para permitir a formação de biofilme. Decorridos o período de formação, os espécimes foram lavados em solução salina e transferidos para outra placa onde foram colocados em contato com uma solução saturada de hidróxido de cálcio por 14 dias. Após esse período, os espécimes foram lavados em solução salina, e transferidos para uma nova placa onde os discos dos cimentos a serem testados foram colocados sobre o biofilme. As placas de cultura foram deixadas em estufa a 37°C por 7 e 14 dias. Espécimes sem aplicação dos cimentos e sem aplicação do hidróxido de cálcio foram utilizados como controle para cada tempo experimental. Após cada tempo experimental de contato com o cimento, os espécimes foram lavados em solução salina, agitados em vortex, diluídos e plaqueados em triplicata em meio de cultura específico. As unidades formadoras de colônias foram contadas, e os dados analisados estatisticamente usando one-way ANOVA, Shapiro-Wilk and Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) para determinar o potencial antimicrobiano. O Sealapex após o uso de hidróxido de cálcio mostrou diferença estatística em todos os tempos avaliados, em comparação com os outros grupos, em relação à atividade antimicrobiana. Nenhum dos materiais testados foi capaz de eliminar

completamente o biofilme. Em conclusão, o uso do hidróxido de cálcio mostrou melhores resultados quando associados com o Sealapex.

Palavras-chave: Endodontia, Cimentos Endodônticos, Hidróxido de Cálcio, Biofilme, *Enterococcus faecalis*.

CAIRES, J.C. **Analysis of the antimicrobial action, in different periods, of the endodontic sealer Acrosal in comparison with Sealapex, after the use of calcium hydroxide on Biofilm of *Enterococcus faecalis***. 2017. 31 f. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

ABSTRACT

Failure of the endodontic treatment is related to the persistence of infection in the root canal system, thus the use of sealers with antimicrobial activity can help eliminating the remnants microorganism. However, studies have shown that the previous use of intracanal medication show best results. Given that, the present study aimed at comparing the antimicrobial activity of the root canal sealers Acroseal and Sealapex after setting, after the use of calcium hydroxide in an *in vitro* biofilm model. For the study dentin specimens were prepared, which remained in plates containing a culture medium inoculated with *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) to allow biofilm formation. After 14 days, the samples were washed in saline and they were transferred to other plate, which were placed in contact with a saturated solution of calcium hydroxide for 14 days. After this period, the specimens were washed in saline and they were transferred to other plate where the disks of sealer to be tested were placed on the biofilm. The culture plates were kept at 37°C for 7 and 14 days. Samples without sealers and calcium hydroxide were used as control for each experimental time. After each experimental time, the samples were washed in saline, agitated in vortex and the suspensions serially diluted, and spread in triplicate in specific medium. Colony forming units were counted, and the data were statistically analyzed using one-way ANOVA, Shapiro-Wilk and Kruskal-Wallis tests ($p < 0.05$) to determine antimicrobial potential. Sealapex after use calcium hydroxide showed significant differences at all the experimental time points, in comparison with all the other groups, in relation to the antimicrobial activity. Neither of the materials tested were able to completely eliminate the biofilm. In conclusion the use of calcium hydroxide showed better results when associated with Sealapex.

Key words: Endodontic, Dental Cements, Calcium Hydroxide, biofilm, *Enterococcus faecalis*.

LISTA DE ABREVIATURAS

UNESP	Universidade Estadual Paulista
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Prof.	Professor
Ass.	Assistente
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
Adj.	Adjunto
Tit.	Titular
SP	São Paulo
ATCC	American Type Culture Collection/ Coleção Americana de Culturas
°C	Graus Celsius
ml	Mililitro
P. A	Alta Pureza
BHI	Infusão Cardíaca Cerebral
CFU/UFC	Unidades Formadoras de Colônias
ADT	Teste de Difusão em Agar
DCT	Teste de Contato Direto
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
mm	Milímetros
g	Gramas
ph	Potencial hidrogeniônico
min	Minutos
nm	Nanômetros
µL	Micrometros
%	Porcentagem
Log	Logaritmo
Hc	Hidróxido de cálcio
Se	Sealapex
Ac	Acroseal

Lista de Tabelas

Tabela 1. Grupos experimentais e seus tempos experimentais.....	18
Tabela 2. Média, desvio padrão e mediana de UFC (UFC ml ⁻¹) nos diferentes grupos e períodos.....	22

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVO	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1.	MATERIAIS EXPERIMENTAIS.....	17
3.1.1.	CIMENTO ACROSEAL.....	17
3.1.2.	CIMENTO SEALAPEX.....	17
3.1.3.	SOLUÇÃO SATURADA DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO.....	18
3.2.	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	18
3.3.	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM MODELO DE BIOFILME.....	19
3.3.1.	OBTENÇÃO E PREPARO DOS BLOCOS DE DENTINA.....	19
3.3.2.	CONDIÇÃO DE CRESCIMENTO DO ENTEROCOCCUS FAECALIS.....	19
3.3.3.	FORMAÇÃO DO BIOFILME DE ENTEROCOCCUS FAECALIS.....	20
3.3.4.	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	20
3.3.5.	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS SUSPENSÕES DE MICRORGANISMOS TOTAIS.....	20
3.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
4	RESULTADOS.....	22
5	DISCUSSÃO.....	23
6	CONCLUSÃO.....	26
7	REFERÊNCIAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

Eliminar os microrganismos presentes no sistema de canais radiculares através da instrumentação, irrigação, medicação intracanal e obturação são objetivos do tratamento endodôntico. Entretanto, os microrganismos não são totalmente eliminados (Mickel et al., 2003). Microrganismos comumente recuperados dos casos de falhas do tratamento endodôntico são *Enterococcus faecalis* (Sundqvist et al., 1998). O *E. faecalis* é um coco Gram-positivo, anaeróbio facultativo que possui a capacidade de sobreviver em pH alcalino (11,5) (McHugh et al., 2004), invadir e viver dentro de túbulos dentinários (Love, 2001) e permanecer longos períodos sem nutrientes (Figdor & Sundqvist, 2003). Além disso, o *E. faecalis* pode formar biofilme tornando-o mais resistente aos agentes antimicrobianos (Distel et al., 2002), por essas razões é um dos microrganismos mais estudados na área da endodontia.

Assim, o uso de materiais obturadores com ação antimicrobiana pode auxiliar a eliminar microrganismos que resistiram ao tratamento endodôntico (Zhang et al., 2009). Atualmente diversos tipos de cimentos obturadores estão disponíveis no comércio, como cimentos a base de hidróxido de cálcio (Sealapex e Acroseal). A atividade antimicrobiana do Acroseal e Sealapex já foi relatada contra *E. faecalis* em teste de contato direto (Heyder et al., 2013). Propriedades antimicrobianas contra o *E. faecalis* também foram encontradas para o Sealapex (Faria-Júnior et al., 2013) e Acroseal (Pinheiros et al., 2009).

Embora os cimentos endodônticos Acroseal e Sealapex tenham demonstrado atividade antimicrobiana contra o *E. faecalis*, nenhum desses cimentos foram capazes de eliminar o biofilme após 14 dias de contato direto. Estudos elaborados em dentes de cães mostraram que o uso de hidróxido de cálcio por 14 dias, prévio a obturação mostraram melhores resultados, quando comparados ao tratamento em sessão única (Holland et al., 2003). O hidróxido de cálcio libera íons cálcio e hidroxila que difundem nos túbulos dentinários (Wakabayashi et al., 1995) e o cálcio se liga ao CO₂ necessário para a respiração

bacteriana (Eldeniz et al., 2007). Além disso, o hidróxido de cálcio altera as propriedades biológicas dos lipopolissacarídeos das paredes celulares de bactérias Gram-negativas (Safavi & Nichols, 1994) inativando mecanismos de transporte de membrana, resultando na toxicidade celular (Estrela et al., 2008). Assim o uso do hidróxido de cálcio por 14 dias prévio a obturação pode diminuir o número de microrganismos presentes no sistema de canais radiculares.

Com isso o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação antimicrobiana dos cimentos endodônticos Acroseal e Sealapex pós presa, após o uso de hidróxido de cálcio por 14 dias, sobre biofilme de *E. faecalis*.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente a ação antimicrobiana dos cimentos endodônticos Acroseal e Sealapex pós-presa, após o uso de hidróxido de cálcio em um modelo de biofilme monoespécie *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais Experimentais

Foram empregados os cimentos endodônticos Acroseal (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, França) e Sealapex (Sybron Kerr Co, Romulus, Estados Unidos). Discos dos cimentos selecionados foram preparados em moldes de silicone (7,0 x 1,0 mm). Os discos foram mantidos em estufa a 37°C com 100% de umidade para tomar presa por 2 dias antes de serem aplicados sobre o biofilme. Biofilme não exposto a nenhum cimento foi usado como controle para todos os tempos experimentais.

3.1.1 Cimento Acroseal

Composição do Cimento Acroseal:

Base: TCD-diamina, carbonato de bismuto, Colofane esterificada e Aerosil 200.

Catalisador: hidróxido de cálcio, DGBASub-carbonato de bismuto e Pigmento Amarelo 10.

Protocolo de preparo do Cimento Acroseal:

Sobre o bloco de espatulação, foram colocadas duas porções iguais da BASE e de CATALIZADOR extraídas de cada um dos tubos, as quais foram espatuladas até a obtenção de uma consistência homogênea.

3.1.2 Cimento Sealapex

Composição do Cimento Sealapex:

Resina Isobutil salicilato, sílica coloidal (dióxido de silício), trióxido de bismuto, pigmento de dióxido de titânio.

N-etil resina solfanamida tolueno, sílica coloidal (dióxido de silício), zinco, óxido de cálcio.

Protocolo do Cimento Sealapex:

Porções de base e catalisador, iguais em comprimento, serão misturadas por 15-20 segundos ou até que sejam completamente homogeneizadas. A espatulação foi feita em movimentos circulares, pressionando-se a espátula com firmeza.

3.1.3 Solução Saturada de Hidróxido de Cálcio:

Composição da Solução de Hidróxido de Cálcio:

Hidróxido de cálcio e água destilada.

Protocolo de preparo da Solução de Hidróxido de Cálcio:

Foi colocado 0,1g de hidróxido de cálcio P.A. e 1 ml de água destilada estéril em tubo de ensaio estéril, misturado e levado para agitadora a uma temperatura de 37°C por 24h.

3.2 Grupos experimentais

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

Tabela 1. Grupos experimentais e seus tempos experimentais:

Materiais	Tempos Experimentais (Dias)	
	Sealapex	7
Acroseal	7	14
Hidróxido de Cálcio + Sealapex	7	14
Hidróxido de Cálcio + Acroseal	7	14
Sem nenhum material	7	14

FONTE: Elaborada pelo autor

Os tempos experimentais indicam o tempo em dias que as amostras ficaram expostas aos materiais experimentais. Amostras adicionais foram utilizadas como controle positivo (contaminadas) e controles negativo (não contaminadas) mantidos em solução salina.

3.3 Análise da atividade antimicrobiana em modelo de biofilme

3.3.1 Obtenção e preparo dos blocos de dentina

Para a realização deste estudo foram obtidos dentes incisivos de bovinos com idade aproximada de três anos. Estes dentes foram mantidos em timol 2% pH 7,0 durante 30 dias antes de qualquer procedimento experimental. Blocos de dentina (4x4x1 mm) foram obtidos a partir da porção mais plana da raiz do dente. Em seguida, realizou-se o ajuste da dentina para obtenção de superfícies planas com auxílio da politriz APL-4 AROTEC e lixas de granulação 400. Durante todos os procedimentos e entre um passo e outro, os blocos foram mantidos em ambiente umedecido com timol 2% pH 7,0. Para cada material experimental e em cada tempo experimental foram confeccionados 12 blocos de dentina, totalizando 80 blocos para cada cepa padrão de *E. faecalis*. Os blocos resultantes (substratos para crescimento do biofilme) foram colocados em um tubo de ensaio contendo água destilada e esterilizado em autoclave à 121°C por 20 min (Faria-Júnior et al., 2013).

3.3.2 Condição de crescimento do *Enterococcus faecalis*

As cepas padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foram primeiramente plaqueadas em meio de cultura BHI ágar (Brain Heart Infusion) (HIMEDIA, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, India) e deixadas em estufa à 37°C, por 24 a 48 horas. Após esse período, uma colônia de *E. faecalis* foi inoculada em 5mL de meio de cultura BHI caldo (HIMEDIA, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, India) e mantidas em estufa à 37°C overnight para permitir o crescimento microbiano (Kimyai et al., 2011).

Após o crescimento overnight, 50µl da cultura de *E. faecalis* foi resuspendida em 5ml de meio de cultura fresco BHI caldo (HIMEDIA, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, India), em seguida a densidade óptica foi ajustada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550nm

(Espectrofotômetro UV/Vis – 1800, Shimadzu Corporation, Nakagyo-Ku, Kyoto, Japão), para obtenção de concentrações de 10^7 CFU/mL (Faria-Júnior et al., 2013).

3.3.3 Formação do biofilme de *E. faecalis*

Para a formação do biofilme, os blocos de dentina foram colocados de forma asséptica em placas de cultura com 24 poços (TPP Techno Plastic Products AG, Suíça), onde foram adicionados 200 μ L da suspensão com a concentração conhecida de *E. faecalis* (10^7 CFU/mL) preparado previamente e acrescentando 1,8mL de meio de cultura fresco BHI caldo (HIMEDIA, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, India). As placas de cultura foram incubadas a 37°C por 14 dias e o meio de cultura foi completamente trocado a cada 48 horas, sem adição de novos microrganismos (Faria-Júnior et al., 2013).

3.3.4. Atividade antimicrobiana

Decorridos o período de formação de biofilme, as amostras foram lavadas uma vez com 2 mL de solução salina a 0,9% para eliminar o meio de cultura e as bactérias não aderidas (Kimyai et al., 2011). Os espécimes foram transferidos para outra placa onde foram deixadas em contato com 2 ml de solução saturada de hidróxido de cálcio (pH 12,5) (Merck, Darmstadt, Germany) (Brändle, 2008) por 14 dias em estufa a 37°C. Após esse período, as espécimes foram lavadas em 2 ml de solução salina e transferidas para uma nova placa onde os discos dos cimentos a serem testados (Acroseal e Sealapex) foram colocados sobre o biofilme formado. As placas de cultura foram deixadas em estufa a 37°C por 7 e 14 dias. Espécimes sem aplicação dos cimentos foram utilizados como controle para cada tempo experimental. Após cada tempo experimental de contato com o cimento, as amostras foram lavadas uma vez com 2 mL de solução salina 0,9%.

Os espécimes de *E. faecalis* foram transferido para outro frasco contendo 1 mL de solução salina e agitadas em vortex por 1 minuto para que os microrganismos a eles aderidos fossem transferidos para a solução salina (Fária-Junior et al., 2013). As suspensões foram então agitadas em vortex durante 30 segundos e foi realizada uma diluição seriada decimal em solução salina.

3.3.5 Análise microbiológica das suspensões de microrganismos totais

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

Para a determinação do número de microrganismos, 3 gotas de 10 μ L das diluições pré-estabelecidas foram inoculadas pela técnica da semeadura por gotas, em triplicata, na superfície de placas de Petri contendo o meio de cultura específico para cada espécime.

Quando as gotas estavam secas, as placas foram incubadas durante 24-48h a 37°C para a contagem de bactérias viáveis. As colônias resultantes foram contadas (foram contadas apenas as gotas que apresentarem um número entre 3 e 30 colônias) e transformadas em Log₁₀ UFC e padronizados de acordo com a área dos espécimes (Log₁₀ UFC/cm²).

3.4 . Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA). A média de UFC do biofilme de cada grupo foi calculada. Os dados foram analisados usando um modelo de One-Way ANOVA e Shapiro-Wilk, quando a amostra não foram distribuídos normalmente, e as variações não eram iguais. O teste unidirecional de Kruskal-Wallis também foi usado. Os dados encontrados foram submetidos à análise estatística com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

A tabela 2 mostra a média, desvio padrão e mediana de UFC/ml⁻¹ após 7 e 14 dias em contato direto com os materiais testados. A comparação entre os grupos revelou que o Sealapex reduziu *E. faecalis* nos períodos avaliados, com e sem a aplicação previa do hidróxido de cálcio. Entretanto, o uso prévio da aplicação do hidróxido de cálcio por 14 dias no grupo do Sealapex mostrou uma maior redução microbiana quando comparada com o cimento sozinho. Já quando comparado com o uso do hidróxido de cálcio previamente ao cimento Acroseal, observou-se que não houve diferença estatística com grupo do Acroseal sozinho em nenhum dos períodos avaliados.

Tabela 2. Média, desvio padrão e mediana de UFC (UFC ml⁻¹) nos diferentes grupos e períodos:

Grupos	7 dias	Mediana (7dias)	14 dias	Mediana (14 dias)
Controle	2,7 x 10 ⁵ (±9,1x10 ⁴) A, a	2,1x10 ⁶	6,1 x 10 ⁵ (±8,9x10 ⁵) A, a	4,8x10 ⁶
Acroseal	3,7 x 10 ⁵ (±2,6x10 ⁵) A, a	3,0x10 ⁶	4,6 x 10 ⁴ (±4,9x10 ⁴) A, b	3,5x10 ⁵
Sealapex	5,9 x 10 ³ (±1,5x10 ⁴) B, a	4,7x10 ⁴	1,9 x 10 ³ (±2,8x10 ³) B, a	1,5x10 ⁴
Hc + Ac	7,1 x 10 ⁴ (±6,3x10 ⁴) A, a	8,3x10 ⁴	1,4 x 10 ⁵ (±1,6x10 ⁵)A, a	1,1x10 ⁶
Hc + Se	1,3 x 10 ³ (±1,4x10 ³) B, a	1,0x10 ⁴	3,7 x 10 ² (±5,2x10 ²)B, b	3,0x10 ³

FONTE: Elaborada pelo autor

* Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas (p <0,05) entre os grupos.

* Diferentes letras minúsculas indicam diferenças estatísticas (p<0,05) entre os períodos de tempo.

5. DISCUSSÃO

Cimentos endodônticos com atividade antimicrobiana como o Sealapex e Acroseal podem ajudar a eliminar os microrganismos que sobreviveram ao tratamento endodôntico. Entretanto estudos recentes demonstraram que o *E. faecalis* não pode ser completamente eliminados mesmo após 14 dias de contato direto com esses cimentos (REZENDE et al., 2016). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana do Sealapex e Acroseal após o uso prévio de hidróxido de cálcio sobre biofilme de *E. faecalis* nos períodos de 7 e 14 dias. Para esse trabalho foi utilizado o teste de contato direto para avaliar a ação da atividade antimicrobiana dos materiais testados, pois embora o teste de difusão em ágar tenha sido muito utilizado é um teste pouco sensível, onde os resultados dependem da difusão e propriedades físicas dos materiais testados. Já o teste de contato direto foi projetado para superar essas limitações para avaliar as atividades antibacterianas in vitro de numerosos selantes endodônticos (SALEH et al., 2004 e KAYAOGLU et al., 2005).

O *Enterococcus faecalis* é um microrganismos resistentes que esta frequentemente relacionado a infecções endodônticas primárias ou reinfecção de canais radiculares previamente tratados endodonticamente, devido a sua resistência aos medicamentos intracanaís e por ser encontrado em biofilmes, juntamente com outros microrganismos ou isolados. (KUMAR et al., 2015 e BENBELAÏD et al., 2014 e VIVACQUA-GOMES et al., 2005).

O Sealapex é um cimento à base de hidróxido de cálcio que nesse estudo mostrou atividade antimicrobiana maior do que o Acroseal, resultados que apoiam estudos anteriores que encontraram excelente atividade antimicrobiana nos período de 24h, 48h, 72h e 7 dias por difusão em ágar (AAL-SARAJ et al., 2012 e BODRUMLU et al., 2006 e QUEIROZ et al., 2009 e SIPERT et al., 2005) e em teste de contato direto no período de 24h contra *E. faecalis* (HEYDER et al., 2013). Sealapex mostrou atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* após 7 e 14 dias concordando com Zhang et al., que relataram que Sealapex possuía o efeito antimicrobiano maior contra *E. faecalis* após 7 dias em contato direto. Resultados

semelhantes foram encontrados por Faria-Junior et al, com metodologia similar neste estudo, usando teste de contato direto contra o biofilme de *E. faecalis* e mostrou que Sealapex foi associado com uma redução maior do que os outros materiais em 7 dias em comparação com o grupo controle. A ionização pode ser responsável pela atividade antimicrobiana de Sealapex que libera os íons hidroxila aumentando o pH e deixando o ambiente desfavorável ao crescimento de microrganismos (WANG et al., 2014). SCHÄFER et al., mostraram que Sealapex era significativamente mais solúvel em água, o que pode explicar a ação antimicrobiana de Sealapex após 2 dias.

Acroseal também é um selador à base de hidróxido de cálcio, mas no presente estudo não mostrou atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*, discordando do resultado encontrado por Pinheiro et al., que ao realizarem um experimento por teste de difusão em ágar com o Acroseal encontrou atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* após 48h. Os diferentes resultados podem ser explicados pelas diferentes metodologias empregadas. A atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos à base de hidróxido pode ser causada pela liberação de íons hidroxila, que tornam o meio alcalino. No entanto, o Acroseal apresenta menor quantidade de liberação de íons de cálcio e hidroxila, devido à relativa insolubilidade de seus compostos (ELDENIZ et al., 2007) . A baixa solubilidade do Acroseal e a solubilidade do Sealapex podem explicar a diferença da eficácia desses cimentos contra *E. faecalis* apesar de ambos serem cimentos à base de hidróxido de cálcio.

Apesar dos cimentos Acroseal e Sealapex reduzirem a contagem de microrganismo, nenhum dos cimentos avaliados eliminaram completamente o biofilme de *E. faecalis*. Por essa razão, o presente estudo avaliou se o uso de hidróxido de cálcio prévio a aplicação dos cimentos reduz a contagem de microrganismo. O hidróxido de cálcio é um medicamento intracanal muito utilizado devido seu efeito antibacteriano, proporcionado pela liberação de íons hidroxila, aumentando o pH do meio ambiente (AHANGARI et al., 2017). Além disso, o hidróxido de cálcio pode induzir monócitos e desencadear a liberação do fator de necrose tumoral α (TNF α), prostaglandina E2 (PGE2) que são responsáveis pela

destruição do TA e seus efeitos sobre o componente LPG de bactérias gram-negativas (SAFAVI et al., 1993 e BARTHEL et al., 1997).

Nesse estudo o uso prévio de hidróxido de cálcio melhorou a eficácia antimicrobiana apenas após o uso do Sealapex. Acreditamos que o pH alcalino provocado pelo hidróxido de cálcio inicialmente, manteve a alcalinidade alcançada na presença do Sealapex. Como foi dito anteriormente o Sealapex é um cimento a base de hidróxido de cálcio, e que por ser um material com solubilidade libera íons hidroxila e aumenta o pH do meio. Levando em consideração que o hidróxido de cálcio após 14 dias deixa o meio com um pH entre 12-13 (BAUMGARTNER et al., 2006), o uso de um cimento que também mantém o pH alcalino tornaria o meio inviável para a sobrevivência bacteriana.

6. CONCLUSÃO

O uso prévio do hidróxido de cálcio por 14 dias in vitro reduziu o número de *E. faecalis* em todos os períodos avaliados quando o cimento Sealapex foi utilizado. Já quando o Acroseal foi utilizado, o uso prévio do hidróxido de cálcio como medicação, não resultou na redução do *E. faecalis* em nenhum tempo avaliado.

7. Referências

AAL-SARAJ AB, ARIFFIN Z, MASUDI SM. An agar diffusion study comparing the antimicrobial activity of Nanoseal with some other endodontic sealers. Aust Endod J. 2012 ;38(2):60-63

AHANGARI Z, MOJTAHED BIDABADI M, ASNAASHARI M, RAHMATI A, TABATABAEI FS. Comparison of the antimicrobial efficacy of calcium hydroxide and photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in teeth with periapical lesions; an in vivo study. J Lasers Med Sci. 2017;8(2):72-78.

BAUMGARTNER JC, SIGUEIRA JF, COHEN S, HARGREAVES KM. Pathways of the Pulp. St Louis: Mosby; 2006.

BARTHEL CR, LEVIN LG, REISNER HM, TROPE M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated Escherichia coli LPS. Int Endod J. 1997;30(3):155–159

BENBELAÏD F, KHADIR A, ABDOUNE MA, BENDAHOU M, MUSELLI A, COSTA J. Atividade antimicrobiana de alguns óleos essenciais contra o *Enterococcus faecalis* múltiplo resistente a múltiplos medicamentos, tanto no estado planctônico quanto no biofilme. Asian Pac J Trop Biomed. 2014; 4): 463-472.

BODRUMLU E, SEMIZ M. Antibacterial activity of a new endodontic sealer against *Enterococcus faecalis*. J Can Dent Assoc. 2006;72:637

BRÄNDLE N, ZEHNDER M, WEIGER R, WALTIMO T. Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. J Endod. 2008;34:579-582.

DISTEL JW, HATTON JF, GILLESPIE MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002; 28: 689–693.

ELDENIZ AU, 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.

ESTRELA C, PIMENTA FC, ITO IY, BAMMANN LL. In vitro determination of the direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. *J Endod* 1998;24:15–7.

FARIA-JÚNIOR NB, TANOMARU-FILHO M, BERBERT FL, GUERREIRO-TANOMARU JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J.* 2013;46:755-62.

FIGDOR D, DAVIES JK, SUNDQVIST G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 234–239.

HEYDER M, KRANZ S, VÖLPEL A, PFISTER W, WATTS DC, JANDT KD, ET AL. Antibacterial effect of different root canal sealers on three bacterial species. *Dent Mater.* 2013;29:542-549.

HOLLAND R, OTOBONI FILHO JA, DE SOUZA V, NERY MJ, BERNABÉ PF, DEZAN E JR. A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs' teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2003;29:121-124.

KAYAOGLU G, ERTEN H, ALACAM T, ORSTAVIK D. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2005;38:483–488.

KIMYAI S , LOTFIPOUR F , POURABBAS R , SADR UM , NIKAZAR S , MILANI M . Effect of two prophylaxis methods on adherence of *Streptococcus mutans* to microfilled composite resin and giomer surfaces. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16:e561-567.

KUMAR J, SHARMA R, SHARMA M, PRABHAVATHI V, PAUL J, CHOWDARY CD. Presença de *Candida albicans* nos canais radiculares dos dentes com periodontite apical e avaliação do seu possível papel na falha no tratamento endodôntico. *J Int Saúde bucal*. 2015; 7: 42-45.

LOVE RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J*. 2001;34:399–405.

MCHUGH CP, ZHANG P, MICHALEK S, ELEAZER PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod*. 2004; 30 :218-219.

MICKEL AK, NGUYEN TH, CHOGLE S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2003;29:257-258.

PINHEIRO CR, GUINESI AS, PIZZOLITTO AC, BONETTI-FILHO I. In vitro antimicrobial activity of Acroseal, Polifil and Epiphany against *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent J*. 2009;20:107-111.

QUEIROZ AM, NELSON-FILHO P, SILVA LA, ASSED S, SILVA RA, ITO IY. Antibacterial activity of root canal filling materials for primary teeth: zinc oxide and eugenol cement, Calen paste thickened with zinc oxide, Sealapex and EndoREZ. *Braz Dent J*. 2009;20:290-296.

REZENDE GC, MASSUNARI L, QUEIROZ IO, GOMES FILHO JE, JACINTO RC, LODI CS, DEZAN JUNIOR E. Antimicrobial action of calcium hydroxide-based

endodontic sealers after setting, against *E. faecalis* biofilm. *Braz Oral Res.* 2016;30. pii: S1806-83242016000100228.

SAFAVI KE, NICHOLS FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment *J Endod.* 1994;20:127–129.

SAFAVI KE, NICHOLS FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod.* 1993;19:76–78.

SALEH IM, RUYTER IE, HAAPASALO M, ØRSTAVIK D. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro. *Int Endod J.* 2004;37:193-198.

SCHÄFER E, ZANDBIGLARI T. Solubility of root-canal sealers in water and artificial saliva. *Int Endod J.* 2003;36:660-669

SETYA G, NAGPAL A, KUMAR S, INGLE NA. Comparison of root canal sealer distribution in obturated root canal: An in-vitro study. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2014;4:193-197.

SIPERT CR, HUSSNE RP, NISHIYAMA CK, TORRES SA. In vitro antimicrobial activity of Fill Canal, Sealapex, Mineral Trioxide Aggregate, Portland cement and EndoRez. *Int Endod J.* 2005;38:539-43

SIQUEIRA Jr. JF, UZEDA M. Disinfection by calcium hydroxide paste of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod* 1996; 22:674-676.

SUNDQVIST G, FIGDOR D, PERSSON S, SJOGREN U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1998;85:86–93.

VIVACQUA-GOMES N, GURGEL-FILHO ED, GOMES BP, FERRAZ CC, ZAIA AA, SOUZA-FILHO FJ. Recuperação de *Enterococcus faecalis* após tratamentos do canal radicular de uma única ou múltipla visita realizados em dentes infectados ex vivo. *Int Endod J*. 2005; 38 : 697-704.

WANG Z, SHEN Y, HAAPASALO M. Dentin extends the antibacterial effect of endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod*. 2014 Apr;40:505-508.

WAKABAYASHI H, MORITA S, KOBAYASHI K, TACHIBANA H, MATSUMOTO K. Effect of calcium hydroxide paste dressing on uninstrumented root canal wall. *J Endod* 1995;21:543–545.

ZHANG H, SHEN Y, RUSE ND, HAAPASALO M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2009; 35:1051-1055.

