



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



ROBERTO ALMELA HOSHINO

**PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS, ANTIMICROBIANAS E BIOLÓGICAS DE
CIMENTOS ENDODÔNTICOS COM ÓXIDO DE CÁLCIO E RESINA
SALICILATO.**



0510002326

Araraquara

2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



ROBERTO ALMELA HOSHINO

PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS, ANTIMICROBIANAS E BIOLÓGICAS DE
CIMENTOS ENDODÔNTICOS COM ÓXIDO DE CÁLCIO E RESINA
SALICILATO.



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Orientador: *Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho*

Araraquara

2016

n.º ch.	
TOMBO	2326

Hoshino, Roberto Almela

Propriedades físicas, químicas, antimicrobianas e biológicas de cimentos endodônticos com óxido de cálcio e resina salicilato / Roberto Almela Hoshino.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

52 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho

1. Óxido de cálcio 2. Hidróxido de cálcio 3. Endodontia I. Título

ROBERTO ALMELA HOSHINO

**PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS, ANTIMICROBIANAS E BIOLÓGICAS DE
CIMENTOS ENDODÔNTICOS COM ÓXIDO DE CÁLCIO E RESINA
SALICILATO.**

Dissertação para obtenção do grau de mestre.

Comissão Julgadora.

Orientador: Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho - Universidade Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho” Campus de Araraquara (FOAR).

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Juliane M. Guerreiro Tanomaru - Universidade Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho” Campus de Araraquara (FOAR).

3º Examinador: Prof. Dr. Prof.Dr.Luciano Tavares Angelo Cintra - Universidade Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho” Campus de Araçatuba (FOA).

Araraquara, 28 de Março de 2016.

Dados Curriculares

ROBERTO ALMELA HOSHINO

NASCIMENTO: 10 de Outubro de 1990 – São José do Rio Preto – SP.

FILIAÇÃO:

- Roberto Kioshi Hoshino
- Rosangela Maria Almela Hoshino

2009-2013: Graduação em Odontologia pelo Centro Universitário do Norte Paulista, UNORP, São José do Rio Preto – SP.

2014-2016: Mestrado em Odontologia, área de concentração em Endodontia, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Odontologia de Araraquara.

Dedicatória

Dedico esta dissertação às pessoas mais importantes da minha vida...

Primeiramente a **Deus**, inteligência suprema do Universo, causa de tudo o que existe, fonte de vida, sabedoria e inspiração superior.

Aos meus queridos pais, **Roberto e Rosangela**, exemplos de luta, dignidade e honestidade. Obrigado pela sua força, por sua dedicação, por toda a sua capacidade de compreensão, por sua confiança em mim, enfim, pela sua presença em minha vida. Esta vitória é nossa!

À minha irmã, **Isis**, pela convivência todos esses anos e que mesmo à distância sempre me ajudou e torceu pela minha vitória.

À minha namorada, **Renata**, que me fez acreditar que sonhos são possíveis de serem realizados, mesmo quando todas as adversidades da vida dizem que não.

Ao meu amigo, **Prof. Dr. Guilherme**, pela disponibilidade, incentivo, compreensão, atenção e pelas preciosas considerações para a melhoria de minha pesquisa, é uma honra de tê-lo em como amigo.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho**, pelas orientações teóricas, pela paciência, pelas palavras de alívio e conforto, por ter se tornado uma grande amigo para a vida.

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho**, sua generosidade, humildade, bondade, ética e conhecimento. Sou grato eternamente pela força de todos os dias, para que eu pudesse me superar e conseguir com isso, fazer parte de um mundo novo, o qual tanto sonhei.

À **Profª. Drª. Juliane M. Guerreiro Tanomaru**, pela disponibilidade e direcionamentos, os quais me permitiram seguir "pontos de orientação" confiáveis para esta dissertação.

Aos professores **Dr. Paulo Sérgio Cerri e Drª. Estela Sasso Cerri**, por possibilitar a concretização de parte deste trabalho e obrigado por sempre ser prestativo e acreditar em meu potencial e contribui para a construção desta dissertação. Agradeço pela paciência, tranquilidade e incentivo, lhe tenho como exemplo de competência e perseverança.

Aos professores do Departamento de Endodontia desta Instituição: **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert, Profª. Drª. Gisele Faria, Profª. Drª. Juliane M. Guerreiro Tanomaru, Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho, Prof. Dr. Milton Carlos Kuga, Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo e Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho**. Meu respeito pelo aprendizado e pelas lições transmitidas. Obrigado pela oportunidade de convívio, pelo companheirismo, amizade, pelos conhecimentos divididos, paciência e dedicação extrema...profissionais exemplares e pessoas maravilhosas que adorei ter conhecido.

À **Drª Roberta Bosso**, pela ajuda fundamental na realização de todo este trabalho.

À **Luis Antônio Potenza e Pedro Sergio Simões**, pela amizade e pelos ensinamentos laboratoriais. Pela dedicação e capricho durante todo o processamento histológico.

Aos colegas **Fernanda, Derik, Aline, Tiago, Rodrigo, Laurie, Camila Nascimento, Camila Espir, Gisele, Larissa, Fabiane, Juliana e Gabriela** pela boa convivência e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Aos membros da banca examinadora, **Profª. Drª. Juliane M. Guerreiro Tanomaru, Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra** e ao meu orientador, **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho**, pela valiosa e fundamental colaboração para a finalização desta dissertação. Obrigado pela disponibilidade que dedicaram de maneira tão brilhante na leitura deste trabalho.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Alexandre e Cristiano**, pelo profissionalismo e pela ajuda sempre que preciso.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara por toda ajuda e atenção que sempre colocaram à disposição. Deixo registrado meu agradecimento em especial para **Ana Cristina Jorge, Maria Inês Carlos e Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas**.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora, **Creusa, Marinho, Vanderlei, Izabel e Alessandra**. Muito obrigada pela amizade, permanecerão para sempre no meu coração.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram na elaboração e na melhora desta tese, contribuindo para que eu atingisse esta meta.

Resumo

Hoshino RA. Propriedades físicas, químicas, antimicrobianas e biológicas de cimentos endodônticos com óxido de cálcio e resina salicilato [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

Resumo

O cimento endodôntico Sealapex® (SL) contém óxido de cálcio e resina de salicilato. Apexit® Plus (AP) é um cimento com sais de cálcio (hidróxido, óxido, fosfato) que apresenta reação química com resina salicilato. O objetivo desse estudo foi avaliar as propriedades físicas, químicas, antimicrobianas e biológicas do cimento AP comparando-os ao SL. Os testes para avaliação de pH, tempo de presa, solubilidade, escoamento e radiopacidade foram realizados. A atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos foi avaliada por meio de contato direto com *Enterococcus faecalis* em fase planctônica. Os resultados mostram que os cimentos endodônticos estão de acordo com os padrões mínimos sugeridos pela ADA, para os testes de escoamento e radiopacidade. Entretanto, SL apresenta tempo de presa e solubilidade maiores comparado ao AP. Os materiais apresentam potencial de alcalinização semelhante em todos os períodos de avaliação, entretanto, o AP apresenta maior atividade antimicrobiana em comparação ao SL.

Para avaliação da reação tecidual provocada pelos materiais, foram implantados tubos de polietileno com os cimentos endodônticos e vazios (Controle) em subcutâneo de ratos. Após 7, 15, 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados e os tubos com o tecido adjacente removidos e submetidos ao processamento histológico. Os cortes foram corados em H/E para a realização da análise morfológica, considerando a presença ou não de processo inflamatório, bem como a sua extensão e o tipo de células inflamatórias, presença de células gigantes multinucleadas, vasos sanguíneos, fibroblastos e a mensuração de colágeno foi realizada com coloração Picrosirius sob luz polarizada. Os resultados indicam que os cimentos promovem uma reação inflamatória no período de 7 dias e uma diminuição no número de células inflamatórias na cápsula adjacente aos implantes em períodos experimentais mais longos sendo evidenciada principalmente no SL e controle. Os resultados mostram que o SL induziu a melhor resposta de reparo tecidual em comparação ao AP, e demonstrou aumento na porcentagem de fibras colágenas birrefringentes em todos os períodos. Os dois materiais apresentaram biocompatibilidade.

Palavras-chave: Óxido de cálcio. Hidróxido de cálcio. Endodontia.

Hoshino RA. Physical, chemical, antimicrobial and biological properties of sealers with calcium oxide and salicylate resin [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

Abstract

Endodontic sealer Sealapex[®] (SL) presents calcium oxide and salicylate resin in its formulation. Apexit[®] Plus (AP) is a sealer that contains calcium salts (hydroxide, oxide, phosphate) and has chemical reaction with salicylate resin. This study aims to evaluate the physical, chemical, antimicrobial and biological properties of AP, comparing to SL. Tests of pH, setting time, solubility, flow and radiopacity were done for both materials. . The antimicrobial activity was evaluated by the direct contact test with *Enterococcus faecalis* in bacterial suspension. Results confirm that these endodontic sealers are according to #57 ADA specification, to the flow and radiopacity tests. However, SL presented higher setting time and solubility compared to AP. The materials showed similar alkalization potential in all periods, the AP has larger antimicrobial activity compared to SL. For the evaluation of the tissue reaction induced by the materials, polyethylene tubes containing the sealers were implanted in the rat subcutaneous; empty tubes were used as control. After 7, 15, 30 and 60 days, the animals were euthanized and the tubes with adjacent tissue were removed and submitted to histological procedures. HE-stained sections were used to morphologic analysis, considering the presence or absence of inflammation, as well as the extent and type of inflammatory cells, the presence of multinucleated giant cells, blood vessels, fibroblasts. Sections staining with Picrosirius red was used to measure the collagen content in polarized light. Data indicate that cements promote an inflammatory reaction at 7 days; after this period, a significant and gradual decreasing was observed in the number of inflammatory cells, especially in SL and control. Our results show that the SL induce to a tissue repair more gradually than the sealer AP, that demonstrated an increase on the percentage of birefringent collagen fibers after 60 days. The two materials showed biocompatibility.

Key words: Calcium oxide. Calcium hydroxide. Endodontic.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	14
3 PUBLICAÇÃO	15
3.1 Publicação 1	15
3.2 Publicação 2	29
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
5 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO	52

1 INTRODUÇÃO

A terapia endodôntica é uma sequência de etapas operatórias interdependentes, sendo importante o controle da infecção e a prevenção de recontaminação do sistema de canais radiculares, que será obtida com a obturação do canal radicular e restauração coronária definitiva (Siqueira Jr et al.⁴⁴, 2004).

A obturação dos canais radiculares deve promover selamento do sistema de canais radiculares e, se possível, estimular o processo de reparo apical e periapical após o tratamento endodôntico (Whirworth⁵², 2005; Ari et al.², 2010).

Frequentemente, a obturação do canal radicular é realizada pela associação de material sólido, cones de guta-percha ou resilon, com cimento endodôntico (Jainaen et al.²⁷, 2007; Souza et al.⁴⁶, 2009). Os cones ocupam o espaço central, e o cimento deve preencher irregularidades do sistema de canais radiculares, procurando minimizar a desadaptação entre paredes e guta-percha.

Assim, o cimento poderá obturar eventuais canais acessórios existentes, dificultando a percolação de fluidos teciduais e micro-organismo por via cervical e apical, impedindo a infecção ou reinfecção do sistema de canais radiculares (Schilder³⁵, 1967; Whitworth⁵², 2005).

Apesar da grande quantidade de cimentos endodônticos disponíveis no mercado, ainda não há um material que possa ser considerado ideal. Diante desta dificuldade, torna-se importante o estudo das propriedades físicas, químicas, antimicrobianas e biológicas dos cimentos endodônticos para o uso clínico. Um material para ser utilizado na obturação dos canais radiculares deve ser radiopaco, não sofrer contração, além de apresentar atividade antimicrobiana e biocompatibilidade (Grossman²², 1988; Wu et al.⁵³, 2004; Kim et al.²⁹, 2010; Chang et al.¹², 2014).

Em 1936, Grossman²² introduziu na endodontia os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, sendo consagrado seu uso somente em 1958. Desde então, tem sido amplamente manuseado pelos profissionais brasileiros devido à fácil manipulação, inserção no canal radicular, tempo de trabalho adequado e baixo custo (Leonardo, Leal³², 2005). No entanto, no requisito de biocompatibilidade, o cimento à base de óxido de zinco e eugenol, apresenta propriedade insatisfatória devido, principalmente, ao comportamento irritante do eugenol.

Estudos com implantes de tubos de polietileno no subcutâneo mostram que os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol proporcionam uma resposta inflamatória intensa, mesmo em períodos prolongados (Becker et al.⁵, 1983; Blackman et al.⁷, 1989; Kolokouris et al.³⁰, 1998; Batista et al.⁴, 2007). Há evidência que este material promove uma necrose dos tecidos apicais, acompanhada de extenso processo inflamatório crônico na região periapical (Leonardo et al.³¹, 1998; Tanomaru-Filho et al.⁴⁸, 1998; Tanomaru-Filho et al.⁴⁷, 2009) e destruição do processo alveolar, seguido por um aumento do espaço do ligamento periodontal (Silva et al.⁴¹, 2011).

A adição do hidróxido de cálcio à fórmulas dos cimentos obturadores foi idealizada com o objetivo de melhorar as propriedades biológicas desses materiais. Já foi demonstrado que o hidróxido de cálcio contribui para o reparo apical e periapical, uma vez que, o pH alcalino e a liberação de íons cálcio deste material promovem efeitos bioquímicos que auxiliam na aceleração do processo de reparo tecidual (Binnie et al.⁶, 1973; Seux et al.³⁸, 1991; Estrela et al.¹⁶, 1995).

Um dos cimentos endodônticos mais comumente utilizados, que contém óxido de cálcio, é o Sealapex[®] (SL). Este material apresenta biocompatibilidade e selamento marginal apical eficiente (Valera et al.⁴⁹, 2005), uma vez que, induz o fechamento apical por deposição osteocementária (Chang et al.¹², 2014). Além disso, possui algumas propriedades físicas e químicas satisfatórias, tais como plasticidade, viscosidade e escoamento (Valera et al.⁴⁹, 2005). Entretanto, não possui a radiopacidade desejada e em alguns casos, profissionais agregam algumas substâncias radiopacas ao cimento, tais como iodofórmio ou óxido de zinco, para facilitar uma visualização em relação aos tecidos dentários subjacentes. (Valera et al.⁴⁹, 2005). Atualmente, os componentes radiopacificadores são trióxido de Bismuto e óxido de zinco.

O cimento SL apresenta níveis de solubilidade compatíveis aos requisitos exigidos pelas normas da ANSI / ADA; especificação n°57, para materiais endodônticos (Ersahan et al.¹⁵, 2013; Cañadas et al.¹¹, 2014). Acredita-se que a solubilidade e o pH elevados permitam a estimulação das células mesenquimais do periodonto apical que se diferenciam, estimulando a deposição de tecido mineralizado na região apical (Valera et al.⁵⁰, 2000). A solubilidade e o pH elevados deste material estão relacionados ao aumento da atividade antimicrobiana em biofilmes bacterianos (Faria et al.¹⁸, 2013).

Já foi demonstrado também que o SL apresenta baixa eficácia contra a bactéria *Enterococcus faecalis* (Heyder et al.²⁴, 2013). Além disso, Kazemi²⁸ (1993), sugeriu que ocorre uma desintegração com o passar tempo deste cimento devido a absorção de água, causando falhas na interface dentina / material e, conseqüentemente, elevando os níveis de infiltração (Valera et al.⁵⁰, 2000).

Com o objetivo de melhorar as características dos cimentos que contém óxido de cálcio, em 2008, foi desenvolvido o Apexit[®] Plus (AP) (Slutzky-Goldberg et al.⁴⁵, 2008), que apresenta na composição sais de cálcio (hidróxido, óxido, fosfato), colofônia hidrogenada, di-salicilato, sais de bismuto (óxido, carbonato), dióxido de silício altamente disperso (silanizado) e alquil-éster do ácido fosfórico. Segundo o fabricante, este cimento não exibe contração durante a reação de presa e demonstra excelentes propriedades físicas e biológicas, sendo um sistema de dois componentes (a base e o catalisador são fornecidos em seringas de dupla pressão).

Ainda de acordo com o fabricante, a umidade encontrada nos túbulos dentinários favorece a reação de presa, iniciando-se primeiramente no ápice radicular, pelo fato da dentina possuir uma espessura menor.

O cimento AP apresenta tempo de presa, escoamento, radiopacidade e solubilidade dentro dos padrões exigidos pelas normas da ANSI/ADA 2000 especificação n°57 (Marín et al.³³, 2012; Xuereb et al.⁵⁴, 2014). Estudo in vitro mostrou que este material apresenta efeitos citotóxicos em períodos iniciais, porém, sendo considerado biocompatível com o passar do tempo (Badole et al.³, 2013). Além disso, há relatos de que este cimento não apresenta citotoxicidade, utilizando ensaio de MTT para determinar a viabilidade celular (Yilmaz et al.⁵⁵, 2012).

O AP apresenta eficácia antibacteriana contra *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* (Heyder et al.²⁴, 2013), contudo, sua ação antibacteriana não é eficaz contra *Enterococcus faecalis* (Slutzky-Goldberg et al.⁴⁵, 2008), havendo a aderência microbiana e formação de biofilme utilizando dentes bovinos (Senges et al.³⁷, 2011). Com a finalidade de melhora de sua atividade antibacteriana, vem sendo proposta a incorporação de substâncias à sua formulação, tais como, cloreto de benzalcônio, cloreto de cetilpiridínio (Gjorgievska et al.²⁰, 2013) e hinokitiol (Shih et al.⁴⁰, 2014), tornando-o resistente também à *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus*.

O AP apresenta melhor capacidade de vedação quando comparados a outros cimentos endodônticos como, por exemplo, o AH Plus (Salz et al.³⁴, 2009),

entretanto, estudos mostram que o cimento AP possui baixos valores de adesão à dentina radicular, independente do tratamento realizado nas paredes dos canais radiculares (Haragushiku et al.²³, 2010). Além disso, este cimento não apresenta alterações em suas propriedades físicas e químicas, durante a obturação do canal radicular utilizando a técnica de condensação vertical aquecida (Camilleri¹⁰, 2015), porém, foi verificado que o AP proporciona uma alteração de coloração do dente após a obturação (El Sayed et al.¹⁴, 2013).

Atualmente, ainda são insuficientes os estudos das propriedades do AP. Assim, torna-se oportuno, um trabalho que avalie algumas propriedades físicas, químicas, antimicrobianas e biológicas, com o objetivo de elucidar suas características.

2 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral

O presente estudo teve por objetivos avaliar propriedades físicas, químicas, antimicrobianas e biológicas dos cimentos endodônticos Apexit® Plus e Sealapex®. O estudo foi dividido em dois capítulos.

Objetivos específicos

- Verificar o escoamento, radiopacidade, tempo de presa, solubilidade e pH do cimento AP comparando-o ao SL.
- Avaliar a capacidade antimicrobiana dos cimentos AP e SL por meio do Contato direto com células planctônicas.
- Investigar a reação tecidual provocada pelos diferentes materiais em subcutâneo de ratos, por meio de análises morfológicas e morfométrica da cápsula formada adjacente aos implantes contendo os materiais, verificando:
 - ✓ Processo inflamatório, extensão e o tipo de células inflamatórias, presença de células gigantes multinucleadas, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas.

3 PUBLICAÇÃO

A seguir serão apresentados os artigos científicos para a publicação.

3.1 Publicação 1

Propriedades físicas, químicas e antimicrobiana de cimentos endodônticos com óxido de cálcio e resina salicilato. *

Objetivos: Avaliar as propriedades físico, químicas e antimicrobiana do cimento Apexit® Plus (AP) comparando-o ao Sealapex® (SL).

Material e métodos: Os materiais foram submetidos a testes de radiopacidade, pH, solubilidade, escoamento, tempo de presa e ação antimicrobiana. Para análise da radiopacidade foram realizadas radiografias juntamente com uma escala de alumínio. O pH foi analisado após os períodos 3, 12 e 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias. A solubilidade foi determinada pela porcentagem de perda de massa após imersão em água. Análise do escoamento foi realizada segundo a norma ISO 6876 e o tempo de presa foi avaliado por meio de agulha Gilmore. A ação antimicrobiana foi realizada pelo teste de contato direto em células planctônicas, consistindo na mensuração do crescimento microbiano após o contato de 1 hora com os materiais experimentais. Cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC- 29212) foi usada. Os dados foram submetidos aos testes Análise de Variância e Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados: Os materiais apresentaram radiopacidade maior que 3 mm Al e pH alcalino. O SL apresentou maiores valores de solubilidade que o AP ($p<0,05$), enquanto o AP apresentou maior escoamento que SL ($p<0,05$). Os valores para o tempo de presa inicial e final do SL foram significativamente maiores quando comparados ao AP ($p<0,05$). Os cimentos foram eficazes contra o *Enterococcus faecalis* ($p<0,05$).

Conclusão: Os cimentos possuem propriedades físicas, químicas e antimicrobianas adequadas.

Relevância clínica: O AP apresenta propriedades físicas, químicas e antimicrobianas que o tornam uma alternativa para uso clínico.

Palavras-chave: Óxido de cálcio. Hidróxido de cálcio. Endodontia

*Artigo será submetido ao periódico *Clinical Oral Investigations*

INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico é composto por diversas etapas operatórias sequenciais e interdependentes, sendo que o sucesso depende da execução correta de cada fase [1,2]. A obturação dos canais radiculares auxilia no controle da infecção dos canais principal e acessórios, bem como para a prevenção de recontaminação [3-6].

Os cimentos endodônticos desempenham importante função no selamento do sistema de canais radiculares prevenindo a infiltração coronária e apical [4,7]. Atualmente, há uma grande diversidade de cimentos endodônticos disponíveis no mercado, no entanto, ainda não há um material que possa ser considerado ideal. Estes materiais devem apresentar excelente selamento, estabilidade dimensional, tempo de trabalho adequado antes de sua total reação de presa, insolubilidade aos fluídos tissulares, adequada adesão às paredes do canal, fácil inserção e remoção, radiopacidade, além de possuir atividade antimicrobiana e biocompatibilidade [8].

O Sealapex® (SL), o qual contém óxido de cálcio em sua composição apresenta biocompatibilidade, selamento marginal apical eficiente [9], e capacidade de induzir ao fechamento apical por deposição osteocementária [10]. Além disso, este material apresenta algumas propriedades físico-químicas satisfatórias, tais como plasticidade, viscosidade e escoamento [9]. Apesar destas vantagens, já foi demonstrado que o SL apresenta alta porcentagem de solubilidade [11], o que pode interferir na adesão deste cimento à dentina [12], e favorecer infiltração marginal [13-16]. Além disso, a interação química desse cimento com a dentina pode ser afetada negativamente dependendo do protocolo de irrigação utilizado durante o tratamento endodôntico [17]. Há evidências também de baixa ação antimicrobiana contra o *Enterococcus faecalis* [18], frequentemente encontrado nos canais radiculares, especialmente, nos casos de infecção secundária.

Com o objetivo de melhorar as características dos cimentos que contém óxido de cálcio, como por exemplo, a solubilidade, foi desenvolvido o Apexit® Plus (AP) [19], que apresenta em sua composição sais de cálcio (hidróxido, óxido, fosfato), colofônia hidrogenada, di-salicilato, sais de bismuto (óxido, carbonato), dióxido de silício altamente disperso (silanizado) e alquil-éster do ácido fosfórico.

Segundo o fabricante, este cimento não exibe contração durante a reação de presa e demonstra excelentes propriedades físicas e biológicas. Além do fato de que a umidade encontrada nos túbulos dentinários favorece a reação de presa, iniciando-se primeiramente no ápice radicular, uma vez que a dentina possui espessura menor nesta região.

Já foi demonstrado que o cimento AP apresenta tempo de presa, escoamento, radiopacidade, solubilidade e alteração dimensional dentro dos padrões das normas da ANSI/ADA 2000 especificação nº57 [20] [21,22]. Além disso, o AP apresenta melhor capacidade de vedação quando comparados a outros cimentos endodônticos como, por exemplo, o AH® Plus [23], e não apresenta alterações em suas propriedades físico-químicas quando utilizada uma técnica de obturação radicular aquecida [24]. Estudos *in vitro* mostraram também que este material apresenta baixa citotoxicidade [25,26]. Apesar de o AP apresentar eficácia antibacteriana contra *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* [18], sua ação antibacteriana não é eficaz contra *Enterococcus faecalis* [19], permitindo a aderência microbiana e formação de biofilme [27]. Além disso, estudos mostram que o cimento AP possui baixos valores de adesão à dentina radicular [28] e proporciona uma alteração na coloração do dente após a obturação [29].

Este estudo tem como objetivo avaliar o escoamento, radiopacidade, tempo de presa, solubilidade, pH e teste de contato direto com células planctônicas com objetivo de elucidar as características antimicrobianas deste cimento, comparando-o ao Sealapex®.

Material e Métodos

Os dois materiais foram submetidos aos testes de escoamento, radiopacidade, tempo de presa, solubilidade, pH e atividade antimicrobiana.

Escoamento

O teste de escoamento foi realizado de acordo com a norma ISO 6876/2002[30]. Após a manipulação do material, 0,05 ml de material foi colocado em placa de vidro (n=6). Após 3 minutos do início da manipulação, outra placa de vidro (20 g) foi posicionada sobre o cimento com um dispositivo de 100 gramas, totalizando 120 g, mantidos por 7 minutos. A mensuração foi realizada utilizando duas técnicas. Na primeira, foram medidos o maior e menor diâmetro de cada espécime, sendo necessária a diferença entre o maior e menor diâmetro inferior a 1 mm para a utilização da amostra. Para o segundo método, os corpos de prova foram fotografados ao lado de uma régua milimétrica. Após a obtenção das imagens, a área do

cimento foi medida em mm^2 no programa UTHSCSA Image Tool para Windows Versão 3.00, como descrito em estudos anteriores [31], em análises com corpos de prova de guta-percha.

Radiopacidade

Foram utilizados anéis de teflon com diâmetro de 10 mm e 1 mm de altura para confecção de 6 corpos de prova para cada material. Os materiais foram mantidos a 37°C e 95% de umidade por 48 horas. Após esse período, foram posicionados sobre filme oclusal (Insight – Kodak Comp, Rochester, NY) ao lado de uma escala de alumínio, com variação de 2 a 16 mm de espessura. As radiografias foram realizadas em aparelho de raios-X GE 1000 (General Electric, Milwaukee, WI) ajustado a 50 kV, 10 mA e 18 pulsos por segundo, com distância focal de 33 cm e os filmes foram processados em reveladora automática (A/T 2000@XR, Air Techniques Inc, Hicksville, Nova Iorque, EUA). Após digitalização, as imagens foram avaliadas no software ImageTool. Foi avaliada a equivalência em milímetros de alumínio para cada amostra, conforme realizado previamente [32].

Solubilidade

Moldes circulares plásticos foram confeccionados com 1,5 mm de altura e 7,75 mm de diâmetro interno. Cada molde foi posicionado sobre uma lamínula de vidro recoberta por película de papel celofane e preenchido com um material ($n=6$). Um fio de nylon foi incluído na massa do cimento e outra lamínula de vidro também envolta por celofane foi posicionada sobre o molde. O conjunto foi pressionado manualmente e armazenado em estufa com temperatura de 37°C em um intervalo de tempo de três vezes o tempo de presa de cada material. Os corpos de prova foram removidos dos moldes, pesados em balança de precisão HM-200 (A & D Engineering, Inc., Bradford, MA, EUA) e suspensos por meio dos fios de nylon no interior de recipientes plásticos com tampa contendo 10 ml de água destilada e deionizada. Os recipientes permaneceram em estufa a 37°C por sete dias, quando os corpos de prova foram removidos da água destilada, enxaguados e colocados em desumidificador. A massa antes e após o experimento foi mensurada a cada 24 horas até a estabilização da massa. A perda de massa foi expressa em porcentagem da massa original.

Tempo de presa

Para determinação do tempo de presa, foram confeccionados 6 corpos de prova para cada material, por meio da utilização de anéis metálicos com 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura. A avaliação do tempo de presa seguiu a metodologia adotada por Bortoluzzi et al[33]. Com avaliações a cada 3 minutos durante a primeira meia hora, 5 minutos até as 2 primeiras horas e a cada 15 minutos até atingir o tempo de presa final. Para determinar a presa inicial, foi utilizada agulha de Gilmore com massa de $100 \pm 0,5$ g e diâmetro de $2 \pm 0,1$ mm apoiada sobre a superfície do cimento. Posteriormente, uma agulha de Gilmore de $456 \pm 0,5$ g, e ponta de $1 \pm 0,1$ mm de diâmetro foi colocada verticalmente sobre a superfície do material para determinar o tempo de presa final. Os materiais foram mantidos na estufa durante a análise e a agulha foi limpa entre os ensaios.

Avaliação do pH

Para os testes de pH, tubos de polietileno com 10 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro foram preenchidos com cada material (n=10), sendo que as duas extremidades permaneceram abertas. Cada tubo foi imerso em 10 ml de água destilada e mantido em estufa a 37°C durante os períodos experimentais. A cada período, os tubos foram retirados dos frascos e acondicionados em um novo frasco contendo 10 ml de água destilada. Os períodos experimentais foram 3, 12, 24 horas, 7, 14, 21 e 28 dias. O pH das soluções foi medido imediatamente após o término de cada período experimental com um pHmetro Ultrabasic (Denver Instrument Company, Arvada, Colorado, USA) previamente calibrado.

Preparo das amostras

Cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC- 29212) foi empregada no estudo. O teste por contato direto modificado (DCT) foi adaptado de Arias-Moliz MT et al.[34]. Este teste consiste na mensuração do crescimento microbiano pelo íntimo contato entre o microrganismo testado e o material. Os procedimentos microbiológicos e a manipulação das amostras esterilizadas foram realizados em câmara de fluxo laminar (Telstar BV- 100, Araraquara, SP, Brasil).

Preparo da suspensão bacteriana

Após descongelamento, foi realizada técnica de coloração de gram e morfologia da colônias para a confirmação da pureza da colônia de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). O micro-organismo foi reativado em 4 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e mantido em estufa a 37°C por 6 horas. A densidade da suspensão bacteriana foi ajustada em $DO_{450}=0,1$, equivalente a $1,0 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia por mL (UFC mL⁻¹), com o auxílio de espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil).

Após manipulação dos materiais experimentais, estes foram inseridos de forma padronizada verticalmente em poços de uma microplaca de 96 poços, de modo que o cimento ficasse em apenas um lado do poço. A área foi revestida com aproximadamente 30 µL de cada cimento usando um aplicador de revestimento de cavidade, as placas foram mantidas por 30 minutos em luz UV em câmara de fluxo laminar para esterilização do material. Em seguida, foram depositados sobre os mesmos 10µL de suspensão de *Enterococcus faecalis* em cultura padronizada em espectrofotômetro com $DO_{450} = 0,1$. Para cada material foram utilizados 6 poços. Um grupo controle positivo foi realizado somente com inóculo sem material. As placas foram incubadas a 37 °C durante 1 hora. Após o período de contato, foi adicionado a cada poço 200µL de meio BHI e foi realizada diluição decimal seriada e plaqueamento de cada poço para quantificação de UFC/mL. Cada cimento foi testado três vezes. Após plaqueamento, as placas foram incubadas a 37 °C, durante 32 horas e foi realizada quantificação de células bacterianas.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística, empregando-se os testes Análise de Variância e Tukey, com nível de significância de 5%. Para isso foi utilizado o programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific, Sausalito, CA, EUA).

Resultados

Em relação ao escoamento, o AP apresentou um valor significativamente maior em comparação ao SL (Tabela 1). Apesar de ambos os materiais apresentar e radiopacidade

maiores que 3 mm Al, mínimo valor recomendado pela ANSI / ADA, 2008 e ISO 2012, o SL apresentou uma média estatisticamente superior quando comparado ao AP (Tabela 1).

A análise dos dados obtidos com o tempo de presa evidenciou que o SL apresentou valores, tanto para o tempo de presa inicial quanto para o final, significativamente superiores ao AP (Tabela 2); o SL também apresentou uma média estatisticamente maior, quando comparado ao AP, em relação à solubilidade (Tabela 2).

Tanto o AP quanto o SL apresentaram pH neutro, sem diferença estatisticamente significativa entre eles, em todos os períodos avaliados (Tabela 3). Já o teste de contato direto com *Enterococcus faecalis* em fase planctônica mostrou que o cimento AP possui uma maior atividade antimicrobiana em comparação ao SL ($p < 0,05$) após 1 hora de espatulação (Tabela 4).

Tabela 1- Médias e desvio padrão do teste de escoamento e radiopacidade.

	Escoamento (mm)	Escoamento (mm ²)	Radiopacidade (mm Al)
Sealapex [®]	20,93(±1,176) ^a	361,6(±34,82) ^a	6,819(±0,6886) ^a
Apexit [®] Plus	25,69 (±1,117) ^b	474,8(±22,46) ^b	3,444(±0,3225) ^b

As diferentes letras em cada coluna indicam diferença estatística significativa entre os grupos de um mesmo período de análise ($p < 0,05$)

Tabela 2 - Médias e desvio padrão do tempo de presa e solubilidade.

	Tempo de Presa Inicial (min)	Tempo de Presa Final (min)	Solubilidade Inicial (g)	Solubilidade Final (%)
Sealapex [®]	1181(±14,32) ^a	1268(±22,80) ^a	0,01172(±0,0002) ^a	-6,952(±1,302) ^a
Apexit [®] Plus	298(±13,51) ^b	1062(±17,62) ^b	0,00164(±0,0003) ^b	-1,333(±0,2364) ^b

As diferentes letras em cada coluna indicam diferença estatística significativa entre os grupos de um mesmo período de análise ($p < 0,05$)

Tabela 3 - Médias e desvio padrão do teste de pH nos diferentes períodos.

	Apexit®Plus	Sealapex®	Controle
3 h	7,439 ($\pm 0,2563$) ^a	7,676 ($\pm 0,2974$) ^a	6,963 ($\pm 0,07790$) ^b
12h	7,353 ($\pm 0,1225$) ^a	7,526 ($\pm 0,1811$) ^a	6,8556 ($\pm 0,2202$) ^b
24 h	7,322 ($\pm 0,07391$) ^a	7,465 ($\pm 0,1765$) ^a	6,91 ($\pm 0,1246$) ^b
7 dias	7,721 ($\pm 0,2933$) ^a	7,80 ($\pm 0,1472$) ^a	7,024 ($\pm 0,2465$) ^b
14 dias	7,749 ($\pm 0,1688$) ^a	7,795 ($\pm 0,1935$) ^a	7,070 ($\pm 0,1576$) ^b
21 dias	7,919 ($\pm 0,2419$) ^a	7,895 ($\pm 0,2242$) ^a	7,169 ($\pm 0,1269$) ^b
28 dias	7,885 ($\pm 0,1909$) ^a	7,841 ($\pm 0,2381$) ^a	7,221 ($\pm 0,1101$) ^b

As diferentes letras em cada linha indicam diferença estatística significativa entre os grupos de um mesmo período de análise ($p < 0,05$)

Tabela 4 - Médias e desvio padrão de UFC (log 10) do teste de contato direto com *Enterococcus faecalis* em fase planctônica.

Apexit® Plus	Sealapex®	Controle
6,660 ($\pm 0,1886$) ^a	7,215 ($\pm 0,0776$) ^b	8,510 ($\pm 0,1224$) ^c

As diferentes letras em cada linha indicam diferença estatística significativa entre os grupos de um mesmo período de análise ($p < 0,05$)

Discussão

Os cimentos endodônticos devem apresentar características adequadas para serem utilizados na prática clínica [35]. A especificação ISO 6876 [30], estabelece que o valor mínimo exigido para a propriedade de escoamento seja de 17 milímetros (mm); de acordo com os resultados do presente estudo, todos os cimentos estão em conformidade com a especificação ISO atual (ISO 6876 -2012) [30]. O AP demonstrou estatisticamente maiores níveis de escoamento comparado ao SL, sendo justificado pela presença de resina epóxi [21].

O tamanho das partículas que compõem estes materiais pode promover alta viscosidade, devido ao aumento resultante na área de superfície [8].

Por outro lado, níveis excessivos desta propriedade não são desejáveis, uma vez que podem aumentar o risco de extrusão apical. Nossos resultados coincidem com os de Xuereb et al. [22] para o AP e com os encontrados por Faria-Junior et al. [36] para o SL.

No quesito de radiopacidade, ambos os materiais testados apresentaram valores maiores que 3 mm de Al, estando de acordo com padrões exigidos pela ISO 6876 [30] e ANSI/ADA 57 [20]. O SL apresentou estatisticamente maiores índices de radiopacidade em relação ao AP, provavelmente devido à presença de trióxido de bismuto em sua formulação [37]. O bismuto é um metal com alto peso molecular e está presente na composição do SL na forma de trióxido de bismuto, em uma concentração de 29% [38]. Sabe-se que este produto confere altos valores de radiopacidade não somente aos cimentos endodônticos, mas também a outros tipos de materiais dentários, como por exemplo, o MTA [39]. Embora o cimento AP possua carbonato de bismuto como agente radiopacificador, estudos mostram que este componente apresenta radiopacidade moderada [32].

A avaliação de tempo de presa foi baseada na inspeção visual, utilizando duas agulhas com um peso diferente para determinar o tempo de presa inicial e final, os valores obtidos não poderiam ultrapassar 10% do que indicado pelos fabricantes, segundo a ANSI/ADA especificação n° 57 [20]. O tempo de presa inicial e final do AP foi estatisticamente menor ao SL, alguns autores relatam que os agentes radiopacificadores podem ser responsáveis por atrasar o processo de tempo de presa de um cimento, uma vez que estes agentes têm baixa solubilidade em água e promovem à inclusão de outra reação química[21], favorecendo a solubilidade e / ou desintegração deste material [40].

A *American Dental Association* [20] determina uma perda em massa de 3% como uma porcentagem aceitável para os materiais dentários. Os materiais com maior solubilidade podem libertar substâncias irritantes e aumentar o risco de lacunas e colonização bacteriana [41]. Os resultados obtidos mostraram altos níveis de solubilidade do SL em comparação ao AP iniciais e finais. O AP apresentou baixa solubilidade, estando de acordo com o requisito da norma ISO 6876; resultados semelhantes foram encontrados por Marín et al.[21]. Nossos achados para o SL estão condizentes com Salz et al. [23], o qual exibiu valores de solubilidades significativamente maiores do que os cimentos EndoREZ[®], iRoot SP[®], e AH[®] Plus [42], estes resultados podem ser atribuídos em partes à complexa reação de tempo de presa desse material, resultando em uma matriz frágil [43].

Para avaliação dos testes de pH, ambos os cimentos (AP e SL) mostraram-se de neutro a levemente alcalino desde o primeiro período em relação com grupo controle, tendo um aumento nos valores em alguns períodos. O cimento AP apresentou maiores valores nos dois últimos períodos quando comparado ao SL, entretanto não há diferença estatística significativa entre os dois. Os resultados de Zhang et al. [44] e Cañadas et al. [38], não encontraram diferença significativas entres esses materiais, esperava-se que ambos os cimentos apresentassem alcalinidade devido ao fato de encontrar em suas formulações sais de cálcio ou hidróxido de cálcio [45, 46].

Neste estudo também foi avaliada a atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos frescos contra o *Enterococcus faecalis* em fase planctônica, os resultados mostraram que o AP e o SL conseguem inibir o crescimento de *Enterococcus faecalis*, podendo ser justificado devido à capacidade dos materiais de liberarem íons hidroxila elevando o pH e tornando o meio menos favorável para o desenvolvimento do microrganismo [47] e atuando sobre as enzimas da membrana celular microbiana, de maneira a ocasionar perda de atividade biológica e destruição da membrana citoplasmática [48-50].

Conclusão

Os cimentos Apexit® Plus e Sealapex® apresentaram resultados satisfatórios em propriedades de escoamento, solubilidade. O Apexit® Plus obteve um menor tempo de presa comparados ao Sealapex; no requisito de radiopacidade, os materiais testados estão de acordo com o mínimo valor recomendado pela ISO/ADA especificação 57. Ambos os cimentos apresentaram pH próximo do neutro e conseguiram inibir o crescimento do *Enterococcus faecalis*, entretanto não houve a erradicação desse microrganismo. O Apexit® Plus demonstrou propriedades de escoamento, solubilidade, tempo de presa, radiopacidade e ação antimicrobiana aceitáveis para seu uso clínico.

Referencias

1. Borges ÁH, Orçati Dorileo MC, Dalla Villa R, Borba AM, Semenoff TA, Guedes OA, Estrela CR, Bandeca MC (2014) Physicochemical properties and surfaces morphologies evaluation of MTA FillApex and AH plus. *ScientificWorldJournal* 2014:589732 doi: 10.1155/2014/589732
2. Siqueira JF JR, Rôças IN, Alves FR, Santos KR (2004) Selected endodontic pathogens in the apical third of infect root canals: a molecular investigation. *J Endod* 30(9): 638-643
3. Ørstavik D, Nordahl I, Tibballs JE (2001) Dimensional change following setting of root canal sealer materials. *Dent Mater* 17(6): 512-519
4. Whitworth J (2005) Methods of filling root canals: principles and practice. *Endo Topics* (12) 2-24
5. Schilder H (2006) Filling root canals in three dimensions. 1967. *J Endod* 32(4):281-290
6. Ari H, Belli S, Gunes B (2010) Sealing ability of Hybrid Root SEAL (MetaSEAL) in conjunction with different obturation techniques. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109(6):e113-116
7. Schilder H (1967) Filling root canals in three dimensions. *Dent Clin North Am*. Nov:723-744
8. Zhou HM, Shen Y, Zheng W, Li L, Zheng YF, Haapasalo M (2013) Physical properties of 5 root canal sealers. *J Endod* 39(10):1281-1286
9. Valera MC, Anbinder AL, Carvalho YR, Balducci I, Bonetti Filho I, Consolaro A (2005) Avaliação da compatibilidade biológica do cimento Sealapex® e deste cimento acrescido de iodofórmio ou óxido de zinco. *Cienc Odontol Bras* 8(4):29-30
10. Chang SW, Lee SY, Kang SK, Kum KY, Kim EC (2014) In vitro biocompatibility, inflammatory response, and osteogenic potential of 4 root canal sealers: Sealapex, Sankin apatite root sealer, MTA Fillapex, and iRoot Sp root canal sealer. *J Endod* 40(10):1642-1648
11. Eldeniz AU, Erdemir A, Kurtoglu F, Esener T (2007) 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* 103(3):e86-91
12. Tedesco M, Felipe MC, Felipe WT, Alves AM, Bortoluzzi EA, Teixeira CS (2014) Adhesive interface and bond strength of endodontic sealers to root canal dentine after immersion in phosphate-buffered saline. *Microsc Res Tech* 77(12):1015-1022
13. Wu MK, De Gee AJ, Wesselink PR (1994) Leakage of four root canal sealers diferente thicknesses. *Int Endod J* 27(6):304-38
14. Valera MC, Anbinder AL, Leonardo MR, Parizoto NA, Kleine MU (2000) Cimentos endodônticos: análise morfológica imediata e após seis meses utilizando microscopia de força atômica. *Pesqui Odontol Bras* 14(3):199-204

15. Shetty K, Habib VA, Shetty SV, Khed JN, Prabhu VD (2015) An assessment of coronal leakage of permanent filling materials in endodontically treated teeth: An in vitro study. *J Pharm Bioallied Sci* Aug;7(Suppl 2):S607-11 doi:10.4103/0975-7406.163566
16. Michelotto AL, Gasparetto JC, Campos FR, Sydney GB, Pontarolo R (2015) Applying liquid chromatography-tandem mass spectrometry to assess endodontic sealer microleakage. *Braz Oral Res* 2015;29:1-7 doi:10.1590/1807-3107BOR-2015
17. Neelakantan P, Sharma S, Shemesh H, Wesselink PR (2015) Influence of Irrigation Sequence on the Adhesion of Root Canal Sealers to Dentin: A Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Push-out Bond Strength Analysis. *J Endod* 41(7):1108-1111
18. Heyder M, Kranz S, Völpel A, Pfister W, Watts DC, Jandt KD, Sigusch BW (2013) Antibacterial effect of different root canal sealers on three bacterial species. *Dent Mater* 29(5):542-549
19. Slutzky-Goldberg I, Slutzky H, Solomonov M, Moshonov J, Weiss EI, Matalon S (2008) Antibacterial properties of four endodontic sealers. *J Endod* 34(6):735-738
20. American National Standard Institute/American Dental Association (ANSI/ADA) (2012) Specification n° 57 for endodontic filling materials. The Journal of the American Dental Association, Chicago, Ill, USA, 2000.
21. Marín-Bauza GA, Silva-Sousa YT, da Cunha SA, Rached-Junior FJ, Bonetti-Filho I, Sousa-Neto MD, Miranda CE (2012) Physicochemical properties of endodontic sealers of different bases. *J Appl Oral Sci* 20(4):455-461
22. Xuereb M, Vella P, Damidot D, Sammut CV, Camilleri J (2015) In situ assessment of the setting of tricalcium silicate-based sealers using a dentin pressure model. *J Endod* 41(1):111-124
23. Salz U, Poppe D, Sbicego S, Roulet JF (2009) Sealing properties of a new root canal sealer. *Int Endod J* 42(12):1084-1089
24. Camilleri J (2015) Sealers and warm gutta-percha obturation techniques. *J Endod* 41(1):72-78
25. Yilmaz Z, Dogan AL, Ozdemir O, Serper A (2012) Evaluation of the cytotoxicity of different root canal sealers on L929 cell line by MTT assay. *Dent Mater J* 31(6):1028-1032
26. Badole GP, Warhadpande MM, Meshram GK, Bahadure RN, Tawani SG, Tawani G, Badole SG (2013) A comparative evaluation of cytotoxicity of root canal sealers: an in vitro study. *Restor Dent Endod* 38(4):204-209
27. Senges C, Wrbas KT, Altenburger M, Follo M, Spitzmuller B, Wintmer A, Wintmer A, Hellwig E, Al-Ahmad A (2011) Bacterial and *Candida albicans* adhesion on different root canal filling materials and sealers. *J Endod* 37(9):1247-1252

28. Haragushiku GA, Sousa-Neto MD, Silva-Sousa YT, Alfredo E, Silva SC, Silva RG (2010) Adhesion of endodontic sealers to human root dentine submitted to different surface treatments. *Photomed Laser Surg* 28(3):405-410
29. El Sayed MA, Etemadi H (2013) Coronal discoloration effect of three endodontic sealers: An in vitro spectrophotometric analysis. *J Conserv Dent* 16(4):347-351
30. International Organization for Standardization (2012) *Dentistry — Root Canal Sealing Materials*. London, UK: British Standards Institution ISO 6876.
31. Tanomaru-Filho M, Silveira GF, Tanomaru JM, Bier CA (2007) Evaluation of the thermoplasticity of different gutta-percha cones and Resilon. *Aust Endod J* 33(1):23-26
32. Húngaro Duarte MA, de Oliveira El Kadre GD, Vivan RR, Guerreiro Tanomaru JM, Tanomaru Filho M, de Moraes IG (2009) Radiopacity of protland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod* 35(5):737-740
33. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru Filho M, Esberard RM (2009) The influence calcium choride on the time, solubility, desintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *J Endod* 35(4):550-554
34. Arias-Moliz MT, Ruiz-Linares M, Cassar G, Ferrer-Luque CM, Baca P, Ordinola-Zapata, Camilleri J (2015) The effect of benzalkonium chloride additions to AH Plus Sealer. Antimicrobial, physical and chemical properties. *J Dent* 43(7):846-854
35. Veloso HH, do Santos RA, de Araújo TP, Leonardi DP, Baratto Filho F (2006) Histological analysis of the biocompatibility of three different calcium hydroxide-based root canal sealers. *Sci* 14(5):376-381
36. Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM (2013) Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *J* 46(8):755-762
37. Guerreiro-Tanomaru JM, Duarte MA, Gonçalves M, Tanomaru-Filho M. (2009) Radiopacity evaluation of root canal sealers containing calcium hydroxide and MTA. *Braz Oral Res* 23(2):119-123
38. Cañadas PS, Berástegui E, Gatón-Hernández P, Silva LA, Leite GA, Silva RS (2014) Physicochemical properties and interfacial adaptation of root canal sealers. *Braz Dent* 25(5):435-441
39. Hungaro Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru Filho M, Vivan RR, Gomes de Moraes I, Bombarda de Andrade F (2012) Effect of different radiopacifying agents on physicochemical properties of White Portland cement and White mineral trioxide aggregate. *J Endod* 38(3):394- 397
40. Jian Wang, Yi Zuo, Minghui Zhao, Jiaying Jiang, Yi Man, Jun Wu, Yunjiu Hu, Changlei Liu, Yubao Li, Jidong Li (2015) Physicochemical and biological properties of a novel injectable polyurethane system for root canal filling. *Int J Nanomedicine* 17(10):697-709
41. Flores DS, Rached FJ Jr, Versiani MA, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Pécora JD (2011) Evaluation of physicochemical properties of four root canal sealers. *Int Endod J* 44(2):126-135
42. Ersahan S, Aydin C (2013) Solubility and apical sealing characteristics of a new calcium silicate-based root canal sealer in comparison to calcium hydroxide-,

- methacrylate resin- and epoxy resin-based sealers. *Acta Odontol Scand* 71(3-4):857-862
43. Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, Sinhoreti MA, Consani S, Sousa-Neto MD (2007) Solubility and dimensional change after setting of root canal sealers: a proposal for smaller dimensions of test sample. *J Endod* 33(9):1110-1116
 44. Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M (2009) Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 35(7):1051-1055
 45. Sjögren U, Figdor D, Spångberg L, Sundqvist G (1991) The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 24(3):119-125.
 46. Bystrom A, Sundqvist G (1985) The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 18(1):35-40
 47. Siqueira JF Jr, Lopes HP (1999) Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 32(5):361-369
 48. Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2004) Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 19(2):71-76
 49. Desai S, Chandler N (2009) Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. *J Endod* 35(4):475-480
 50. Seelan RG, Kumar AA, Emil Sam RJ, Maheswari SU (2015) Antimicrobial efficacy of different root canal sealers by using real-time polymerase chain reaction: An ex vivo study. *J Conserv Dent* 18(6):474-478

3.2 Publicação 2

Avaliação da reação tecidual induzida pelo cimento Apexit Plus, comparando-o ao Sealapex no subcutâneo de ratos. *

Resumo

Objetivo: Verificar a reação tecidual promovida pelo Apexit® Plus no subcutâneo dorsal de ratos em períodos experimentais distintos, comparando-o ao Sealapex® (SL).

Metodologia: Os materiais foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante e, imediatamente, inseridos em tubos de polietileno para implantação no subcutâneo dorsal de ratos (n=60) divididos três grupos: Controle, AP e SL. Além disso, tudo de polietileno vazios foram utilizados como controle. Após 7, 15, 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados e os tubos com os tecidos adjacentes foram removidos e submetidos ao processamento histológico. Os cortes obtidos foram corados com H/E ou picrosirius para contagem da densidade numérica de células inflamatórias (CI) ou quantificação do colágeno birrefringente na cápsula adjacente aos implantes. Os resultados indicaram que os cimentos promovem uma reação inflamatória intensa aos 7 dias; após este período há uma diminuição no número de CI. Em todos os períodos, o AP apresentou um número de CI significativamente maior do que o SL. Além disso, foram constatados um aumento gradativo de colágeno birrefringente no tecido subcutâneo adjacente aos materiais.

Conclusão: De acordo com os resultados deste estudo, podemos concluir que o cimento AP apresenta maior indução de processo inflamatório quando comparado ao SL, em todos os períodos estudados.

Palavras-chave: Reação tecidual, Sealapex, Apexit Plus

* Artigo sera submetido ao periódico *International Endodontic Journal*

Introdução

Os cimentos endodônticos são de fundamental importância no selamento do sistema de canais radiculares e no reparo periapical, por meio da formação de um tecido cementóide, após a obturação dos canais radiculares (Kaplan AE et al. 2003). Assim, estes materiais devem apresentar biocompatibilidade, uma vez que seus componentes ou produtos de degradação pode entrar em contato com tecidos circundantes por meio de numerosas conexões, como os túbulos dentinários, canais acessórios, canais laterais e forame apical (Schmalz et al. 2000). Sabe-se que as composições químicas dos cimentos endodônticos influenciam no comportamento biológico dos materiais, podendo promover ou intensificar o processo inflamatório (Whirworth 2005, Ari et al. 2010). Alguns cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, por exemplo, promovem resposta inflamatória intensa, mesmo em período prolongado (Mori et al. 2014a, 2014b, Bernardes et al. 2010). Isto porque o eugenol ocasiona necrose dos tecidos apicais, acompanhada de extenso processo inflamatório crônico na região periapical (Leonardo MR et al. 1998, Tanomaru-Filho M et al. 1998).

Os cimentos à base de hidróxido de cálcio ou sais de cálcio, por sua vez, apresentam compatibilidade tecidual (Holland R et al. 1998) e criam condições favoráveis para a formação de tecido mineralizado (Silveira et al. 2011). Já foi demonstrado que o hidróxido de cálcio contribui para o reparo apical e periapical, uma vez que o pH alcalino e a liberação de íons cálcio deste material promovem efeitos bioquímicos que auxiliam na aceleração do processo de reparo tecidual (Binnie et al. 1973, Seux et al. 1991 Estrela et al. 1995,). No entanto, existem diversos componentes nas formulações dos cimentos endodônticos que podem interferir neste comportamento biológico (Cañadas et al. 2014).

O fabricante do Sealapex® (SL), um cimento reconhecido por sua biocompatibilidade, modificou a sua formulação por meio da substituição do sulfato de bário pelo trióxido de bismuto, com o objetivo de melhorar a sua radiopacidade e aumentar a sua vida útil. Esta alteração na formulação original pode ter afetado negativamente o comportamento biológico desse material. Chang et al. (2014) já demonstrou que o SL induziu uma maior expressão de mediadores inflamatórios e uma menor diferenciação de osteoblastos em cultura de células, em comparação a outros cimentos endodônticos. O Apexit® Plus (AP), um cimento de hidróxido de cálcio, apresenta propriedades favoráveis (Marín et al. 2012). No entanto, apesar de já ter sido mostrado que este cimento apresenta baixa citotoxicidade em fibroblastos (Konjhodzic et al. 2015), um estudo *in vitro* mostrou que este material apresenta efeitos citotóxicos em períodos iniciais, (Badole et al. 2013). Há relatos também de que este cimento

não apresenta citotoxicidade, utilizando-se ensaio de MTT para determinar a viabilidade celular (Yilmaz et al. 2012). Até o presente momento, ainda não existem estudos *in vivo* sobre as propriedades biológicas do cimento AP que possam representar, portanto, condições semelhantes a que ocorrem na prática clínica.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a reação tecidual, no tecido subcutâneo de ratos, promovida pelo AP e SL por meio de análises morfológica e morfométrica nas cápsulas adjacentes aos implantes.

Material e Métodos

As respectivas composições e marcas comerciais dos cimentos AP e SL estão relacionadas na tabela 1.

Tabela 1 - Nome, composição e marca comercial dos materiais utilizados.

Materiais	Composição	Marca Comercial
Sealapex®	Óxido de cálcio, trióxido de Bismuto, óxido de zinco, sílica sub-micro, bióxido de titânio, estearato de zinco, fosfato tricálcio, Sulfonamida de tolueno etil, resina poli (salicilato de metil metileno, salicilato de isobutil e um pigmento.	SybronEndo/Kerr
Apexit® Plus	Sais de cálcio (hidróxido, óxido, fosfato), colofônia hidrogenada, di-salicilato, sais de bismuto (óxido, carbonato), dióxido de silício altamente disperso (silanizado) e alquil-éster do ácido fosfórico.	Ivoclar Vivadent

O protocolo de pesquisa na experimentação animal foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista, Brasil. (CEUA nº 4/2015-Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, Anexo-A). Foram utilizados 60

ratos machos Holtzman (*Rattus norvegicus albinus*), pesando em média 250 g, os quais foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas, com ração e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em grupos de acordo com o material testado e o período experimental. Os materiais foram manipulados e inseridos em tubos de polietileno com 10 mm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro interno, previamente esterilizados com óxido de etileno (Acecil). Após o preenchimento dos tubos com os materiais (tabela 1), estes foram imediatamente implantados no tecido conjuntivo subcutâneo dorsal dos ratos. Foram utilizados, para o grupo controle, tubos de polietileno vazios.

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg de peso corpóreo) associada com xilazina (4 mg/kg de peso corpóreo). Após a tricotomia e assepsia com solução de iodo a 5% da região dorsal do animal, realizou-se uma incisão de 2 cm com uma lâmina de bisturi (nº 15, Fibra Cirurgica, Joinville, SC, Brasil). O tecido foi divulsionado e, posteriormente, o tubo preenchido com um dos materiais ou o tubo vazio foram implantados (1 tubo em cada animal). Após os períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias, os tubos foram removidos juntamente com o tecido conjuntivo adjacente e preparados para análise ao microscópio de luz.

Processamento histológico

Os espécimes contendo os tubos de polietileno implantados foram fixados em formaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1M e pH 7,2 por 48 h em temperatura ambiente. Posteriormente, os espécimes foram desidratados e embebidos em parafina. Cortes longitudinais com espessura de 6 μm foram aderidos às lâminas de vidro e corados com hematoxilina & eosina (H&E) ou picrosirius para realização das análises.

Densidade numérica de células inflamatórias

O número de células inflamatórias na cápsula adjacente ao material implantado foi mensurado. Foram quantificados três cortes de cada implante, mantendo-se um intervalo mínimo de 100 μm entre os cortes. Com auxílio de uma câmera (DP-71, Olympus – Japão) acoplada ao microscópio de luz (Olympus, modelo BX-51), em aumento de 40x, imagens do tecido adjacente aos materiais implantados foram capturadas. Posteriormente, com um programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus – Japão), realizou-se a

contagem de células inflamatórias, em cada corte, em uma área teste de aproximadamente $0,09 \text{ mm}^2$ da cápsula. O valor total de células inflamatórias em cada animal (obtido a partir das áreas dos três cortes/implante) foi dividido pela área total ($0,27 \text{ mm}^2$) obtendo-se, assim, um valor de células inflamatórias/ mm^2 . Ao final, estabeleceu-se uma média para cada grupo experimental de acordo com o período experimental e o material estudado (Viola et al. 2012).

Mensuração do colágeno birrefringente

A quantidade de colágeno nas cápsulas foi estimada a partir de cortes corados com solução a 0,1% de Sirius Red (Sigma-Aldrich Co. Saint Louis, MO, EUA) e analisados com filtros de polarização acoplados ao microscópio de luz (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão). Foram utilizados 3 cortes, com intervalo mínimo de $100 \mu\text{m}$ por implante em todos os períodos. Em cada corte, uma imagem da cápsula foi capturada com auxílio de uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) e objetiva de 40x; Todas as imagens foram capturadas com parâmetros padronizados de intensidade de luz, abertura do diafragma do condensador, altura do condensador, objetiva, angulação do polarizador e brilho da imagem.

A quantidade de colágeno foi estimada usando metodologia previamente descrita (Manni ML et al. 2011, Koshimizu JY et al 2013). Com um processador de imagens (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), as cores proporcionadas pela birrefringência das imagens das cápsulas foram isoladas utilizando-se o histograma de matiz disponível na guia “Color Threshold”. O número de pixels de cada frequência de cor foi expresso como uma porcentagem do total de colágeno birrefringente daquele comprimento de onda no total da imagem. Deste modo, os dados representam, em porcentagem, a soma dos matizes nos 3 cortes de cada implante.

Análise estatística

Os parâmetros referentes à densidade numérica de células inflamatórias, e quantidade de colágeno birrefringente nas cápsulas foram submetidos ao programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific, Sausalito, CA, EUA). Aos dados aplicou-se o teste paramétrico ANOVA e teste Tukey, com nível de significância $p \leq 0,05$.

Resultados

Análise morfológica e densidade numérica de células inflamatórias

Aos 7 dias, tanto o SL quanto o AP induziram uma reação tecidual com inúmeras células inflamatórias, principalmente, neutrófilos e linfócitos, na cápsula adjacente aos implantes com os materiais. Frequentemente, foram visualizadas dispersas pelo tecido conjuntivo partículas de cimentos, principalmente, do AP (Fig. 1A). Ocasionalmente, algumas células gigantes foram observadas na cápsula adjacente ao AP, especialmente, próximas às partículas de cimento extravasado (Fig. 1A). Aos 15 dias, as cápsulas adjacentes aos implantes exibiram fibras colágenas entre fibroblastos; linfócitos, plasmócitos e macrófagos, apresentaram-se dispersos por toda a cápsula principalmente no grupo do AP (Fig. 1D). As cápsulas adjacentes aos diferentes materiais exibiram, aos 30 dias, feixes de fibras colágenas e típicos fibroblastos, havendo uma redução no processo inflamatório. No entanto, algumas células inflamatórias, ainda foram observadas, principalmente, no tecido justaposto à abertura do tubo contendo AP (Fig. 2A). Aos 60 dias, as cápsulas exibiram diversos fibroblastos dispostos entre os feixes de fibras colágenas; escassas células inflamatórias foram observadas, principalmente nos grupos SL e controle (Figs. 2E e 2F).

A comparação entre os grupos mostrou que aos 7 dias foi observado o maior número de células inflamatórias no tecido adjacente aos implantes. Em todos os períodos experimentais, o AP exibiu média estatisticamente superior ao SL e ao grupo controle. Em contrapartida, um número de CI significativamente menor foi observado nas cápsulas adjacentes aos tubos vazios (grupo controle) em comparação ao AP e ao SL (Tabela 2).

Mensuração do colágeno birrefringente

Aos 7 dias, as cápsulas exibiram poucas e finas fibras colágenas birrefringentes (Figuras 3A-3C); neste período, em todos os grupos experimentais, foi observado uma porcentagem significativamente menor de colágeno birrefringente (Tabela 2). Em contraposição, fibras colágenas espessas e fortemente birrefringentes foram observadas nos demais períodos, principalmente após 60 dias de implantação (Figuras 3J-3L). A birrefringência na cápsula adjacente ao AP foi significativamente menor quando comparado ao SL em todos os períodos experimentais; não foram observadas diferenças estatísticas entre o SL e o grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2 – Densidade numérica de células inflamatórias (CI) e porcentagem de colágeno birrefringente (COL) na cápsula adjacente aos diferentes materiais e grupo de controle.

	Apexit Plus	Sealapex	Controle
7 dias			
CI	1085,18 (44,59) ^{a,1}	785,92 (65,33) ^{b,1}	473,33 (79,84) ^{c,1}
COL	27,42 (2,39) ^{a,1}	32,48 (1,80) ^{b,1}	30,03 (1,72) ^{ab,1}
15 dias			
CI	991,85 (43,61) ^{a,2}	820,00 (48,61) ^{b,1}	334,81 (38,00) ^{c,2}
COL	28,60 (1,43) ^{a,1}	35,75 (5,31) ^{b,1}	39,29 (3,07) ^{b,2}
30 dias			
CI	917,03 (22,77) ^{a,3}	648,14 (23,85) ^{b,2}	343,70 (37,80) ^{c,2}
COL	32,02 (2,36) ^{a,2}	44,66 (5,50) ^{b,2}	42,64 (2,72) ^{b,2}
60 dias			
CI	813,33 (20,72) ^{a,4}	432,59 (9,58) ^{b,3}	302,22 (19,70) ^{c,2}
COL	34,04 (1,27) ^{a,2}	49,16 (4,77) ^{b,2}	54,24 (3,86) ^{b,3}

*Média (desvio padrão)

A comparação entre os períodos ($p < 0,05$) é indicada por números sobrescritos nas várias colunas.

A comparação entre os grupos ($p < 0,05$) é indicada pelo expoente diferente nas várias linhas.

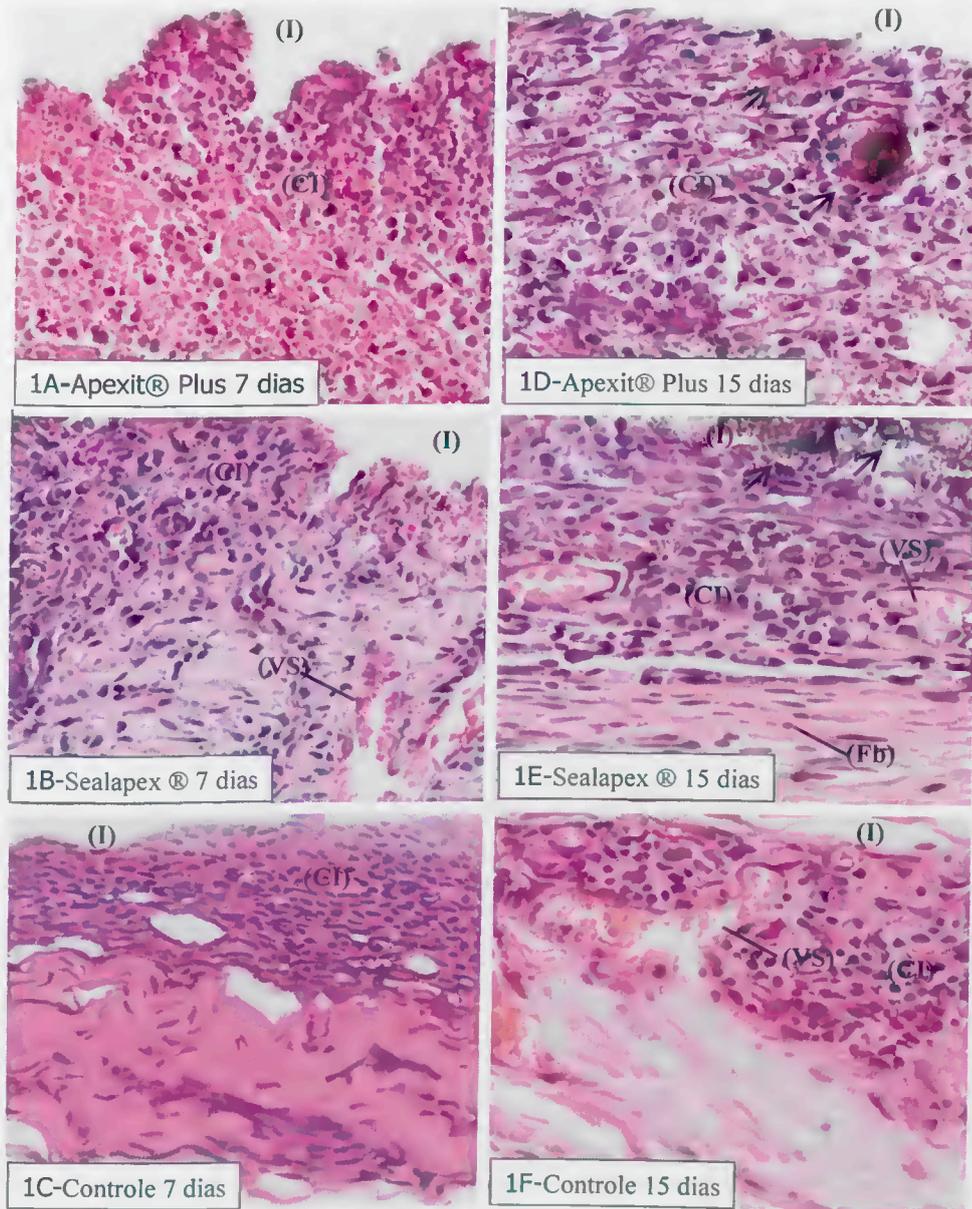


FIGURA 1 (1A – 1F) – Fotomicrográfas mostrando porções das cápsulas adjacentes aos implantes no subcutâneo de ratos após 7 dias (**Figuras 1A - 1C**) e 15 dias (**Figuras 1D – 1F**) corados com H&E. **Figura 1A** – diversas células inflamatórias (CI) são observadas por toda extensão do tecido conjuntivo que constitui a cápsula formada em resposta ao Apexit Plus próximo à abertura do tubo de polietileno (I). 695x. **Figura 1B** – a cápsula adjacente ao Sealapex exhibe inúmeras células inflamatórias (CI) por toda extensão do tecido conjuntivo, são observados vasos sanguíneos (VS). 695X. **Figura 1C** – imagem evidenciando as células inflamatórias (CI) pelo tecido adjacente ao grupo controle. 695x. **Figura 1D** – células inflamatórias (CI) são observadas por toda extensão da cápsula adjacente ao Apexit Plus após 15 dias; partículas do cimento (em negro) são vistas dispersas na cápsula. 695x. **Figura 1E**- reação tecidual ocasionada pelo Sealapex após 15 dias, evidenciando a presença de células inflamatórias (CI) próximas a abertura do tubo (I). Mais internamente, observa-se a reorganização tecidual com a presença de fibroblastos (Fb) entre os feixes de fibras colágenas. (VS), vasos sanguíneos. 695x. **Figura 1F**- reação tecidual ocasionada pelo tubo de polietileno vazio (controle). VS, vasos sanguíneos. 695x.

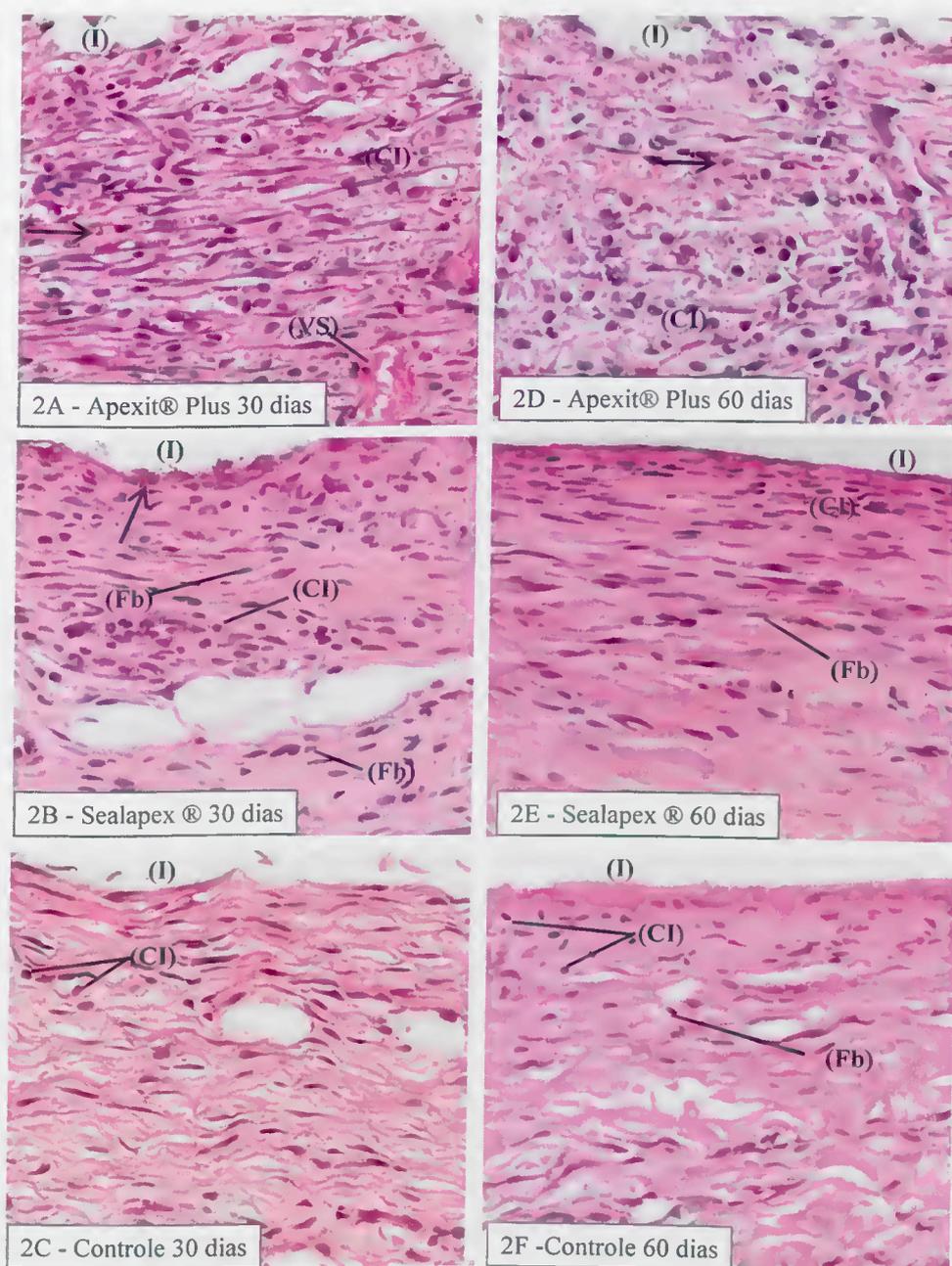


FIGURA 2 (2A – 2F) – Fotomicrográfiyas mostrando porções das cápsulas adjacentes aos implantes no subcutâneo de ratos após 30 dias (**Figuras 2A - 2C**) e 60 dias (**Figuras 2D – 2F**) corados com H&E. **Figura 2A** – diversas células inflamatórias (CI) são observadas dispersas por toda extensão do tecido conjuntivo que constitui a cápsula formada em resposta ao Apexit Plus; partículas do cimento (em negro) também são vistas pelo tecido próximo à abertura do tubo de polietileno (I). VS, vasos sanguíneos. 695X. **Figura 2B** – cápsula adjacente ao Sealapex exhibe algumas células inflamatórias (CI) por toda extensão do tecido conjuntivo. Em negro, são observadas partículas do cimento extravasado. Fc, feixes de fibras colágenas (Fb). **Figura 2C** – imagem evidenciando as células inflamatórias (CI) e reorganização celular. 695X. **Figura 2D**– células inflamatórias (CI) são observadas por toda extensão da cápsula adjacente ao Apexit Plus após 60 dias; em negro, partículas do cimento. 695x. **Figura 2E** – reação tecidual ocasionada pelo Sealapex após 60 dias, evidenciando a presença de células inflamatórias (CI) próximas a abertura do tubo (I). Mais internamente, observa-se a reorganização tecidual com a presença de fibroblastos (Fb) entre os feixes de fibras colágenas. 695x. **Figura 2F**– resposta tecidual após 60 dias com o grupo controle, são observadas por toda extensão da cápsula a reorganização tecidual com a presença de fibroblastos (Fb) e poucas células inflamatórias (CI). 695X.

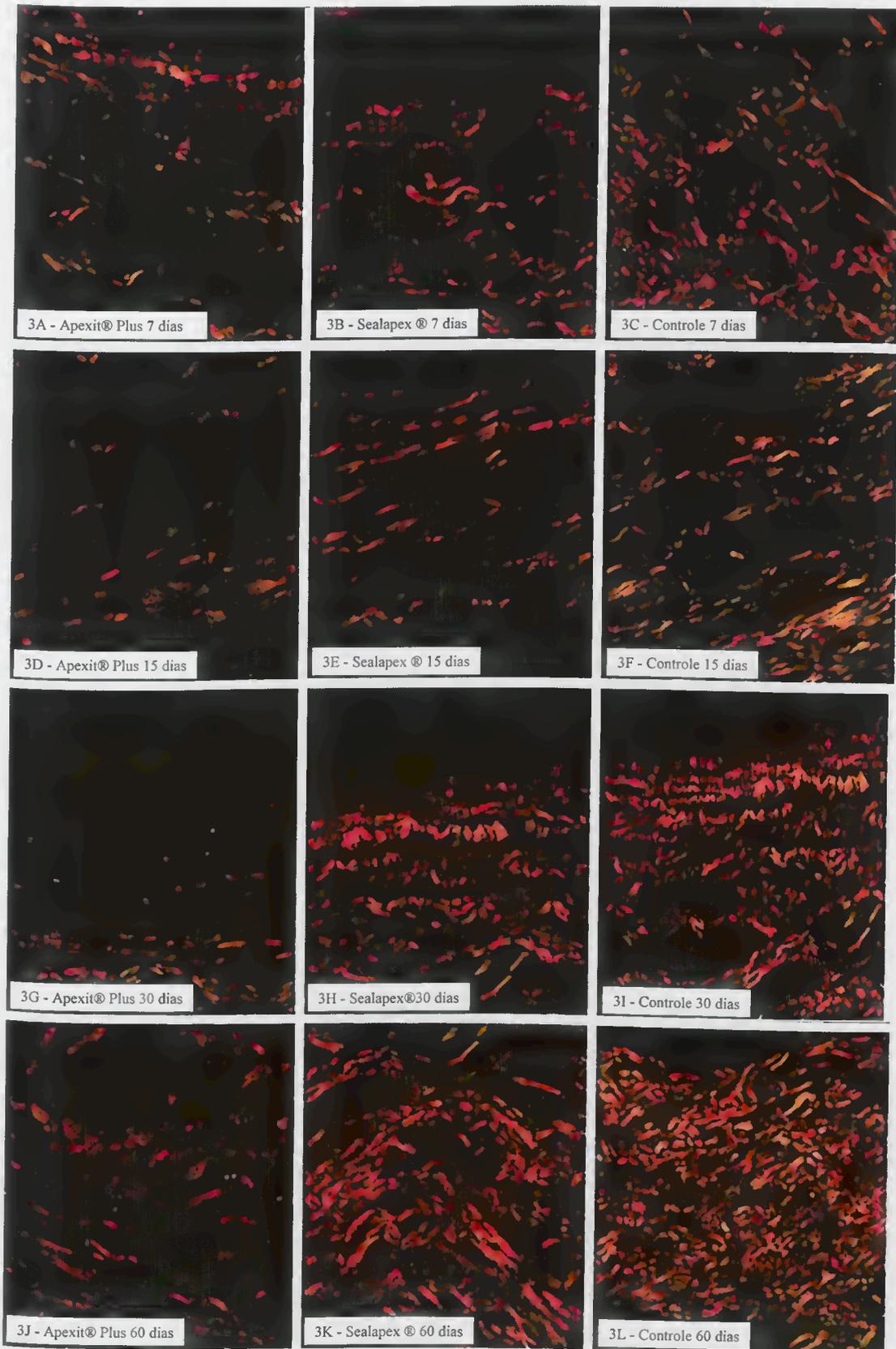


FIGURA 3 - (3A – 3L) – Fotomicrográfas mostrando porções das cápsulas adjacentes aos implantes no subcutâneo de ratos aos 7 dias (Figuras 3A - 3C), 15 dias (Figuras 3D – 3F), 30 dias (Figuras 3G - 3J) e 60 dias (Figuras 3J – 3L).

Os cortes foram corados com picrosirius e analisados ao microscópio com luz polarizada, evidenciando aumento de colágeno birrefringente (cores vermelho, amarelo e verde), sendo observado principalmente na cápsula adjacente aos implantes do Sealapex e controle aos 60 dias quando comparados ao período de 7 dias. 695X.

Discussão

Sabe-se que uma característica fundamental dos cimentos endodônticos é sua biocompatibilidade quando em contato com os tecidos apicais e periapicais. Esta propriedade está diretamente relacionada à composição destes materiais, uma vez que pode haver a liberação de substâncias que estimulam a migração e a diferenciação das células inflamatórias, ocasionam a produção de citocinas moduladoras da inflamação, exercendo um papel fundamental sobre o processo inflamatório (Shahi et al. 2010, Chang et al. 2014).

No presente estudo, avaliamos *in vivo* a biocompatibilidade do AP, que contém hidróxido de cálcio como principal componente, comparando-o ao SL. Nossos resultados, revelaram que os materiais testados promovem um intenso processo inflamatório aos 7 dias. Esta reação pode ser atribuída, pelo menos em parte, ao ato cirúrgico, porém, como o AP apresentou um número maior de células inflamatórias em comparação ao SL é viável afirmar que os componentes deste cimento e seus subprodutos induzem uma reação inflamatória mais intensa no subcutâneo de ratos (Cunha et al. 2011). Esta hipótese é reforçada pelo número reduzido de CI observadas nas cápsulas adjacentes aos tubos vazios (grupo controle). Neste período, foi observado também, no tecido adjacente aos implantes do AP e do SL, algumas zonas de necroses superficiais. Estas alterações morfológicas nos tecidos adjacentes a materiais que contém hidróxido de cálcio já foram amplamente demonstradas (Holland R et al. 2001, Faria G et al. 2005). Após 7 dias, foi verificada uma redução do número de células inflamatórias em todos os grupos, condicente com estudos anteriores para o SL (Cunha et al. 2011, Silveira et al. 2011), o tecido substituído parcialmente por feixes de fibras colágenas bem definidas com típicos fibroblastos e fibrócitos. No entanto, a análise dos dados ainda evidenciou diferenças significantes entre o AP e o SL em relação às CI em todos os períodos experimentais. Além disso, o SL apresentou uma quantidade de colágeno birrefringente significativamente maior do que o AP. Isto reforça fato de que o AP induz uma reação inflamatória maior do que o SL, atrasando a formação de fibras colágenas e, conseqüentemente, interferindo no reparo tecidual.

Esta reação inflamatória intensa provocada pelo AP, poderia ser explicada, pelo menos em parte, pela grande quantidade deste material extravasado no tecido adjacente, o que pode estar relacionado a uma alta solubilidade e escoamento deste cimento. Frequentemente, foram encontradas partículas de material dispersos nas cápsulas adjacentes ao AP, resultando, conseqüentemente, na presença de um grande número de células gigantes próximas ao

cimento extravasado. Além disso, um dos componentes do AP é o alquil-éster do ácido fosfórico, um produto que já se mostrou altamente tóxico em tecido de ratos (Fukuto 1983).

Conclusão

Apesar de os resultados do presente estudo evidenciarem uma redução do número de CI e um aumento na quantidade de colágeno birrefringente no tecido subcutâneo adjacente ao Apexit® Plus, especialmente, no período de 60 dias, pode-se concluir que este material apresenta uma resposta tecidual mais intensa do que o Sealapex®, fato que pode interferir na resposta clínica deste cimento endodôntico.

Referencias

- Ari H, Belli S, Gunes B (2010) Sealing ability of Hybrid Root SEAL (MetaSEAL) in conjunction with different obturation techniques. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* **109**,e113-116.
- Badole GP, Warhadpande MM, Meshram GK et al. (2013) A comparative evaluation of cytotoxicity of root canal sealers: an in vitro study. *Restorative dentistry & endodontics* **38**,204-9.
- Bernardes RA, de Amorim Campelo A, Junior DS et al. (2010) Evaluation of the flow rate of 3 endodontic sealers: Sealer 26, AH Plus, and MTA Obtura. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* **109**,e47-9.
- Binnie WH, Mitchell DF (1973) Induced Calcification in the subdermal tissues of the rat. *Journal of dental research* **52**,1087-91.
- Cañadas OS, Berástegui E, Gatón-Hernández P et al. (2014) Physicochemical properties and interfacial adaptation of root canal sealers. *Brazilian dental journal* **25**,435-41.
- Chang SW, Lee SY, Kang SK, Kum KY, Kim EC (2014) In vitro biocompatibility, inflammatory response, and osteogenic potential of 4 root canal sealers: Sealapex, Sankin apatite root sealer, MTA Fillapex, and iRoot Sp root canal sealer. *Journal of endodontics* **40**,1642-8.
- Cunha SA, Rached FJ Jr, Alfredo E, León JE, Perez DE (2011) Biocompatibility of sealers used in apical surgery: a histological study in rat subcutaneous tissue. *Brazilian dental journal*. **22**,299-305.
- Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O (1995) Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Brazilian dental journal* **6**,85-90.
- Faria G, Nelson-Filho P, Freitas AC, Assed S, Ito IY (2005) Antibacterial effect of root canal preparation and calcium hydroxide paste (Calen) intracanal dressing in primary teeth with apical periodontitis. *Journal of applied oral Science* **13**,351-55.

- Fukuto TR (1983) Toxicological properties of trialkyl phosphorothioate and dialkyl alkyl- and arylphosphonothioate esters. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes* **18**,89-117.
- Holland R, Souza V, Nery MJ et al. (2001) Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Brazilian Dental Journal* **12**,3-8.
- Holland R, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, de Souza V, Nery MJ, Dezan Júnior E (1998) Effect of root canal filling material and level of surgical injury on periodontal healing in dogs. *Endodontics & dental traumatology* **14**,199-205.
- Kaplan AE, Ormaechea MF, Picca M, Canzobre MC, Ubios AM (2013) Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. *International Endodontic Journal* **36**, 527-32.
- Konjhodzic-Prsic A, Jakupovic S, Hasic-Brankovic L, Vukovic A (2015) Evaluation of Biocompatibility of Root Canal Sealers on L929 Fibroblasts with Multiscan EX Spectrophotometer. *Acta informatica medica* **23**,135-7.
- Koshimizu JY, Beltrame FL, de Pizzol JP et al. (2013) NF-kB overexpression and decreased immunoexpression of AR in the muscular layer is related to structural damages and apoptosis in cimetidine-treated rat vas deferens. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* **9**,11-29.
- Leonardo MR, Almeida WA, da Silva LA, Utrilla LS (1998) Histological evaluation of the response of apical tissues to glass ionomer and zinc oxide-eugenol based sealers in dog teeth after root canal treatment. *Endodontics & dental traumatology* **14**,257-61.
- Manni ML, Czajka CA, Oury TD, Gilbert TW (2011) Extracellular matrix powder protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Tissue engineering. Part A* **17**,2795-804.
- Marín-Bauza GA, Silva-Sousa YT, da Cunha SA et al. (2012) Physicochemical properties of endodontic sealers of different bases. *Journal of applied oral Science* **20**,455-61.
- Mori GG, Rodrigues Sda S, Shibayama ST, Pomini M, do Amaral CO (2014b) Biocompatibility of a calcium hydroxide-propolis experimental paste in rat subcutaneous tissue. *Brazilian Dental Journal* **25**,104-8.
- Mori GG, Teixeira LM, de Oliveira DL, Jacomini LM, da Silva SR (2014a) Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats. *Journal of Endodontics* **41**,485-8.
- Schmalz G, Hoffmann M, Weis K, Schweikl H (2000) Influence of albumin and collagen on the cell mortality evoked by zinc oxide-eugenol in vitro. *Journal of Endodontics* **26**,284-7.
- Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H (1991) Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells "in vitro" in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. *Archives of oral biology* **36**,117-28.

- Shahi S, Rahimi S, Yavari HR et al. (2010) Effect of mineral trioxide aggregates and Portland cements on inflammatory cells. *Journal of endodontics* **36**,899-903.
- Silveira CM, Pinto SC, Zedebski Rde A, Santos FA, Pilatti GL (2011) Biocompatibility of four root canal sealers: a histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue. *Brazilian dental jornal* **22**,21-7.
- Tanomaru-Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Utrilla LS (1998) Effect of different root canal sealers on periapical repair of teeth with chronic periradicular periodontitis. *International Endodontic Journal* **31**,85-9.
- Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, Silva GF et al. (2012) Morphological and morphometric analysis of the biocompatibility of an experimental MTA Sealer. *Journal of Biomedical Materials Research Part B* **100**,1773-81.
- Whitworth J (2005) Methods of filling root canals: principles and practices. *Endodontic Topics* DOI: 10.1111/j.1601-1546.2005.00198.x.
- Yilmaz Z, Dogan AL, Ozdemir O, Serper A (2012) Evaluation of the cytotoxicity of different root canal sealers on L929 cell line by MTT assay. *Dental materials jornal* **31**,1028-32.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De um modo geral, os cimentos endodônticos devem possuir características ideais para ter seu uso em prática clínica permitido (Veloso et al.⁵¹, 2006), sendo estas características as propriedades físicas, químicas e antimicrobianas do material obturador, bem como a biocompatibilidade; esta última é fundamental a partir do momento em que o material fluído passa a ter contato com os tecidos apicais e periapicais. Esta propriedade está diretamente envolvida com a composição destes cimentos endodônticos pelo fato de que pode ocorrer liberação de substâncias que estimulam a migração e a diferenciação das células inflamatórias, de forma a produzir citocinas moduladoras da inflamação e, portanto, exercer um papel fundamental sobre o processo inflamatório (Shahi et al.³⁹, 2010).

Em todos os estudos apresentados, tais características foram exploradas comparando-se o cimento Sealapex[®] (SL - marca comercial conhecida e amplamente utilizada em meio clínico) com o Apexit[®] Plus (AP). O AP, após ter sido desenvolvido e comercializado em 2008, foi um material explorado, e tornou-se oportuna a pesquisa para compará-lo a uma marca consagrada no mercado, como o SL. O primeiro capítulo deste estudo baseou-se em analisar somente características físicas, químicas e antimicrobianas de ambos os cimentos, comparando-os.

Ambos os materiais estavam de acordo com todas as normativas necessárias, sendo a ANSI/ADA especificação 57¹, a qual exige que o cimento não apresente um diâmetro inferior a 20 mm, tempo de presa dentro de 10% do indicado pelos fabricantes, sendo eles (135 minutos e 120 minutos respectivamente) e radiopacidade maiores que 3 mm de Al, mínimo valor recomendado pelo (ISO 6876⁸ e ANSI/ADA 57¹). Características como escoamento, tempo de presa e solubilidade apresentaram-se significativamente superiores no cimento AP; a radiopacidade, no entanto, foi maior no SL devido a presença de trióxido de bismuto a 29% em sua composição (Húngaro Duarte et al.²⁶, 2012), que tem maiores índices de radiopacidade que o carbonato de bismuto do AP (Húngaro Duarte et al.²⁵, 2009).

Os valores de pH foram semelhantes para os dois materiais, de neutro a levemente alcalino, com aumento em apenas alguns períodos, mas sem diferença estatística significativa entre ambos os cimentos. Esperava-se uma característica alcalina em ambos os grupos devido ao fato de em sua composição conter sais de

cálcio ou hidróxido de cálcio (Bystrom et al.⁹, 1985; Sjögren et al.⁴⁴, 1991). Uma semelhança de resultados também foi observada no teste antimicrobiano com *Enterococcus faecalis* em fase planctônica, no qual ambos os materiais inibiram o crescimento bacteriano; isto pode ser devido ao fato de liberarem íons hidroxila no meio, tornando o ambiente menos favorável ao desenvolvimento microbiano (Siqueira JF et al.⁴², 1999) e atuando sobre as enzimas da membrana celular microbiana, gerando perda de atividade biológica e destruição da membrana citoplasmática (Gomes et al.²¹, 2004; Desai et al.¹³, 2009; Seelan et al.³⁶, 2015). Desta forma, levando-se em conta o primeiro capítulo, o uso clínico do AP seria eficaz e condizente com um selamento apropriado do sistema de canais radiculares.

No segundo capítulo, foi avaliada *in vivo* a biocompatibilidade do AP (cimento à base de hidróxido de cálcio), comparando-o ao SL. De modo geral, ambos causam um intenso processo inflamatório nos períodos mais iniciais (7 dias), sendo que o procedimento cirúrgico nos ratos utilizados é responsável apenas em parte por tal inflamação. Foram observadas diversas células inflamatórias (CI), além de zonas de necrose nos tecidos adjacentes aos implantes com cimentos, alterações morfológicas amplamente demonstradas em tecidos adjacentes em contato com materiais à base de hidróxido de cálcio (Faria et al.¹⁷, 2007). Após os 7 dias, observou-se uma redução no número de CI e a substituição das mesmas por feixes de fibras colágenas bem definidas, com típicos fibroblastos e fibrócitos. No entanto, o processo inflamatório mostrou-se mais intenso em amostras com AP, sendo que essa redução de CI foi mais lenta, bem como a observação do colágeno birrefringente foi significativamente menor comparada a do SL; como houve um atraso na formação dessas fibras, o reparo tecidual foi alterado.

Essa situação visualizada nas amostras com AP deve-se, ao menos em parte, à grande quantidade deste material extravasado no tecido adjacente, fato que pode estar relacionado a uma alta solubilidade deste cimento. Frequentemente, foram encontradas partículas de material dispersos nas cápsulas adjacentes ao AP, resultando na presença de grande densidade numérica de células gigantes próximas ao cimento extravasado. Além disso, um dos componentes do AP é o alquil-éster do ácido fosfórico, um produto que já se mostrou altamente tóxico em tecido de ratos (Fukuto¹⁹, 1983).

Mesmo que tenha ocorrido diminuição do número de CI e consequente aumento na densidade de colágeno birrefringente no tecido subcutâneo adjacente ao AP (especialmente aos 60 dias), a resposta tecidual foi mais intensa quando comparada à do SL. Este processo inflamatório intensificado deve ser levado em consideração, por poder interferir na resposta clínica desse cimento endodôntico.

5 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais em que esta pesquisa foi desenvolvida e com base nos resultados obtidos, podemos concluir que;

- Os cimentos Apexit® Plus e Sealapex® apresentaram propriedades físicas, químicas e antimicrobianas satisfatórias;
- Os resultados do teste de biocompatibilidade mostraram uma reação inflamatória intensa no período de 7 dias, para ambos os cimentos, havendo uma diminuição estatisticamente significativa no período de 60 dias, principalmente no cimento Sealapex. No entanto, ainda há necessidade de outros estudos para melhores conclusões.

REFERÊNCIAS*

1. American Dental Association - ANSI/ADA . Specification 57: endodontic sealing material. Chicago: ANSI/ADA; 2000.
2. Ari H, Belli S, Gunes B. Sealing ability of Hybrid Root SEAL (MetaSEAL) in conjunction with different obturation techniques. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(6): e113-6.
3. Badole GP, Warhadpande MM, Meshram GK, Bahadure RN, Tawani SG, Tawani G et al. A comparative evaluation of cytotoxicity of root canal sealers: an in vitro study. *Restor Dent Endod.* 2013; 38(4): 204-9.
4. Batista RF, Hidalgo MM, Hernandez L, Consolaro A, Velloso TR, Cuman RK, et al. Microscopic analysis of subcutaneous reactions to endodontic sealer implants in rats. *J Biomed Mater Res A.* 2007; 81(1): 171-7.
5. Becker RM, Hume WR, Wolinsky LE. Release of eugenol from mixtures of in vitro. *J Pedod.* 1983; 8(1):71-7.
6. Binnie WH, Mitchell DF. Induced calcification in the subdermal tissues of the rat. *J Dent Res.* 1973; 52(5): 1087-91.
7. Blackman R, Gross M, Seltzer S. An evaluation of the biocompatibility of a glass ionomer-silver cement in rat connective tissue. *J Endod.* 1989; 15(2): 76-9.
8. International Organization for Standardization . ISO 6876: dental root canal sealing materials. Geneve: ISO; 2002.
9. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J.* 1985; 18(1) :35-40.
10. Camilleri J. Sealers and warm gutta-percha obturation techniques. *J Endod.* 2015; 41(1): 72-8.
11. Cañadas PS, Berástegui E, Gatón-Hernández P, Silva LA, Leite GA, Silva RS. Physicochemical properties and interfacial adaptation of root canal sealers. *Braz Dent J.* 2014; 25(5): 435-41.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca:
<http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

12. Chang SW, Lee SY, Kang SK, Kum KY, Kim EC. In vitro biocompatibility, inflammatory response, and osteogenic potential of 4 root canal sealers: Sealapex, Sankin apatite root sealer, MTA Fillapex, and iRoot SP root canal sealer. *J Endod.* 2014; 40(10): 1642-8.
13. Desai S, Chandler N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. *J Endod.* 2009; 35(4): 475-80.
14. El Sayed MA, Etemadi H. Coronal discoloration effect of three endodontic sealers: an in vitro spectrophotometric analysis. *J Conserv Dent.* 2013; 16(4): 347-51.
15. Ersahan S, Aydin C. Solubility and apical sealing characteristics of a new calcium silicate-based root canal sealer in comparison to calcium hydroxide-, methacrylate resin- and epoxy resin-based sealers. *Acta Odontol Scand.* 2013; 71(3-4): 857-62.
16. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J.* 1995; 6(2): 85-90.
17. Faria G, Nelson-Filho P, Freitas AC, Assed S, Ito IY. Antibacterial effect of root canal preparation and calcium hydroxide paste (Calen) intracanal dressing in primary teeth with apical periodontitis. *J Appl Oral Sci.* 2005; 13(4): 351-5.
18. Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J.* 2013; 46(8): 755-62.
19. Fukuto TR. Toxicological properties of trialkyl phosphorothioate and dialkyl alkyl- and arylphosphonothioate esters. *J Environ Sci Health B.* 1983; 18(1): 89-117.
20. Gjorgievska E, Apostolska S, Dimkov A, Nicholson JW, Kaftandzieva A. Incorporation of antimicrobial agents can be used to enhance the antibacterial effect of endodontic sealer. *Dent Mater.* 2013; 29(3): e29-34.
21. Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19(2): 71-6.
22. Grossman LI, Oliet S, Del Rio CE, *Endodontic practice* 11th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1988.

23. Haragushiku GA, Sousa-Neto MD, Silva-Sousa YT, Alfredo E, Silva SC, Silva RG. Adhesion of endodontic sealers to human root dentine submitted to different surface treatments. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(3): 405-10.
24. 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(5): 542-9.
25. Húngaro Duarte MA, de Oliveira El Kadre GD, Vivan RR, Guerreiro Tanomaru JM, Tanomaru Filho M, de Moraes IG. Radiopacity of protland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod.* 2009; 35(5): 737-40.
26. Hungaro Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru Filho M, et al. Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and whitemineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2012; 38(3): 394-7.
27. Jainaen A, Palamara JE, Messer HH. Push-out bond strengths of the dentine-sealer interface with and without a main cone. *Int Endod J.* 2007; 40(11): 882-90.
28. Kazemi RB, Safavi KE, Spångberg LS. Dimensional changes of endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993; 76(6): 766-71
29. Kim YK, Grandini S, Ames JM, Gu LS, Kim SK, Pashley DH, et al. Critical review on methacrylate resin-based root canal sealers. *J Endod.* 2010; 36(3): 383-99.
30. Kolokouris I, Economides N, Beltes P, Vlemmas I. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod.* 1998; 24(2): 82-5.
31. Leonardo MR, Almeida WA, da Silva LA, Utrilla LS. Histological evaluation of the response of apical tissues to glass ionomer and zinc oxide-eugenol based sealers in dog teeth after root canal treatment. *Endod Dent Traumatol.* 1998; 14(6): 257-61.
32. Leonardo MR, Leal JM. Materiais obturadores de canais radiculares. In: Leonardo MR. *Endodontia - tratamento de canais radiculares.* São Paulo: Artes Médicas; 2005. p. 1063-145.
33. Marín-Bauza GA, Silva-Sousa YT, da Cunha SA, Rached-Junior FJ, Bonetti-Filho I, Sousa-Neto MD, et al. Physicochemical properties of endodontic sealers of different bases. *J Appl Oral Sci.* 2012; 20(4): 455-61.
34. Salz U, Poppe D, Sbicego S, Roulet JF. Sealing properties of a new root canal sealer. *Int Endod J.* 2009; 42(12): 1084-9.

35. Schilder H. Filling root canals in three dimensions. 1967. *J Endod.* 2006; 32(4): 281-90.
36. Seelan RG, Kumar AA, Emil Sam RJ, Maheswari SU. Antimicrobial efficacy of different root canal sealers by using real-time polymerase chain reaction: an ex vivo study. *J Conserv Dent.* 2015; 18(6): 474-8.
37. Senges C, Wrbas KT, Altenburger M, Follo M, Spitzmüller B, Wittmer A et al. Bacterial and *Candida albicans* adhesion on different root canal filling materials and sealers. *J Endod.* 2011; 37(9): 1247-52.
38. Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. *Arch Oral Biol.* 1991; 36(2): 117-28.
39. Shahi S, Rahimi S, Yavari HR, Mokhtari H, Roshangar L, Abasi MM et al. Effect of mineral trioxide aggregates and Portland cements on inflammatory cells. *J Endod.* 2010; 36(5): 899-903.
40. Shih YH, Lin DJ, Chang KW, Hsia SM, Ko SY, Lee SY et al. Evaluation physical characteristics and comparison antimicrobial and antiinflammation potentials of dental root canal sealers containing hinokitiol in vitro. *PLoS One.* 2014; 10;9(6): e94941.
41. Silva-Herzog D, Ramírez T, Mora J, Pozos AJ, Silva LA, Silva RA et al. Preliminary study the inflammatory response to subcutaneous implantation of three root canal sealers. *Int Endod J.* 2011; 44(5): 440-6.
42. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999; 32(5): 361-9.
43. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves FR, Santos KR. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation. *J Endod.* 2004; 30(9): 638-43.
44. Sjögren U, Figdor D, Spångberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J.* 1991; 24(3): 119-25.
45. Slutzky-Goldberg I, Slutzky H, Solomonov M, Moshonov J, Weiss EI, Matalon S. Antibacterial properties of four endodontic sealers. *J Endod.* 2008; 34(6): 735-8.
46. Souza EM, Wu MK, van der Sluis LW, Leonardo RT, Bonetti-Filho I, Wesselink PR. Effect of filling technique and root canal area on the percentage of gutta-percha in laterally compacted rootfillings. *Int Endod J.* 2009; 42(8): 719-26.
47. Tanomaru Filho M, Chaves Faleiros FB, Saçaki JN, Hungaro Duarte Ma, Guerreiro-Tanomaru JM. Evaluation of pH and calcium ion release of root-end filling materials containing calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2009; 35(10): 1418-21.

48. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Utrilla LS. Effect of diferente root canal sealers on periapical repair of teeth with chronic periradicular periodontitis. *Int Endod J*. 1998; 31(2): 85-9.
49. Valera MC, Anbinder AL, Carvalho YR, Balducci I, Bonetti Filho I, Consolaro A. Avaliação da compatibilidade biológica do cimento Sealapex® e deste cimento acrescido de iodofórmio ou óxido de zinco. *Cienc Odontol Bras*. 2005; 8(4): 29-3.
50. Valera MC, Anbinder AL, Leonardo MR, Parizoto NA, Kleine M U. Cimentos endodônticos: análise morfológica imediata e após seis meses utilizando microscopia de força atômica. *Pesqui Odontol Bras*, 2000; 14(3) 199-204.
51. Veloso HH, do Santos RA, de Araújo TP, Leonardi DP, Baratto Filho F. Histological analysis of the biocompatibility of three different calcium hydroxide-based root canal sealers. *J Appl Oral Sci*. 2006; 14(5): 376-81.
52. Whitworth J, Methods of filling root canals: principles and practices. *Endod Topics*. 2005; 12(1): 2-24.
53. Wu MK, Van Der Sluis LW, Wesselink PR. Fluid transport along gutta-percha backfills with and without sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 97(2): 257-62.
54. Xuereb M, Vella P, Damidot D, Sammut CV, Camilleri J. In situ assessment of the setting of tricalcium silicate-based sealers using a dentin pressure model. *J Endod*. 2015; 41(1): 111-24.
55. Yilmaz Z, Dogan AL, Ozdemir O, Serper A. Evaluation of the cytotoxicity of different root canal sealers on L929 cell line by MTT assay. *Dent Mater J*. 2012; 31(6): 1028-32.

Anexo A – Certificado de aprovação do Comitê de Ética no uso de animais.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Proc. CEUA nº 4/2015

Araraquara, 2 de abril de 2015.

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA desta Faculdade, em reunião hoje realizada, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "**AVALIAÇÃO DA REAÇÃO TECIDUAL INDUZIDA PELOS CIMENTOS SEALAPEX E APEXIT PLUS NO SUBCUTÂNEO DE RATOS**" (Proc. CEUA nº 4/2015) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para AGOSTO/2016.

Atenciosamente.

Elisa Maria Ap Giro
Prof. Dra. ELISA MARIA APARECIDA GIRO
1º Coordenador Substituto da CEUA

Ao
Prof. Dr. IDOMEIO BONETTI FILHO
DD. Pesquisador Responsável
Departamento de Odontologia Restauradora

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 28/03/2018.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 28 de março de 2016.

ROBERTO ALMELA HOSHINO