



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



GABRIELA MARIANA CASTRO NÚÑEZ

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ANTIMICROBIANAS
SOBRE *Enterococcus faecalis* DO MINERAL TRIÓXIDO AGREGADO
ASSOCIADO A ÓLEO DE MELALEUCA OU FARNESOL**

Araraquara

2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



GABRIELA MARIANA CASTRO NÚÑEZ

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E
ANTIMICROBIANAS SOBRE *Enterococcus faecalis* DO MINERAL
TRIÓXIDO AGREGADO ASSOCIADO A ÓLEO DE MELALEUCA OU
FARNESOL**

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

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Juliane Maria Guerreiro
Tanomaru

Araraquara

2016

Castro-Núñez, Gabriela Mariana

Avaliação de propriedades físico-químicas e antimicrobianas sobre *Enterococcus faecalis* do mineral trióxido agregado associado a óleo de melaleuca ou farnesol / Gabriela Mariana Castro-Núñez.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

53 f. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

1. Propriedades físicas e químicas 2. *Enterococcus faecalis* 3.
Materiais dentários 4. Óleo de Melaleuca I. Título

GABRIELA MARIANA CASTRO NÚÑEZ

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E
ANTIMICROBIANAS SOBRE *Enterococcus faecalis* DO MINERAL
TRIÓXIDO AGREGADO ASSOCIADO A ÓLEO DE MELALEUCA OU
FARNESOL**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Comissão julgadora

Presidente e Orientador: Prof.^a Dr.^a Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

2º Examinador: Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo

3º Examinador: Prof. Dr. Evandro Watanabe

Araraquara, 29 de março de 2016

DADOS CURRICULARES

GABRIELA MARIANA CASTRO NÚÑEZ

NASCIMENTO 04/12/1989
Tacna - Peru

FILIAÇÃO Jose Santos Castro Pavez
Jesus Esperanza Núñez de Castro

2008-2012 Universidad Católica de Santa Maria - UCSM
Arequipa – Peru

2014-2016 Especialização em Endodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2014-2016 Mestrado em Odontologia – Área de Endodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

DEDICATÓRIA

A Deus,

Por minha vida cheia de amor, pela família, amigos e boas pessoas que colocou no meu caminho para me guiar e acompanhar. Por ter feito que o universo conspire a fim de poder realizar meus sonhos e por me colocar no lugar e momento certos; pela sua presença e fortaleza constante para nunca desistir e dar sempre o melhor de mim.

Aos meus pais Jose e Esperanza,

Meus primeiros e melhores mestres, guias e exemplos de vida, de pessoa e de profissional, por todos os ensinamentos, teóricos (papi) e práticos (mami); por ter dedicado suas vidas a encher minha vida e a dos meus irmãos de amor e coisas boas, por ter criado 4 pessoas do bem para este mundo, hoje em dia tão difícil. Pela oportunidade e apoio incondicional para conseguir meus objetivos, tanto moral como económico, e porque apesar da distância nunca senti a sua ausência; sem vocês nada disto poderia ser realidade. Por ter-me ensinado que se há que fazer alguma coisa devemos fazê-la o melhor possível, se não é melhor nem fazê-la. E principalmente que “vimos a este mundo para servir e não para ser servidos”. No tengo como agradecerles, ¡los amo!

Aos meus irmãos Raquel, Dalila e Roberto,

Pelo apoio, amizade e exemplo, obrigada porque vocês contribuíram a fazer de mim a pessoa que hoje sou, e porque mesmo no tempo e na distância sabemos que temos amor incondicional em 4 lugares do mundo, onde seja que nos encontremos, ¡los quiero mucho!.

A Wilo,

Meu namorado e companheiro mais próximo neste caminho, por teu apoio incondicional, por tua compreensão e palavras para me acalmar e continuar nos momentos mais difíceis, por tua boa disposição sempre para me ajudar, por tua paciência, alegria e companhia; porque foi por você e sua perseverança que viemos em busca de nossos objetivos. Só me resta te agradecer por sempre estar em busca de minha tranquilidade, felicidade e bem-estar, por tua preocupação e dedicação para cuidar de mim. Te amo gordito!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A minha orientadora Professora Dr.^a **Juliane Maria Guerreiro-Tanomaru**, e meu co-orientador Professor Dr. **Mario Tanomaru-Filho**, por ter aceitado que trabalhe com vocês mesmo sem conhecer-me, pela confiança depositada em mim, pelo acolhimento, paciência e convivência harmoniosa e pelo conhecimento compartilhado em estes dois anos.

Ao meu Professor **Hair Salas Beltrán**, por ter sido parte fundamental na minha graduação no Peru, por ter me proporcionado a oportunidade de capacitar-me profissionalmente na área que você mais domina, ter confiado na minha capacidade e ter me recomendado com os seus amigos, eternamente agradecida!

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia de Araraquara**, na figura da Diretora, **Prof.^a Dr.^a Elaine Maria Sgavioli Massucato**, e do Sub-Diretor **Prof. Dr. Edson Alves de Campos**, pela infraestrutura necessária para a execução deste trabalho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara**, representado pelo **Prof. Dr. Carlos Rossa Junior**, pela oportunidade de realizar meu Mestrado.

A todos os Professores do programa da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Em especial aos professores da **Endodontia**, **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert**, **Prof.^a Dr.^a Gisele Farias**, **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho**, **Prof.^a Dr.^a Juliane Maria Guerreiro-Tanomaru**, **Prof. Dr. Mario Tanomaru-Filho**, **Prof. Dr. Milton Carlos Kuga**, **Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo**, pelos ensinamentos compartilhados no Mestrado e na Especialização, por estar sempre com boa disposição para ajudar-me e esclarecer minhas dúvidas. Este tempo foi muito importante para meu crescimento profissional.

À minha banca de qualificação de Mestrado, **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho**, **Prof.^a Dr.^a Juliane Maria Guerreiro-Tanomaru** e **Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo**, pela análise criteriosa e importantes sugestões atribuídas a este trabalho.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro na forma de concessão de bolsa de Mestrado.

Aos funcionários da **Seção da Pós-Graduação**, **Mara**, **Alexandre** e **Cristiano**, que foram muito prestativos para me ajudar mesmo antes de me conhecer.

A todos os funcionários da FOAr, especialmente a **Marinho**, por sempre resolver meus problemas de materiais, estar sempre com um sorriso para me atender não só no Mestrado como na Especialização. A **Dona Cida** e **Alessandra**, pela boa disposição para resolver as necessidades nossas para o desenvolvimento das pesquisas. A **Fátima** da Clínica de Urgência, pelo carinho e amizade tão especiais.

Ao **Prof. Dr. Milton Carlos Kuga, Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo, Prof. Dr. Edson Alves de Campos, Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi**, pela grande amizade que me ofereceram, a confiança e ensinamentos, pelas múltiplas conversas de diversos temas com alguns em espanhol, pelos ensinamentos profissionais e de vida que compartilharam comigo.

Aos colegas da Pós-Graduação em Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP, **Roberta Bosso-Martelo, Raqueli Viapiana, Elissandra Rodrigues, Ana Carolina Venção, Ariele Patrícia Rabello, Bernardo Cesar Costa, Camila Almeida Nascimento, Camila Galletti Espir, Gisselle Moraima Chávez Andrade, Juliana Alcarás Saraiva, Natália Guimarães Kalatzis Sousa e Tiago Silva da Fonseca**, por estar sempre prestes a me ajudar no que precisei, tanto na pesquisa, ensinando desde o começo o funcionamento das coisas e pela boa convivência.

A minha turma de mestrado da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP, **Aline Silva Andrade, Derik Damasceno Barbosa, Fernanda Ferrari Esteves Torres, Kennia Scapin Viola e Rodrigo Arruda Vasconcelos**, pela convivência tanto no Mestrado quanto na Especialização, pelos momentos de risada e de conforto que sempre tiveram comigo; **Larissa Torres de Almeida, Lauriê Garcia Belizário, Roberto Almela Roshino** por todo esse tempo de convivência fora e dentro da faculdade, pela dedicação de cada um de vocês neste caminho que fizemos juntos.

Aos meus amigos, **Aline, Derik, Fer, Lari, Lauris, Kennia e Rob**, por oferecerem-me desde o começo, sua amizade sincera, por me apoiar nos momentos mais difíceis de saudades, por me levar e ajudar a resolver os problemas que tivemos, pelo seu tempo e carinho para corrigir minhas coisas com meu português ruim, muito obrigada por estes dois anos, realmente cada um de vocês marcou minha vida e estarão no meu coração para sempre!

E a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte desta história e contribuíram ao meu desenvolvimento nestes dois anos.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

Castro-Núñez GM. Avaliação de propriedades físico-químicas e antimicrobianas sobre *Enterococcus faecalis* do mineral trióxido agregado associado a óleo de melaleuca ou farnesol [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) é um biomaterial reparador, suas propriedades antimicrobianas podem ser favorecidas pelo acréscimo de substâncias naturais como o Óleo de Melaleuca (OME) e o Farnesol (FAR). OME é um óleo essencial, e Farnesol, um sesquiterpeno, ambos apresentam propriedades antibacterianas. O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades físico químicas e antimicrobianas das associações MTA/OME 1%, MTA/OME 2%, MTA/FAR 1% e MTA/FAR 2% e compará-los com o MTA. **Métodos:** Os testes seguiram especificações da ISO e ADA. O tempo de presa inicial (TPI) e final (TPF) foram medidos com agulhas Gilmore. A solubilidade foi calculada pela perda de massa após 7 e 30 dias. A alteração volumétrica em micro-ct foi analisada nos períodos de 7 e 30 dias. A radiopacidade foi verificada com radiografias dos materiais e escala de alumínio. O pH foi mensurado com pHmetro digital. A atividade antibiofilme foi analisada pela redução de biomassa de biofilme de *Enterococcus faecalis* após contato com o material, pelo Ensaio de Cristal Violeta (CV). O teste de Contato Direto Modificado (DCTM) foi avaliado após plaqueamento e contagem de Unidades Formadoras de Colônia por ml (UFCmL⁻¹). Os resultados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey, com 5% de significância. Este estudo foi dividido em dois capítulos: **CAPÍTULO 1:** Este estudo avaliou propriedades físico-químicas e antimicrobianas do MTA, MTA/OME 1% e MTA/OME 2%. **Resultados:** Radiopacidade e solubilidade foram semelhantes para os 3 materiais ($p>0.05$). TPI e TPF foi menor para MTA e maior para MTA/OME 2% ($p>0.05$). A análise com micro-CT após 7 dias não mostrou diferença significativa ($p<0.05$) e aos 30 dias MTA/OME 2% apresentou maior volume ($p>0.05$). Os materiais foram semelhantes em relação ao pH ($p<0.05$). MTA/OME 2% proporcionou maior redução de biomassa de biofilme que os demais materiais ($p>0.05$), tanto no ensaio CV quanto no DCTM. **Conclusão:** A adição de Óleo de Melaleuca ao MTA aumentou o tempo de presa, e manteve outras propriedades físico-químicas do MTA. A adição de 2% de Óleo de Melaleuca aumentou a propriedade antibiofilme do MTA. **CAPÍTULO 2:** O objetivo deste estudo foi avaliar propriedades físico-químicas e atividade antibiofilme do MTA, MTA/FAR 1% e MTA/FAR 2%. **Resultados:** TPI e TPF foram menores para MTA ($p<0,05$). Radiopacidade e solubilidade foram semelhantes entre os materiais ($p>0,05$). Nos períodos de 1 e 3 dias, MTA com FAR 1 e 2 % apresentaram maior pH, que foi semelhante para os materiais nos demais períodos. MTA associado ao Far 1 e 2% promoveram maior redução de biomassa de biofilme ($p<0,05$). **Conclusão:** A adição de Farnesol 1 e 2% favorece a atividade antibiofilme do MTA, e mesmo aumentando tempo de presa, proporciona propriedades físico-químicas adequadas.

Palavras-chave: Propriedades físicas e químicas. *Enterococcus faecalis*.

Materiais dentários. Óleo de melaleuca.

Castro-Núñez GM. Physico-chemical and antimicrobial properties against *Enterococcus faecalis* of mineral trioxide aggregate associated with tea tree oil or farnesol [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

Mineral trioxide aggregate (MTA) is a restorative biomaterial, its antimicrobial properties can be favored by natural substances increase as Tea tree oil (TTO) and Farnesol (FAR). TTO is an essential oil, and farnesol is a sesquiterpene, both have antibacterial properties. The main of this study was to evaluate the physico-chemical and antimicrobial properties of the associations: MTA/OME 1%, MTA/OME 2%, MTA/FAR 1% and MTA/FAR 2% in comparison with MTA. Methods: The tests followed ISO and ADA specifications. The initial setting time (IST) and final (FST) were measured with Gilmore needles. The solubility was calculated by weight loss after 7 and 30 days. Volumetric alteration in micro-CT was analyzed at 7 and 30 days. Radiopacity was observed with X-rays of the materials and aluminum scale. The pH was measured with a digital pH-meter. The antibiofilm activity was analyzed by reducing biomass biofilm *Enterococcus faecalis* after contact with materials, Crystal Violet Assay (CV) and Direct contact test Modified (DCTM) biofilm was previously induced and analysed by the counting of colony-forming units (CFU mL⁻¹). The results were submitted to ANOVA and Tukey test, with 5% significance. This study was divided into two chapters: **Chapter 1:** This study evaluated the physico-chemical and antimicrobial properties of MTA, MTA/OME 1% and MTA/OME 2%. **Results:** Radiopacity and solubility were similar for the three materials ($p > 0.05$). IST and FST was lower for MTA and higher for MTA/OME 2% ($p > 0.05$). The analysis with micro-CT after 7 days showed no significant difference ($p < 0.05$) and after 30 days MTA/OME 2% showed higher volume ($p > 0.05$). The materials were similar in pH ($p < 0.05$). MTA/OME 2% provided greater reduction of biomass of biofilm than the other materials ($p > 0.05$) in CV assay and DCTM. Conclusion: The addition of TTO to the MTA increased the setting time, and maintained the other physicochemical properties of the MTA. The addition of 2% Tea Tree Oil increased antibiofilm property MTA. **Chapter 2:** The objective of this study was to evaluate the physic-chemical properties and antibiofilm activity of MTA, MTA/FAR 1% and MTA/FAR 2%. **Results:** IST and FST were lower for MTA ($p < 0.05$). Radiopacity and solubility were similar among the materials ($p > 0.05$). In the periods of 1 and 3 days, MTA with FAR 1 and 2% had higher pH, in the other periods was similar to the materials. MTA associated with Far 1 and 2 % caused further reduction of biomass of biofilm ($p < 0.05$). **Conclusion:** The addition of Farnesol 1 and 2% promotes antibiofilm activity of the MTA, and even increasing setting time, provides appropriate physical and chemical properties.

Keywords: Physical and chemical properties. *Enterococcus faecalis*. Dental materials. Tea tree oil.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 PROPOSIÇÃO.....	17
3 PUBLICAÇÃO 1.....	18
4 PUBLICAÇÃO 2.....	33
5 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento endodôntico depende dos procedimentos mecânicos, físicos e químicos que promovem a desinfecção do canal radicular (Bystrom, Sundqvist^{6, 7}, 1981, 1983; Bystrom et al.⁸, 1985). Os casos de insucesso do tratamento endodôntico estão vinculados geralmente à persistência de micro-organismos remanescentes ao longo do sistema de canais radiculares e na região perirradicular (Rocas et al.³⁸, 2004; Siqueira⁴¹, 2001; Sundqvist et al.⁴³, 1998). É comum a presença de *Enterococcus Faecalis* em casos de infecção secundária ou persistente (Molander et al.³¹, 1998; Ricucci et al.³⁷, 2015; Rocas et al.³⁸, 2004; Siqueira⁴¹, 2001; Sundqvist et al.⁴³, 1998). Este micro-organismo apresenta resistência ao ambiente altamente alcalino promovido pelo hidróxido de cálcio (Evans et al.¹⁴, 2002) e capacidade de invadir túbulos dentinários mesmo em condições adversas (Love²⁹, 2001).

A cirurgia parendodôntica, com apicectomia e retro-obturação (Ricucci et al.³⁷, 2015) pode ser indicada em casos de insucesso do tratamento convencional. Nestes casos, a escolha do material retrobturador tem importância fundamental, sendo atualmente indicados materiais com características bioativas, conhecidos como materiais reparadores. O material reparador ideal deve promover regeneração dos tecidos perirradiculares, deseja-se que este material apresente biocompatibilidade (Bodrumlu⁴, 2008; Torabinejad, Pitt Ford⁴⁴, 1996), ser um material bioativo, proporcionando reparo por meio de estimulação do processo de mineralização (Holland et al.²², 2002). Também deve apresentar adequadas propriedades físico-químicas como tempo de presa adequado, radiopacidade maior que a dentina, excelente capacidade de selamento marginal e estabilidade dimensional, solubilidade menor ao 3% e não ser reabsorvível, assim como capacidade de alcalinizar o meio. Ainda, é desejável que apresente ação antimicrobiana, por ser usado em lugares com presença bacteriana (ADA/57¹, 2000; Camilleri et al.⁹, 2005; ISO/6876²⁴, 2001; Kakani et al.²⁶, 2015; Shah et al.⁴⁰, 1996; Torabinejad, Pitt Ford⁴⁴, 1996).

Dentre os materiais atualmente indicados destaca-se o Mineral Trióxido Agregado (MTA). Este é considerado um material bioativo a base de silicato de

cálcio, composto por partículas hidrofílicas que na presença de umidade resulta em um gel coloidal que se converte em estrutura sólida (Schwartz et al.³⁹, 1999). O MTA consiste em Cimento Portland (CP) associado ao radiopacificador óxido de bismuto (Bi_2O_3) (Camilleri et al.⁹, 2005).

O MTA apresenta um pH de até 12.5 após presa, similar ao hidróxido de cálcio, além de baixa solubilidade (Torabinejad et al.⁴⁵, 1995) e radiopacidade superior à dentina radicular (Shah et al.⁴⁰, 1996), conforme as recomendações da ISO (ISO/57²⁴, 2001)¹ e da ANSI/ADA (ADA/57¹, 2000). Apesar da ampla indicação, o MTA possui limitada ação antimicrobiana (Estrela et al.¹³, 2000; Holt et al.²¹, 2007; Morgental et al.³², 2011; Torabinejad et al.⁴⁶, 1995), e dificuldade na manipulação (Duarte et al.¹², 2012).

A fim de melhorar as deficiências deste material, muitos autores têm estudado diversas associações. Para melhorar sua consistência de trabalho, tem sido estudada a adição de diversas substâncias (Ber et al.², 2007; Hsieh et al.²³, 2009), dentre elas, o propilenoglicol. Marciano et al.³⁰ (2016), que adicionaram 20% de propilenoglicol ao cimento MTA, o que favoreceu a consistência de manipulação, no entanto alterou as propriedades físico-químicas deste material.

Em busca de aumentar sua ação antimicrobiana, o MTA foi associado à clorexidina, e foi observado que esta associação potencializa as propriedades antibacterianas do MTA contra as bactérias normalmente encontradas na cavidade bucal, incluindo *E. faecalis* (Bidar et al.³, 2012; Holt et al.²¹, 2007; Stowe et al.⁴², 2004). Por outro lado, Odabas et al.³⁵ (2011) associaram o MTA a zeólito de prata a 0,2 e 2%, verificando que estas associações mostraram atividade antimicrobiana contra alguns micro-organismos, tais como *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. gingivalis*, *E. Coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, o que não ocorreu contra *P. intermedia* e *A. israelii*. E.

O aumento da resistência bacteriana a antibióticos tem levado a busca de novos agentes terapêuticos antimicrobianos, tais como os óleos essenciais (OEs) de plantas. Estas substâncias são voláteis e protegem as plantas de doenças e ataque de insetos (Hassan et al.²⁰, 2015; Knezevic et al.²⁷, 2016). Os

OEs são muito estudados na atualidade nas áreas da saúde e particularmente na odontologia por sua eficácia e segurança (Dagli et al.¹¹, 2015).

O OME é um óleo essencial derivado da *Myrtaceae alternifolia*, planta nativa da Austrália. Suas propriedades antibacterianas já foram documentadas, mostrando efetividade contra uma ampla gama de bactérias (Carson et al.¹⁰, 2006; Dagli et al.¹¹, 2015; Wilkinson, Cavanagh⁴⁷, 2005). Nelson³³ (1997) avaliaram cinco óleos essenciais e observaram que o vapor do OME foi o mais potente contra 15 cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e 5 de *Enterococcus* resistentes à vancomicina. Atualmente, resultados *in vitro* demonstram que o OME apresenta também propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias (Halcon, Milkus¹⁹, 2004; Nowak et al.³⁴, 2012).

FAR é um álcool sesquiterpeno comumente encontrado em própolis e óleos essenciais de frutas cítricas (por exemplo, em casca de laranja e óleo de limão-grama). FAR é hidrofóbico e pode atuar nas membranas celulares de bactérias, comprometendo sua integridade e levando a uma consequente liberação do conteúdo intracelular (Gomes et al.^{16, 17}, 2011, 2011; Jabra-Rizk et al.²⁵, 2006).

Segundo Koo et al.²⁸ (2005), esta substância inibe a produção de ácido e de síntese de glucano por *S. mutans* no biofilme. Gomes et al.¹⁶ (2011) concluíram que os biofilmes formados na presença de FAR contêm menos biomassa e exibem mudanças na composição da matriz. Desta forma, dependendo da concentração, FAR pode atuar contra bactérias em biofilmes. Ainda, demonstrou ter ação antibiofilme por prevenir formação de biofilme ou atacar biofilmes estabelecidos. Assim, FAR inibe ou reduz a formação de biofilme de diversas espécies microbianas, incluindo a *C. albicans*, *S. mutans* e *Staphylococcus aureus* (Fernandes et al.¹⁵, 2016; Jabra-Rizk et al.²⁵, 2006; Koo et al.²⁸, 2005; Ramage et al.³⁶, 2002).

Gomes et al.¹⁸ (2009), mostram o efeito significativo do FAR na redução da viabilidade de células planctônicas de quatro cepas de *S. epidermidis* e menos significativo em células do biofilme maduro. Em células planctônicas, pequenas concentrações deste sesquiterpeno (100 µM) são suficientes para

apresentar efeito antibacteriano. Adicionalmente, a inibição da formação de biofilme (importante fator de virulência) induzida pelo FAR, sugerem uma maior utilização desta molécula na prevenção de infecção por *S. epidermidis*. Além disso, FAR apresenta ação antifúngica e as bactérias não adquirem resistência contra esta substância ao longo das gerações bacterianas (Brilhante et al.⁵, 2015; Gomes et al.¹⁶⁻¹⁸, 2009, 2011, 2011).

Deste modo, é oportuno o estudo da associação do MTA a substâncias com capacidade antimicrobiana contra patógenos endodônticos, especialmente *Enterococcus faecalis*, sem prejudicar as propriedades físico-químicas e biológicas do material.

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar as propriedades físico-químicas e antimicrobianas do MTA associado a OME (1 e 2%) ou FAR (1 e 2%).

PUBLICAÇÃO 1

Avaliação de propriedades físico-químicas e antimicrobianas do MTA associado a OME 1 e 2% por meio de:

1. Tempo de presa
2. Solubilidade
3. Radiopacidade
4. pH por meio de tubos de polietileno
5. Alteração volumétrica em micro-ct
6. Atividade antibiofilme: cristal violeta
7. Atividade antibiofilme: Teste de contato direto modificado

PUBLICAÇÃO 2

Avaliação de propriedades físico-químicas e antimicrobianas do MTA associado ao FAR 1 e 2% por meio de:

1. Tempo de presa
2. Solubilidade
3. Radiopacidade
4. pH por meio de tubos de polietileno
5. Alteração volumétrica em micro-ct
6. Atividade antibiofilme: cristal violeta
7. Atividade antibiofilme: Teste de contato direto modificado

3 PUBLICAÇÃO 1

Propriedades físico-químicas e antimicrobianas sobre *Enterococcus faecalis* do Mineral Trióxido Agregado associado a óleo de melaleuca*

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar propriedades físico-químicas e antimicrobianas da associação de Óleo de Melaleuca (OME) ao MTA Branco (Angelus).

MATERIAL E MÉTODOS: MTA Branco e sua associação ao OME a 1% e 2%. Os testes seguiram especificações da ISO e ADA. O tempo de presa inicial (TPI) e final (TPF) foram medidos com agulhas Gilmore. A solubilidade foi calculada pela perda de massa após 7 e 30 dias. A alteração volumétrica em micro-ct foi analisada nos períodos de 7 e 30 dias. A radiopacidade foi verificada com radiografias dos materiais e escala de alumínio. O pH foi mensurado com pHmetro digital. A atividade antibiofilme foi analisada pela redução de biomassa de biofilme de *Enterococcus faecalis* após contato com o material, pelo Ensaio de Cristal Violeta (CV). O ensaio de Contato Direto Modificado (DCTM) foi avaliado após plaqueamento e contagem de Unidades Formadoras de Colônia por ml (UFCmL⁻¹). Os resultados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey, com 5% de significância.

RESULTADOS: Radiopacidade e solubilidade foram semelhantes para os 3 materiais ($p>0.05$). TPI e TPF foi menor para MTA e maior para MTA/OME 2% ($p>0.05$). A análise com micro-CT após 7 dias não mostrou diferença significativa ($p<0.05$) e aos 30 dias MTA/OME 2% apresentou maior volume ($p>0.05$). Os materiais foram semelhantes em relação ao pH ($p<0.05$). MTA/OME 2% proporcionou maior redução de biomassa de biofilme que os demais materiais ($p>0.05$), tanto no ensaio CV quanto no DCTM.

CONCLUSÃO: A adição de Óleo de Melaleuca ao MTA aumentou o tempo de presa, e manteve outras propriedades físico-químicas do MTA. A adição de 2% de Óleo de Melaleuca aumentou a propriedade antibiofilme do MTA.

Palavras-chave: MTA, óleo de melaleuca, endodontia, *Enterococcus faecalis*

* Redigido de acordo com as normas do International Endodontic Journal

INTRODUÇÃO

Mineral Trióxido Agregado (MTA) é um biomaterial reparador com propriedades físico-químicas e biológicas adequadas, e radiopacidade maior que a dentina (Camilleri 2008; Camilleri & Gandolfi 2010). Ainda, apresenta solubilidade inferior a 3% (ANSI/ADA 2000), pH alcalino, estabilidade dimensional e promove regeneração dos tecidos perirradiculares (Parirokh & Torabinejad 2010). No entanto, apresenta algumas desvantagens como dificuldade de manipulação, e limitada ação antimicrobiana (Kim *et al.* 2015).

Muitas associações têm sido estudadas para melhora da propriedade antimicrobiana do MTA. As associações do MTA à clorexidina (Bidar *et al.* 2012) e ao zeólito de prata (Odabas *et al.* 2011) favorecem a atividade antimicrobiana do MTA contra micro-organismos presentes nas infecções endodônticas.

O aumento da resistência bacteriana para antibióticos tem levado a pesquisa de novos agentes terapêuticos antimicrobianos, como os Óleos Essenciais, que são naturais e voláteis e protegem as plantas de doenças e do ataque de insetos. *Melaleuca alternifolia* é uma planta medicinal de onde é extraído o Óleo de Melaleuca (OME), que apresenta propriedades antibacterianas, contra uma ampla gama de bactérias gram positivo e gram negativo (Carson *et al.* 2006), reduzindo efetivamente o crescimento bacteriano, mesmo em baixos níveis (Mantil *et al.* 2015). Além da sua ação sobre bactérias, o OME é um potente antifúngico e possui baixa citotoxicidade em baixas concentrações (Homeyer *et al.* 2015). Este óleo é potente contra 15 cepas de *MRSA* e 5 de enterococos resistentes à vancomicina (Nelson 2000) e apresenta propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias (Halcon & Milkus 2004). Comparado com Fluconazol, um potente antifúngico, OME mostrou ser mais efetivo contra *C. albicans*, e ter ação por até 14 dias (Dalwai *et al.* 2014).

O processo mecânico e químico da desinfecção do canal radicular pode não ser eficaz na eliminação de agentes patogênicos. É comum a presença de *E. faecalis* em canais radiculares previamente tratados com patologia periapical persistente, esta bactéria possui resistência ao ambiente altamente alcalino produzido pelo hidróxido de cálcio e pode invadir túbulos dentinários formando biofilme (Ricucci *et al.* 2015).

Este estudo avaliou as propriedades físico-químico, biológicas e antibiofilme da adição de OME em duas concentrações 1 e 2% ao MTA, com intuito de melhorar a propriedade antimicrobiana, sem alterar as demais propriedades.

MATERIAIS E MÉTODO

MTA branco (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) foi manipulado com água destilada, além da sua associação ao Óleo de Melaleuca (OME) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em duas concentrações, conforme **Tabela 1**.

Tabela 1: materiais experimentais e proporções utilizadas.

Material	MTA	Água destilada	OME
MTA	1 g	300 µl	
MTA/OME 1%	1 g	285 µl	15 µl
MTA/OME 2%	1 g	270 µl	30 µl

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

TEMPO DE PRESA

Para determinar o tempo de presa (n=5) foram utilizados anéis metálicos com 10 mm de diâmetro interno e 1 mm de altura. As medições foram feitas a cada 3 minutos durante a primeira meia hora, 5 minutos até as 2 primeiras horas e depois, a cada 15 minutos (ISO:6876 2002; ASTM:C266 2008). Ao atingir a presa inicial as medições continuaram sendo realizadas até a 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. Os materiais foram mantidos na estufa durante a análise e a agulha foi limpa entre os ensaios. Para determinar a presa final, foi repetido o mesmo procedimento usando a agulha de Gilmore de $456 \pm 0,5$ g de massa e $1 \pm 0,1$ mm de diâmetro na ponta.

SOLUBILIDADE

Para o teste de solubilidade foram confeccionados corpos-de-prova com 7,75 mm de diâmetro e 1,5 mm de altura (n=5) (Carvalho-Junior *et al.* 2007). Cada molde foi preenchido e um fio de nylon impermeável colocado no interior do material; foram armazenados em estufa com temperatura de 37°C e 100% de umidade 3 vezes o tempo de presa. Os corpos-de-prova foram removidos dos moldes, colocados em dessecador a vácuo, e a massa foi mensurada em balança de precisão até obter estabilidade da massa inicial (aproximadamente 7 dias), quando foram suspensos no interior de recipientes

plásticos com tampa contendo 7,5 ml de água destilada e deionizada com a fixação dos fios de nylon, sem contato entre o material e a superfície interna do recipiente. Os recipientes permaneceram em estufa a 37°C durante 7 e 30 dias, após cada período, os corpos-de-prova foram removidos da água, lavados com água destilada, secos com papel absorvente e colocados novamente em desumidificador até obter estabilidade da massa final (aproximadamente 7 dias). A perda de massa foi expressa em porcentagem da massa original.

ALTERAÇÃO VOLUMÉTRICA EM MICRO-CT

Foi realizada a análise da alteração volumétrica dos cimentos utilizando o micro-tomógrafo SkyScan 1176 (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica). Para a realização deste teste, modelos transparentes à base de resina epoxi foram confeccionados usando peças metálicas para obter blocos de resina com cavidades de 3 mm de profundidade e 1 mm de diâmetro, simulando retrocavidades. As cavidades foram preenchidas, por um único operador treinado, com cada um dos materiais logo após sua manipulação, empregando condensador para retro-obturação. As amostras foram deixadas por três vezes o tempo de presa de cada material em estufa a 37°C e em umidade relativa. Os escaneamentos foram realizados logo após o preenchimento das cavidades e nos períodos de 7 e 30 dias, sendo mantidos imersos em água destilada entre esses períodos experimentais. Foram utilizados parâmetros para o escaneamento (Cavenago *et al.* 2014) modificados por estudo piloto. O volume de preenchimento pelo material retrobturador foi calculado em cada período.

A reconstrução das imagens foi realizada usando o programa NRecon (V1.6.4,7; SkyScan, Bélgica). Após a etapa de reconstrução das imagens, as amostras foram corregistradas em dois conjuntos de imagens (um usado como referência e outro como target), utilizando o software Data Viewer (V1.5.1.2; Sky Scan, Bélgica). Este corregistro permitiu um alinhamento geométrico dos datasets utilizados. Para esta análise, foram padronizados limites de “top” (estabelecido como o último corte onde se observou a presença do material) e “bottom” (estabelecido como o primeiro corte apical onde foi possível visualizar o material), sendo os mesmos valores encontrados para esses limites utilizados nas análises das amostras inicial e pós período de avaliação. A partir destes limites, foi criada uma região de interesse (ROI) em todas as secções, selecionando o material. A integração das regiões de interesse em todos os cortes selecionados definiu um volume de interesse (VOI), salvo como um novo dataset. Foi então realizado o

processo de binarização ou segmentação, sendo este determinado a partir de um intervalo de cinza, definido através de um histograma. A ferramenta “custom processing” foi então utilizada, executando um processamento personalizado das imagens através de um “task list” (lista de tarefas com funções diversas e operações matemáticas). O resultado final foi a análise volumétrica e o modelo 3D dos materiais nas cavidades.

RADIOPACIDADE

A análise de radiopacidade foi realizando segundo as especificações da ISO utilizando moldes com dimensões de 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura, sendo confeccionados 6 espécimes para cada material (ISO:6876 2002). Após a manipulação, os materiais foram colocados nos moldes, que permaneceram a 37°C e 100% de umidade, por 48 h. Depois desse período, um corpo-de-prova de cada material e uma escala de alumínio, com variações de espessura de 2 a 16 mm. Os corpos-de-prova foram radiografados sobre um filme oclusal (Insight – Kodak Comp, Rochester, NY) com o aparelho de raios-X GE1000 (General Electric, Milwaukee, WI) operado a 60 kV, 7 mA, 18 pulsos/s e 30 cm de distância focal. Os filmes foram processados com solução nova em reveladora automática, digitalizados e avaliados usando o programa ImageJ, onde foram selecionadas áreas de cada degrau da escala de Al e dos cimentos para determinar a equivalência da radiopacidade dos cimentos em mm de Al (Vivan *et al.* 2009), usando a seguinte equação:

$$\frac{A \times 2}{B} + \text{mm de Al imediatamente anterior DRM}$$

Onde

DRM = Densidade Radiográfica do Material

A = DRM – DR do incremento de Al imediatamente anterior a DRM;

B = DR do incremento de Al imediatamente posterior a DRM - DR do incremento de alumínio imediatamente anterior a DRM;

2 = 2 mm de incremento da escala de Al

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). Cada tubo foi imerso em frascos com 10 ml de água deionizada, para o grupo controle só foi utilizada água

deionizada, cujo pH foi aferido previamente (Guerreiro-Tanomaru *et al.* 2011); os frascos foram mantidos na estufa a 37°C durante os períodos experimentais. Transcorrido cada período de avaliação, 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias, os tubos de polietileno foram transferidos para novos frascos com o auxílio de uma pinça e a solução resultante de cada um dos frascos utilizados foi utilizada para realizar a aferição do pH, realizada com pHmetro digital Digimed DM-21 (Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil) à temperatura ambiente, 25°C. Previamente à aferição do pH, o dispositivo foi calibrado com soluções-tampão de pH 4, 7 e 10 e estas foram utilizadas para calibragem do pHmetro durante todo o período experimental. Após as mensurações em triplicata, os dados foram tabulados e analisados estatisticamente.

PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda, Campinas, SP, Brasil) sob condições assépticas, utilizando cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). A pureza da cepa foi confirmada por meio de morfologia macroscópica e microscópica (Coloração de Gram).

ATIVIDADE ANTIBIOFILME: ENSAIO CRISTAL VIOLETA (CV)

A biomassa de *E. faecalis* foi visualizada e quantificada com o ensaio de cristal violeta. Foram utilizados moldes de silicone com dimensões de 5 mm de diâmetro e 1 mm de altura, sendo confeccionados 8 corpos-de-prova para cada material. Após a manipulação e preenchimento permaneceram na estufa a 37°C e 100% de umidade, por 48 horas. Depois desse período, estes foram removidos da matriz e submetidos a esterilização por meio de radiação ultravioleta, por 30 minutos cada face do corpo-de-prova.

Para formação da biomassa de biofilme, foram obtidas culturas puras de *E. faecalis* por meio de semeadura por esgotamento em placas de Petri contendo TSA (Tryptic Soy Agar, Difco, Detroit, MI, EUA) 12 h antes do teste. A concentração do inóculo bacteriano foi ajustada por meio de espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil) e ajustou-se uma concentração equivalente a 10^8 UFCmL⁻¹.

O inóculo foi preparado em caldo de soja tripticase (Difco) a partir de cepa na fase de crescimento logarítmica. Após agitação por vórtex, 200 µl de alíquotas da suspensão bacteriana foram distribuídas em cada poço de uma placa de cultura de 96

poços e incubadas durante 48 horas a 37°C. Após este período, o conteúdo de cada poço foi aspirado e os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL de PBS (pH 7,2) para remover as células não aderidas. Os corpos-de-prova foram colocados nos poços junto com 20µl de solução salina para manter a umidade e permaneceram durante 24 h a 37°C em contato com o biofilme. Após esse período os discos dos cimentos foram removidos e cada poço foi lavado 3 vezes com PBS, em seguida, as bactérias aderentes foram coradas durante 20 minutos com 200 µl solução de cristal violeta 0,1% em temperatura ambiente. O excesso de corante foi enxaguado por lavagem com água destilada. As placas foram secas a temperatura ambiente e o corante ligado às células aderentes foi solubilizado com 200 µL ácido acético 33% durante 5 minutos. Para quantificar a biomassa de biofilme remanescente após o tratamento, foi medida a absorbância (570 nm) para a solução de cristal violeta usando espectrofotômetro (Elx800; Instrumentos Bio-Tek, Winooski, VT, USA). Para o controle positivo foi utilizada a solução salina. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata em duas ocasiões distintas.

ATIVIDADE ANTIBIOFILME: CONTATO DIRETO MODIFICADO (DCTM)

Os materiais foram manipulados e inseridos em moldes medindo 7 x 1 mm (diâmetro x espessura interna), mantidos em estufa a 37 +/- 1°C e umidade controlada por 48 horas. Incisivos centrais bovinos com raízes completamente formadas foram usados para obtenção do substrato para o desenvolvimento do biofilme. As raízes foram seccionadas em blocos de dentina com dimensões de 5 mm x 5 mm x 0,7 mm (largura x comprimento x espessura). Todos os cortes foram realizados em disco diamantado em baixa velocidade (Isomet – Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) com irrigação abundante. Os blocos foram colocados em um tubo de ensaio contendo água destilada foram levados à autoclave para esterilização a 121°C por 20 min.

Para a formação do biofilme de *E. faecalis*, o micro-organismo foi reativado em 4,0 mL de caldo BHI estéril (BHI, Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA) e mantido em estufa a 37°C, durante 12 horas. Após este período a densidade óptica do meio foi medida em espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil) e o inóculo foi ajustado na concentração 10⁸ UFCmL⁻¹.

Em uma placa de cultura celular de 24 poços foram dispensados 2,0 mL de meio BHI puro contendo 1% do inóculo, deixando os blocos de dentina totalmente submersos. As placas foram colocadas em uma incubadora de bancada com agitação orbital (modelo

Q816M20, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) em ambiente de microaerofilia a 37°C durante 14 dias.

O meio de cultura BHI de cada espécime foi totalmente trocado a cada 48 horas, sem a adição de novos micro-organismos. Transcorrido o período pós-manipulação, cada disco de cimento foi removido da matriz, esterilizados em luz ultra-violeta, conforme descrito no teste anterior e colocado sobre um dos blocos de dentina contendo o biofilme formado, lavados previamente em solução salina para remoção de bactérias planctônicas. Os conjuntos formados pelos blocos de dentina com os discos de cimentos foram colocados em Placas de Petri. Sobre cada conjunto foi gotejado 20 µL de solução salina estéril para evitar o ressecamento dos mesmos. O tempo de contato foi de 15 h e as placas foram mantidas em estufa a 37°C. Foi incluído um grupo controle onde os biofilmes entraram em contato com um disco de teflon, servindo de comparação para os resultados.

Decorridos o período de contato, os discos de cimentos foram removidos e os blocos de dentina com o biofilme remanescente, inclusive o grupo controle, foram individualmente colocados em tubos de ensaio contendo 1 mL de solução salina estéril e pérolas de vidro. Os tubos foram agitados em vortéx (modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) por 1 min para suspensão dos micro-organismos. Em seguida, foi realizada a diluição decimal seriada da suspensão de *E. faecalis* obtida. Ao final das diluições, três alíquotas de 20 µL de cada uma das suspensões foram distribuídas em placas de Petri contendo o meio de cultura Tryptic Soy Ágar (Difco Laboratories-Becton Dickinson and Company - USA). As placas foram incubadas a 37°C por 48 h.

A leitura dos resultados de cada placa de cultura resultou da média do número de UFCmL⁻¹ das três áreas de crescimento bacteriano, na diluição onde apresentou em cada área um número de colônias entre 5 e 50. A partir destas médias foi calculado o número de UFCmL⁻¹ após o período de contato entre os discos de cimentos obturadores e o biofilme desenvolvido nos blocos de dentina. Os dados foram submetidos à transformação logarítmica e o resultado de cada grupo foi calculado a partir da média dos seus quatro espécimes.

Para todos os testes, os resultados obtidos foram submetidos a um teste de normalidade, e posteriormente submetidos ao teste estatístico paramétrico ANOVA e ao teste de comparações múltiplas de Tukey, com 5% de significância.

RESULTADOS

PROPRIEDADES FÍSICAS

Os resultados demonstraram que a adição de OME aumentou o tempo de presa do MTA; sendo proporcional a quantidade do óleo. Na solubilidade, aos 7 dias, os três grupos perderam menos de 3% da massa, não mostrando diferença significativa entre eles, no entanto aos 30 dias, MTA perdeu massa e MTA/OME 1% e MTA/OME 2% ganharam massa, os três grupos foram diferentes estatisticamente entre si. Pelo análise no Micro-CT, foi possível observar que aos 7 dias os três grupos não mostraram diferença significativa, no entanto, os grupos MTA e MTA/OME 1% diminuíram de volume e grupo MTA/OME 2% aumento de volume, aos 30 dias os grupos MTA e MTA/OME 1% mostraram-se semelhantes, no entanto MTA/OME 2% ganhou volume, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$). No teste de radiopacidade os três grupos tiveram valores acima de 5 mm de Al, não sendo diferentes estatisticamente entre eles (tabela 2).

Tabela 2: Média e (desvio padrão) do tempo de presa, solubilidade, alteração volumétrica e radiopacidade do MTA e suas associações com OME

TESTE		MTA	MTA/OME 1%	MTA/OME 2%
TEMPO DE PRESA (minutos)	<i>Inicial</i>	16,00 ($\pm 1,265$) ^a	23,50 ($\pm 2,258$) ^b	28,50 ($\pm 4,550$) ^c
	<i>Final</i>	287,8 ($\pm 43,73$) ^a	330 ($\pm 13,20$) ^b	366,7 ($\pm 13,66$) ^b
SOLUBILIDADE (% de massa perdida)	<i>7 d</i>	1,466 ($\pm 0,309$) ^a	2,032 ($\pm 0,663$) ^a	2,054 ($\pm 0,221$) ^a
	<i>30 d</i>	-4,466 ($\pm 1,273$) ^a	0,706 ($\pm 0,236$) ^b	3,540 ($\pm 0,764$) ^c
ALTERAÇÃO VOL. MICRO-CT (% volume perdido)	<i>7 d</i>	-0,489 ($\pm 1,026$) ^a	-0,342 ($\pm 1,451$) ^a	0,960 ($\pm 0,580$) ^a
	<i>30 d</i>	-0,218 ($\pm 1,568$) ^a	0,838 ($\pm 1,111$) ^a	3,690 ($\pm 2,672$) ^b
RADIPACIDADE (mm de Al)		5,092 ($\pm 0,167$) ^a	5,164 ($\pm 0,239$) ^a	5,078 ($\pm 0,383$) ^a

MTA: Mineral Trióxido Agregado; OME: Óleo de Melaleuca. * Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

pH

Durante todos os períodos experimentais o grupo controle apresentou menores valores de pH. No período de 3 dias, a maior alcalinização do meio foi atingida pelo MTA/OME 2%, o MTA/OME 1% não apresentando diferença estatística significativa em

relação ao MTA/OME 2% nem com MTA. Nos períodos 1, 7, 14, 21 e 28 dias, os 3 grupos foram igualmente capazes de alcalinizar o meio, não havendo diferença estatística entre eles ($p > 0,05$); no entanto apresentado diferença estatística com o Controle (tabela 3).

Tabela 3: Média e (desvio padrão) do pH do MTA e suas associações com OME nos diferentes períodos experimentais

PERÍODO	CIMENTOS REPARADORES			CONTROLE
	MTA	MTA/OME 1%	MTA/OME 2%	
1 DIA	7,732 ($\pm 0,122$) ^a	7,786 ($\pm 0,172$) ^a	7,855 ($\pm 0,111$) ^a	7,211 ($\pm 0,242$) ^b
3 DIAS	7,734 ($\pm 0,122$) ^b	7,773 ($\pm 0,134$) ^{a,b}	7,930 ($\pm 0,208$) ^a	7,247 ($\pm 0,165$) ^c
7 DIAS	7,978 ($\pm 0,223$) ^a	8,028 ($\pm 0,284$) ^a	7,984 ($\pm 0,229$) ^a	7,574 ($\pm 0,069$) ^b
14 DIAS	7,897 ($\pm 0,085$) ^a	7,950 ($\pm 0,108$) ^a	7,903 ($\pm 0,098$) ^a	7,396 ($\pm 0,237$) ^b
21 DIAS	8,059 ($\pm 0,168$) ^a	7,981 ($\pm 0,1607$) ^a	7,947 ($\pm 0,143$) ^a	7,619 ($\pm 0,082$) ^b
28 DIAS	7,964 ($\pm 0,177$) ^a	7,845 ($\pm 0,180$) ^a	7,801 ($\pm 0,106$) ^a	7,531 ($\pm 0,061$) ^b

MTA: Mineral Trióxido Agregado; OME: Óleo de Melaleuca; Controle: água destilada. *Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

ATIVIDADE ANTIBIOFILME

O ensaio de cristal violeta, nos forneceu informações sobre a capacidade de redução de biomassa de *E. faecalis* das associações estudadas. Foi Observado que a adição de MTA/OME 2% aumentou significativamente a capacidade de redução de biomassa quando comparado com o MTA e o MTA/OME 1% ($p < 0,05$). No ensaio de contato direto modificado sobre biofilme, MTA/OME 2% mostrou-se significativamente mais efetivo na redução de UFCmL⁻¹ quando comparado ao MTA ($p < 0,05$). O grupo controle apresentou maior quantidade de micro-organismos quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$) em ambos dos testes (tabela 4).

Tabela 4: Média e (desvio padrão) da atividade antibiofilme do MTA e suas associações com OME, teste de CV expresso em absorbância (Asb), e DCTM em UFCmL⁻¹

TESTE	CIMENTOS REPARADORES			
	MTA	MTA/OME 1%	MTA/OME 2%	CONTROLE
CV	0,305 ($\pm$ 0,072) ^b	0,256 ($\pm$ 0,048) ^b	0,182 ($\pm$ 0,020) ^a	0,458 ($\pm$ 0,035) ^c
DCTM	5,835 ($\pm$ 0,219) ^b	5,415 ($\pm$ 0,293) ^{a,b}	5,088 ($\pm$ 0,529) ^a	7,921 ($\pm$ 0,191) ^c

MTA: Mineral Trióxido Agregado; OME: Óleo de Melaleuca; Controle: água destilada; CV: Cristal Violeta; DCTM: Contato Direto Modificado. *Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

MTA é o material reparador endodôntico de escolha devido a suas propriedades físico-químicas e biológicas (Kulan *et al.* 2016; Marciano *et al.* 2016). Entretanto, sua atividade antimicrobiana é limitada (Kim *et al.* 2015). MTA tem sido associado à diferentes substancias com a finalidade de aumentar o seu efeito antimicrobiano (Parirokh & Torabinejad 2010; Samiei *et al.* 2013) e melhorar a consistência de trabalho e manipulação (Kogan *et al.* 2006). A proporção de 3 partes de pó para 1 de água, foi usada no presente estudo, pois favorece as propriedades físico-químicas do MTA branco (Cavenago *et al.* 2014).

Os resultados mostraram que a adição de OME 1 e 2% ao MTA aumentaram os tempos de presa inicial e final quando comparados ao MTA ($p < 0,05$). Foi observada melhora na consistência após manipulação. O tempo de presa e a concentração do óleo utilizado foram diretamente proporcionais. Concordando com estes resultados, a adição de substancias ao MTA (propilenoglicol) promoveu o aumento do tempo de presa do material (Duarte *et al.* 2012).

A solubilidade é avaliada pela diferença de massa, antes e após a imersão em água (Parirokh & Torabinejad 2010). A solubilidade é avaliada no período de 24 horas (ISO:6876 2002). No entanto, períodos maiores de análise são utilizados, variando de 48 horas a 78 dias (Ceci *et al.* 2015; Samiei *et al.* 2015). O período de 7 dias tem sido amplamente utilizado (Dawood *et al.* 2014; Abbaszadegan *et al.* 2015; Tanomaru-Filho *et al.* 2015). A microtomografia computadorizada pode nos oferecer dados mais precisos, e análise de alteração volumétrica por Micro-CT. Aos 7 dias, os resultados da solubilidade e alteração volumétrica foram semelhantes para os materiais ($p > 0,05$), com valores dentro do limite recomendado pela ISO 6876/2002 e concordando com estudos prévios (Dawood *et al.* 2014; Tanomaru-Filho *et al.* 2015). Após 30 dias, o MTA foi o material com maior

solubilidade e diminuição de volume. MTA/OME 1% e MTA/OME 2% aumentaram massa e volume ($p < 0,05$). Neste período, o MTA apresentou solubilidade superior ao limite recomendado de 3% (ANSI/ADA 2000), discordando com os achados de outros autores que observaram que no mesmo período avaliado o MTA solubilizou-se menos que 3% (Singh *et al.* 2015), no entanto neste estudo observamos que sua alteração volumétrica foi menor que 3%. A adição de OME 1 e 2% ao MTA promoveu aumento de massa e volume, sendo que o grupo OME 2% mostrou valores superiores a 3%. A solubilidade observada para MTA pode estar relacionada com a presença do óxido de bismuto como radiopacificador, que tem mostrado aumentar a porosidade do cimento, diminuindo a sua estabilidade mecânica, a presença de óxido de bismuto no cimento faz com que ele mostre, a princípio expansão e depois maior solubilidade (Coomaraswamy *et al.* 2007; Camilleri & Mallia 2011) e alta capacidade de absorção de água dos cimentos a base de MTA ou Cimento Portland (Cutajar *et al.* 2011). Por outro lado, a adição do óleo aumenta proporcionalmente o tempo de presa do material o que pode permitir maior hidratação. Os resultados demonstram que menor solubilidade ocorreu na presença de maior concentração de óleo.

A associação do OME ao MTA não interferiu na radiopacidade. Os resultados obtidos foram similares para todos os grupos ($p > 0,05$). Estes resultados superaram o valor mínimo de 3 mm de Al recomendado (ISO:6876 2002). Outros autores também avaliaram a radiopacidade do MTA em sangue e água destilada e, assim como nosso estudo, encontraram valores superiores a 3 mm de Al (Guerreiro Tanomaru *et al.* 2014; Guimaraes *et al.* 2015).

O teste de pH foi realizado segundo Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2011. Os resultados mostraram que a adição do OME nas concentrações estudadas não alterou a capacidade de alcalinização do MTA ($p > 0,05$). No entanto no período de 3 dias a adição deste óleo aumentou a capacidade de alcalinização, provavelmente pelo aumento no tempo de presa. Todos os materiais apresentaram valores de pH superiores ao controle, em todos os períodos de análise ($p < 0,05$). Cavenago *et al.*, 2014 também observaram valores de pH semelhantes aos do presente estudo.

O ensaio cristal violeta é um dos métodos mais utilizados para avaliação dos efeitos antimicrobianos de diversas substâncias na biomassa de biofilme (Barros *et al.* 2014a; Barros *et al.* 2014b) sendo reconhecido por sua reprodutibilidade. No presente estudo, a atividade antibiofilme foi avaliada por meio do contato de corpos-de-prova dos

cimentos após 48 horas de presa, sobre a biofilme de *Enterococcus faecalis*. Esse micro-organismo é frequentemente usado para avaliação do potencial antimicrobiano de materiais endodônticos (Odabas *et al.* 2011; Bidar *et al.* 2012; DaSilva *et al.* 2013; Kim *et al.* 2015) e é frequentemente isolado nos casos de insucesso do tratamento endodôntico (Ricucci *et al.* 2015; Yang *et al.* 2016). Todos os materiais apresentaram capacidade em reduzir biomassa de *E. faecalis*, entretanto, maior redução foi observada para MTA/OME 2% quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$).

A atividade antimicrobiana foi avaliada adicionalmente com o ensaio de Contato direto modificado, com resultados concordantes ao ensaio de Cristal violeta, uma vez que MTA/OME 2% foi o mais efetivo na redução de biomassa e de UFCmL⁻¹, o que pode ser justificado pelo aumento no tempo de presa e no pH no período de 3 dias. Holt *et al.*, 2007 incorporaram clorexidina 2% ao MTA e observaram maior efetividade sobre *E. faecalis*. Além disso, Barros *et al.*, 2014, empregando o ensaio cristal violeta, demonstraram que cimento endodôntico (AH Plus) associado a nanopartículas quartenárias de amônia a 2% reduziu significativamente a biomassa de biofilme formada por duas cepas diferentes de *E. faecalis*. Os resultados do presente estudo evidenciam que a adição de substâncias favorecem a efetividade antimicrobiana de biomateriais sem interferir significativamente nas propriedades físico-químicas.

CONCLUSÃO

A incorporação de óleo de Melaleuca 2% ao MTA aumenta a atividade antimicrobiana sobre biofilmes de *Enterococcus faecalis*. A adição de OME 1 e 2% ao MTA aumentou o tempo de presa e alterou a solubilidade aos 30 dias, no entanto, não alterou as demais propriedades físico-químicas avaliadas. As associações do MTA ao óleo de Melaleuca apresentam potencial para utilização na clínica.

REFERÊNCIAS

- Abbaszadegan A, Sedigh Shams M, Jamshidi Y, Parashos P, Bagheri R (2015) Effect of calcium chloride on physical properties of calcium-enriched mixture cement. *Aust Endod J* **41**(3), 117-21.
- ANSI/ADA (2000) Specification No. 57 Endodontic Sealing Material. *ANSI/ADA Chicago*.
- ASTM:C266 (2008) Standard Test Method for Time and Setting of Hydraulic-Cement Paste by Gillmore Needles. *American Society for Testing and Materials STM International, West Conshohocken*, ASTM C266-08.
- Barros J, Silva MG, Rocas IN *et al.* (2014a) Antibiofilm effects of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *J Endod* **40**(8), 1167-71.
- Barros J, Silva MG, Rodrigues MA *et al.* (2014b) Antibacterial, physicochemical and mechanical properties of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *Int Endod J* **47**(8), 725-34.
- Bidar M, Naderinasab M, Talati A *et al.* (2012) The effects of different concentrations of chlorhexidine gluconate on the antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate and calcium enrich mixture. *Dent Res J (Isfahan)* **9**(4), 466-71.
- Camilleri J (2008) The biocompatibility of modified experimental Portland cements with potential for use in dentistry. *Int Endod J* **41**(12), 1107-14.
- Camilleri J, Gandolfi MG (2010) Evaluation of the radiopacity of calcium silicate cements containing different radiopacifiers. *Int Endod J* **43**(1), 21-30.
- Camilleri J, Mallia B (2011) Evaluation of the dimensional changes of mineral trioxide aggregate sealer. *Int Endod J* **44**(5), 416-24.
- Carson CF, Hammer KA, Riley TV (2006) Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev* **19**(1), 50-62.
- 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 samples. *J Endod* **33**(9), 1110-6.
- Cavenago BC, Pereira TC, Duarte MA *et al.* (2014) Influence of powder-to-water ratio on radiopacity, setting time, pH, calcium ion release and a micro-CT volumetric solubility of white mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* **47**(2), 120-6.
- Ceci M, Beltrami R, Chiesa M, Colombo M, Poggio C (2015) Biological and chemical-physical properties of root-end filling materials: A comparative study. *J Conserv Dent* **18**(2), 94-9.
- Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP (2007) Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod* **33**(3), 295-8.
- Cutajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J (2011) Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dent Mater* **27**(9), 879-91.
- Dalwai S, Rodrigues SJ, Baliga S *et al.* (2014) Comparative evaluation of antifungal action of tea tree oil, chlorhexidine gluconate and fluconazole on heat polymerized acrylic denture base resin - an in vitro study. *Gerodontology*.
- DaSilva L, Finer Y, Friedman S, Basrani B, Kishen A (2013) Biofilm formation within the interface of bovine root dentin treated with conjugated chitosan and sealer containing chitosan nanoparticles. *J Endod* **39**(2), 249-53.
- Dawood AE, Manton DJ, Parashos P *et al.* (2014) The physical properties and ion release of CPP-ACP-modified calcium silicate-based cements. *Aust Dent J*.
- Duarte MA, Alves de Aguiar K, Zeferino MA *et al.* (2012) Evaluation of the propylene glycol association on some physical and chemical properties of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* **45**(6), 565-70.
- Guerreiro-Tanomaru JM, Morgental RD, Flumignan DL, Gasparini F, Oliveira JE, Tanomaru-Filho M (2011) Evaluation of pH, available chlorine content, and antibacterial activity

- of endodontic irrigants and their combinations against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **112**(1), 132-5.
- Guerreiro Tanomaru JM, Storto I, Da Silva GF *et al.* (2014) Radiopacity, pH and antimicrobial activity of Portland cement associated with micro- and nanoparticles of zirconium oxide and niobium oxide. *Dent Mater J* **33**(4), 466-70.
- Guimaraes BM, Tartari T, Marciano MA *et al.* (2015) Color stability, radiopacity, and chemical characteristics of white mineral trioxide aggregate associated with 2 different vehicles in contact with blood. *J Endod* **41**(6), 947-52.
- Halcon L, Milkus K (2004) *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. *Am J Infect Control* **32**(7), 402-8.
- Homeyer DC, Sanchez CJ, Mende K *et al.* (2015) In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on filamentous fungi and toxicity to human cells. *Med Mycol* **53**(3), 285-94.
- ISO:6876 (2002) Root Canal Sealing Materials. *International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland*, ISO 6876.
- Kim RJ, Kim MO, Lee KS, Lee DY, Shin JH (2015) An in vitro evaluation of the antibacterial properties of three mineral trioxide aggregate (MTA) against five oral bacteria. *Arch Oral Biol* **60**(10), 1497-502.
- Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I (2006) The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod* **32**(6), 569-72.
- Kulan P, Karabiyik O, Kose GT, Kargul B (2016) Biocompatibility of Accelerated Mineral Trioxide Aggregate on Stem Cells Derived from Human Dental Pulp. *J Endod* **42**(2), 276-9.
- Mantil E, Daly G, Avis TJ (2015) Effect of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil as a natural antimicrobial agent in lipophilic formulations. *Can J Microbiol* **61**(1), 82-8.
- Marciano MA, Guimaraes BM, Amoroso-Silva P, Camilleri J, Hungaro Duarte MA (2016) Physical and Chemical Properties and Subcutaneous Implantation of Mineral Trioxide Aggregate Mixed with Propylene Glycol. *J Endod* **42**(3), 474-9.
- Nelson RR (2000) Selection of resistance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **45**(4), 549-50.
- Odabas ME, Cinar C, Akca G, Araz I, Ulusu T, Yucel H (2011) Short-term antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate with incorporated silver-zeolite. *Dent Traumatol* **27**(3), 189-94.
- Parirokh M, Torabinejad M (2010) Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod* **36**(3), 400-13.
- Ricucci D, Siqueira JF, Jr., Lopes WS, Vieira AR, Rocas IN (2015) Extraradicular infection as the cause of persistent symptoms: a case series. *J Endod* **41**(2), 265-73.
- Samiei M, Aghazadeh M, Lotfi M, Shakoei S, Aghazadeh Z, Vahid Pakdel SM (2013) Antimicrobial Efficacy of Mineral Trioxide Aggregate with and without Silver Nanoparticles. *Iran Endod J* **8**(4), 166-70.
- Samiei M, Shahi S, Aslaminabadi N, Valizadeh H, Aghazadeh Z, Pakdel SM (2015) A new simulated plasma for assessing the solubility of mineral trioxide aggregate. *Iran Endod J* **10**(1), 30-4.
- Singh S, Podar R, Dadu S, Kulkarni G, Purba R (2015) Solubility of a new calcium silicate-based root-end filling material. *J Conserv Dent* **18**(2), 149-53.
- Tanomaru-Filho M, Garcia AC, Bosso-Martelo R, Berbert FL, Nunes Reis JM, Guerreiro-Tanomaru JM (2015) Influence of addition of calcium oxide on physicochemical properties of Portland cement with zirconium or niobium oxide. *J Conserv Dent* **18**(2), 105-8.
- Vivan RR, Ordinola-Zapata R, Bramante CM *et al.* (2009) Evaluation of the radiopacity of some commercial and experimental root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **108**(6), e35-8.
- Yang J, Park OJ, Kim J, Baik JE, Yun CH, Han SH (2016) Lipoteichoic Acid of *Enterococcus faecalis* Inhibits the Differentiation of Macrophages into Osteoclasts. *J Endod*.

4 PUBLICAÇÃO 2

Propriedades físico-químicas e antimicrobianas sobre *Enterococcus faecalis* do Mineral Trióxido Agregado associado a farnesol*

RESUMO

Introdução: O objetivo deste estudo foi avaliar propriedades físico-químicas e atividade antibiofilme do Mineral Trióxido Agregado (MTA) branco e sua associação ao Farnesol (FAR) nas concentrações de 1 e 2%. **Métodos:** O tempo de presa inicial (TPI) e final (TPF) foi mensurado com agulhas Gilmore. A solubilidade foi calculada pela porcentagem de massa perdida após 7 e 30 dias. A alteração volumétrica foi analisada no micro-CT após 7 e 30 dias. A radiopacidade foi verificada com radiografias dos materiais e escala de alumínio. O pH foi mensurado com pHmetro digital, nos períodos de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. A atividade antibiofilme foi analisada pela biomassa de biofilme residual após contato com o material. O ensaio Crystal Violeta (CV) foi realizado em leitor de microplacas a 570 nm. Para o teste de Contato Direto Modificado (DCTM) foi realizado plaqueamento e contagem de Unidades Formadoras de Colônia por ml (UFC/mL⁻¹). Os resultados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey, com 5% de significância. **Resultados:** TPI e TPF foram menores para MTA ($p < 0,05$). Radiopacidade e solubilidade foram semelhantes entre os materiais ($p > 0,05$). Nos períodos de 1 e 3 dias, MTA com FAR 1 e 2 % apresentaram maior pH, que foi semelhante para os materiais nos demais períodos. MTA associado ao Far 1 e 2% promoveram maior redução de biomassa de biofilme ($p < 0,05$). **Conclusão:** A adição de Farnesol 1 e 2% favorece a atividade antibiofilme do MTA, e mesmo aumentando tempo de presa, proporciona propriedades físico-químicas adequadas.

Palavras-chave: MTA, farnesol, endodontia, *Enterococcus faecalis*

* Redigido de acordo com as normas do *Journal of Endodontics*

INTRODUÇÃO

O insucesso do tratamento endodôntico está relacionado à persistência de micro-organismos remanescentes no sistema de canais radiculares e na região perirradicular (1, 2). O material reparador ideal deve promover regeneração dos tecidos perirradiculares e apresentar adequadas propriedades físicas, químicas e biológicas, sendo desejável a ação antimicrobiana (3). Dentre os materiais atualmente indicados destaca-se o Mineral Trióxido Agregado (MTA). MTA é considerado um material bioativo a base de silicato de cálcio, e consiste de Cimento Portland (CP) associado ao radiopacificador óxido de bismuto (Bi_2O_3) (3, 4).

Algumas associações são propostas para melhora da capacidade antimicrobiana do MTA (5). Quando associado à clorexidina, e a nanopartículas de prata ocorreu aumento da efetividade antimicrobiana quando comparados ao MTA contra micro-organismos presentes nas infecções endodônticas (6, 7).

O aumento da resistência bacteriana aos antibióticos tem motivado o estudo de novos agentes terapêuticos antimicrobianos, como os Óleos Essenciais, que são materiais aromáticos e voláteis naturais que protegem as plantas de doenças e do ataque de insetos. Óleos Essenciais são usados desde o início da civilização humana para fins terapêuticos e medicinais (8).

Farnesol (FAR) é um álcool sesquiterpeno encontrado em própolis e óleos essenciais de frutas cítricas. FAR é hidrofóbico e atua nas membranas celulares de bactérias, comprometendo sua integridade e levando à liberação do conteúdo intracelular (9). FAR é considerado um potente antibacteriano com potente ação antibiofilme (10), além de apresentar prometedora ação antifúngica (11). Os biofilmes formados na presença de FAR contêm menos biomassa, e marcadas mudanças na composição da matriz; além de afetar a estrutura do biofilme, reduz a biomassa, matando bactérias em biofilmes, e ao longo de gerações celulares não há diminuição na susceptibilidade (9).

O sucesso dos tratamentos endodônticos está baseado no processo mecânico e químico da desinfecção do canal radicular que não é eficaz na eliminação de agentes patogênicos. É comum a presença de *E. faecalis* em canais radiculares previamente tratados com patologia periapical persistente (1).

Este estudo visa avaliar a adição de farnesol ao MTA, com relação às propriedades antimicrobianas e propriedades físico-químicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados MTA branco (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) manipulado com água destilada e associações ao Farnesol (FAR) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Matreiais experimentais e proporções utilizadas.

	MTA	Agua destilada	FAR
MTA	1 g	300 µl	
MTA/FAR 1%	1 g	285 µl	15 µl
MTA/FAR 2%	1 g	270 µl	30 µl
Controle	Grupo Controle (necessário em alguns testes)		

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

TEMPO DE PRESA

Para determinar o tempo de presa (n=5) foram utilizados anéis metálicos com 10 mm de diâmetro interno e 1 mm de altura. A avaliação seguiu as especificações da ISO 6876/2001 e ASTM:C266-08 (12, 13), as medições foram feitas a cada 3 minutos durante a primeira meia hora, 5 minutos até as 2 primeiras horas e a cada 15 minutos desse período em diante. Ao atingir a presa inicial as medições continuaram sendo realizadas até a 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. Os materiais foram mantidos na estufa durante a análise e a agulha foi limpa entre os ensaios. Para determinar a presa final, foi repetido o mesmo procedimento usando a agulha de Gilmore de $456 \pm 0,5$ g de massa e $1 \pm 0,1$ mm de diâmetro na ponta.

SOLUBILIDADE

O teste de solubilidade foi realizado segundo Carvalho-Junior *et al.* (2007) (14). Foram confeccionados corpos-de-prova com 7,75 mm de diâmetro e 1,5 mm de altura (n=5). Cada molde foi preenchido e um fio de nylon impermeável colocado no interior do material; foram armazenados em estufa com temperatura de 37°C e 100% de umidade 3 vezes o tempo de presa. Os corpos-de-prova foram removidos dos moldes, colocados em dessecador a vácuo, e a massa foi mensurada em balança de precisão até obter estabilidade da massa inicial (aproximadamente 7 dias), quando foram suspensos no interior de recipientes plásticos com tampa contendo 7,5 ml de água destilada e deionizada com a fixação dos fios de nylon, sem contato entre o material e a superfície interna do recipiente. Os recipientes permaneceram em estufa a 37°C durante 7 e 30 dias, após cada período, os corpos-de-prova foram removidos da água, lavados com água destilada, secos com papel absorvente e colocados novamente em desumidificador até obter estabilidade da massa final (aproximadamente 7 dias). A perda de massa foi expressa em porcentagem da massa original.

ALTERAÇÃO VOLUMÉTRICA EM MICRO-CT

Foi realizada a análise da alteração volumétrica dos cimentos utilizando o micro-tomógrafo SkyScan 1176 (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica). Para a realização deste teste, modelos transparentes à base de resina epoxi foram confeccionados usando peças metálicas para obter blocos de resina com cavidades de 3 mm de profundidade e 1 mm de diâmetro, simulando retrocavidades. As cavidades foram preenchidas, por um único operador treinado, com cada um dos materiais logo após sua manipulação, empregando condensador para retro-obturação. As amostras foram deixadas por três vezes o tempo de presa de cada material em estufa a 37°C e em umidade relativa. Os escaneamentos foram realizados logo após o preenchimento das cavidades e nos períodos de 7 e 30 dias, sendo mantidos imersos em água destilada entre esses períodos experimentais. Os parâmetros para o escaneamento foram baseados no estudo de Cavenago *et al.* (2014) (15) modificados por estudo

piloto. O volume de preenchimento pelo material retrobturador foi calculado em cada período.

A reconstrução das imagens foi realizada usando o programa NRecon (V1.6.4,7; SkyScan, Bélgica). Após a etapa de reconstrução das imagens, as amostras foram corregistradas em dois conjuntos de imagens (um usado como referência e outro como target), utilizando o software Data Viewer (V1.5.1.2; Sky Scan, Bélgica). Este corregistro permitiu um alinhamento geométrico dos datasets utilizados. Para esta análise, foram padronizados limites de “top” (estabelecido como o último corte onde se observou a presença do material) e “bottom” (estabelecido como o primeiro corte apical onde foi possível visualizar o material), sendo os mesmos valores encontrados para esses limites utilizados nas análises das amostras inicial e pós período de avaliação. A partir destes limites, foi criada uma região de interesse (ROI) em todas as secções, selecionando o material. A integração das regiões de interesse em todos os cortes selecionados definiu um volume de interesse (VOI), salvo como um novo dataset. Foi então realizado o processo de binarização ou segmentação, sendo este determinado a partir de um intervalo de cinza, definido através de um histograma. A ferramenta “custom processing” foi então utilizada, executando um processamento personalizado das imagens através de um “task list” (lista de tarefas com funções diversas e operações matemáticas). O resultado final foi a análise volumétrica e o modelo 3D dos materiais nas cavidade.

RADIOPACIDADE

A análise de radiopacidade foi realizando segundo as especificações da ISO 6876/2001 utilizando moldes com dimensões de 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura, sendo confeccionados 6 espécimes para cada material. Após a manipulação, os materiais foram colocados nos moldes, que permaneceram a 37°C e 100% de umidade, por 48 h. Depois desse período, um corpo-de-prova de cada material e uma escala de Al, com variações de espessura de 2 a 16 mm de Al, foram radiografados sobre um filme oclusal (Insight – Kodak Comp, Rochester, NY) com o aparelho de raios-X GE1000 (General Electric, Milwaukee, WI) operado a 60 kV, 7 mA, 18 pulsos/s e 30 cm de distância focal. Os filmes foram processados com solução nova em reveladora automática, digitalizados e

avaliados usando o programa ImageJ, onde foram selecionadas áreas de cada degrau da escala de Al e dos cimentos para determinar a equivalência da radiopacidade dos cimentos em mm de Al, de maneira similar à realizada por Vivan *et al.* (2009) (16), usando a seguinte equação:

$$\frac{A \times 2}{B} + \text{mm de Al imediatamente anterior DRM}$$

Onde

DRM = Densidade Radiográfica do Material

A = DRM – DR do incremento de Al imediatamente anterior a DRM;

B = DR do incremento de Al imediatamente posterior a DRM - DR do incremento de alumínio imediatamente anterior a DRM;

2 = 2 mm de incremento da escala de Al

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). Cada tubo foi imerso em 10 ml de água deionizada cujo pH foi aferido previamente (17) e mantido na estufa a 37°C durante os períodos experimentais. Transcorrido cada período de avaliação, 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias, os tubos de polietileno foram transferidos para novos frascos com o auxílio de uma pinça e a solução resultante de cada um dos frascos utilizados foi utilizada para realizar a aferição do pH, realizada com pHmetro digital Digimed DM-21 (Digicrom Analítica Ltda., São Paulo, Brasil) à temperatura ambiente, 25°C. Previamente à aferição do pH, o dispositivo foi calibrado com soluções-tampão de pH 4, 7 e 10 e estas foram utilizadas para calibragem do pHmetro durante todo o período experimental. Após as mensurações em triplicata, os dados foram tabulados e analisados estatisticamente.

PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda, Campinas, SP, Brasil) sob condições assépticas, utilizando cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). A pureza da cepa foi

confirmada por meio de morfologia macroscópica e microscópica (Coloração de Gram).

ATIVIDADE ANTIBIOFILME: ENSAIO CRISTAL VIOLETA (CV)

A biomassa de *E. faecalis* foi visualizada e quantificada com o ensaio de cristal violeta. Foram utilizados moldes de silicone com dimensões de 5 mm de diâmetro e 1 mm de altura, sendo confeccionados 8 discos para cada material. Após a manipulação e preenchimento permaneceram na estufa a 37°C e 100% de umidade, por 48 horas. Depois desse período, as amostras foram removidas da matriz e submetidas a esterilização por meio de radiação ultravioleta.

Para formação da biomassa de biofilme, foram obtidas culturas puras de *E. faecalis* por meio de semeadura por esgotamento em placas de Petri contendo TSA (Tryptic Soy Agar, Difco, Detroit, MI, EUA) 12 h antes do teste. A concentração do inóculo bacteriano foi ajustada por meio de espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil) e ajustou-se uma concentração equivalente a 10^8 UFC/mL⁻¹.

O inóculo foi preparado em caldo de soja tripticase (Difco) a partir de cepa na fase de crescimento logarítmica. Após agitação por vórtex, 200 µl de alíquotas da suspensão bacteriana foram distribuídas em cada poço de uma placa de cultura de 96 poços e incubadas durante 48 horas a 37°C. Após este período, o conteúdo de cada poço foi aspirado e os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL de PBS (pH 7,2) para remover as células não aderidas. Os discos dos cimentos foram colocados nos poços junto com 20 µl de solução salina para manter a umidade e permaneceram durante 24 h a 37°C em contato com o biofilme. Após esse período os discos dos cimentos foram removidos e cada poço foi lavado 3 vezes com PBS, em seguida, as bactérias aderentes foram coradas durante 20 minutos com 200 µl solução de cristal violeta 0,1% em temperatura ambiente. O excesso de corante foi enxaguado por lavagem com água destilada. As placas foram secas a temperatura ambiente e o corante ligado às células aderentes foi solubilizado com 200 µL ácido acético 33% durante 5 minutos. Para quantificar a biomassa de biofilme remanescente após o tratamento, foi medida a absorbância (570 nm) para a solução de cristal violeta usando espectrofotômetro (Elx800; Instrumentos Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

Para o controle positivo foi utilizada a solução salina. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata em duas ocasiões distintas.

ATIVIDADE ANTIBIOFILME: CONTATO DIRETO MODIFICADO (DCTM)

Os materiais foram manipulados e inseridos em moldes medindo 7 x 1 mm (diâmetro x espessura interna), mantidos em estufa a 37 +/- 1°C e umidade controlada por 48 horas. Incisivos centrais bovinos com raízes completamente formadas foram usados para obtenção do substrato para o desenvolvimento do biofilme. As raízes foram seccionadas em blocos de dentina com dimensões de 5 mm x 5 mm x 0,7 mm (largura x comprimento x espessura). Todos os cortes foram realizados em disco diamantado em baixa velocidade (Isomet – Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) com irrigação abundante. Os blocos foram colocados em um tubo de ensaio contendo água destilada foram levados à autoclave para esterilização a 121°C por 20 min.

Para a formação do biofilme de *E. faecalis*, o micro-organismo foi reativado em 4,0 mL de caldo BHI estéril (BHI, Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA) e mantido em estufa a 37°C, durante 6 horas. Após este período a densidade óptica do meio foi medida em espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, uma alíquota equivalente a 1% do volume foi utilizada para contaminação dos espécimes sendo adicionado ao meio de cultura estéril e homogeneizado.

Em uma placa de cultura celular de 24 poços foram dispensados 2,0 mL de meio BHI puro contendo 1% da suspensão bacteriana, deixando os blocos de dentina totalmente submersos. As placas foram colocadas em uma incubadora de bancada com agitação orbital (modelo Q816M20, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) em ambiente de microaerofilia a 37°C durante 14 dias.

O meio de cultura BHI de cada espécime foi totalmente trocado a cada 48 horas, sem a adição de novos micro-organismos. Transcorrido o período pós-manipulação, cada disco de cimento foi removido da matriz, esterilizados em luz ultra-violeta e colocado sobre um dos blocos de dentina contendo o biofilme formado, lavados previamente em solução salina para remoção de bactérias planctônicas. Os conjuntos formados pelos blocos de dentina com os discos de

cimentos foram colocados em Placas de Petri. Sobre cada conjunto foi gotejado 20 µL de solução salina estéril para evitar o ressecamento dos mesmos. O tempo de contato foi de 15 h e as placas foram mantidas em estufa a 37°C. Foi incluído um grupo controle onde os biofilmes entraram em contato com um disco de teflon, servindo de comparação para os resultados.

Decorridos o período de contato, os discos de cimentos foram removidos e os blocos de dentina com o biofilme remanescente, inclusive o grupo controle, foram individualmente colocados em tubos de ensaio contendo 1 mL de solução salina estéril e pérolas de vidro. Os tubos foram agitados em vortéx (modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) por 1 min para suspensão dos micro-organismos. Em seguida, foi realizada a diluição decimal seriada da suspensão de *E. faecalis* obtida. Ao final das diluições, três alíquotas de 20 µL de cada uma das suspensões foram distribuídas em placas de Petri contendo o meio de cultura Tryptic Soy Ágar (Difco Laboratories-Becton Dickinson and Company - USA). As placas foram incubadas a 37°C por 48 h.

A leitura dos resultados de cada placa de cultura resultou da média do número de UFC/mL⁻¹ das três áreas de crescimento bacteriano, na diluição onde apresentou em cada área um número de colônias entre 5 e 50. A partir destas médias foi calculado o número de UFC/mL⁻¹ após o período de contato entre os discos de cimentos obturadores e o biofilme desenvolvido nos blocos de dentina. Os dados foram submetidos à transformação logarítmica e o resultado de cada grupo foi calculado a partir da média dos seus quatro espécimes.

Para todos os testes, os resultados obtidos foram submetidos a um teste de normalidade, e posteriormente submetidos ao teste estatístico paramétrico ANOVA e ao teste de comparações múltiplas de Tukey, com 5% de significância.

RESULTADOS

PROPRIEDADES FÍSICA-QUÍMICAS

A adição de FAR 1 e 2% aumentou significativamente o tempo de presa do MTA. Aos 7 dias, os três materiais perderam menos de 3% da massa, não mostrando diferença significativa. No período de 30 dias, o MTA perdeu mais de 3% de massa, sendo estatisticamente diferente a MTA/FAR 1% e a MTA/FAR 2% que apresentou aumento de massa. Quando avaliada a Alteração Volumétrica pelo micro-CT, tanto aos 7 quanto aos 30 dias MTA diminuiu de volume, no entanto MTA/FAR 1% e MTA/FAR 2% aumentaram de volume; a alteração foi menor que 3%. No teste de Radiopacidade os três materiais mostraram valores acima de 5 mm de Al, não sendo diferentes entre eles (Tabela 2).

Tabela 2: Média e (desvio padrão) do tempo de presa, solubilidade, alteração volumétrica e radiopacidade do MTA e suas associações com FAR

		MTA	MTA/FAR 1%	MTA/FAR 2%
TEMPO DE PRESA (minutos)	<i>Inicial</i>	16,17 ($\pm$ 1,169) ^a	25,67 ($\pm$ 2,422) ^b	26,33 ($\pm$ 2,944) ^b
	<i>Final</i>	276,2 ($\pm$ 53,71) ^a	480 ($\pm$ 34,99) ^b	441,7 ($\pm$ 29,94) ^b
SOLUBILIDADE (% de massa perdida)	<i>7 dias</i>	1,526 ($\pm$ 0,351) ^a	1,455 ($\pm$ 0,451) ^a	1,350 ($\pm$ 0,479) ^a
	<i>30 dias</i>	-3,866 ($\pm$ 1,099) ^c	-1,368 ($\pm$ 0,318) ^b	0,910 ($\pm$ 0,355) ^a
ALTERAÇÃO VOL. MICRO-CT (% volume perdido)	<i>7 dias</i>	-0,489 ($\pm$ 1,026) ^a	0,548 ($\pm$ 0,687) ^a	0,727 ($\pm$ 0,717) ^a
	<i>30 dias</i>	-0,204 ($\pm$ 1,578) ^a	1,352 ($\pm$ 1,483) ^{a,b}	2,526 ($\pm$ 1,050) ^b
RADIOPACIDADE (mm de Al)		5,092 ($\pm$ 0,167) ^a	5,427 ($\pm$ 0,353) ^a	5,246 ($\pm$ 0,265) ^a

MTA: Mineral Trióxido Agregado; FAR: Farnesol. * Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

pH

Durante todos os períodos experimentais o grupo controle (água destilada) apresentou menores valores de pH. No período de 1 e 3 dias, a maior alcalinização do meio foi atingida pelo MTA/FAR 1% e MTA/FAR 2%, em relação

ao MTA. Nos períodos 7, 14, 21 e 28 dias, os 3 materiais foram semelhantes ($p > 0,05$) (tabela 3).

Tabela 3: Média e (desvio padrão) do tempo de presa, solubilidade, alteração volumétrica e radiopacidade do MTA e suas associações com FAR

PERÍODO	MTA	MTA/FAR 1%	MTA/FAR 2%	CONTROLE
1 DIA	7.722 (± 0.091) ^b	7.922 (± 0.082) ^a	7.903 (± 0.164) ^a	7.211 (± 0.242) ^c
3 DIAS	7.724 (± 0.111) ^b	7.934 (± 0.097) ^a	7.931 (± 0.168) ^a	7.247 (± 0.165) ^c
7 DIAS	7.968 (± 0.203) ^a	8.043 (± 0.214) ^a	7.895 (± 0.197) ^a	7.574 (± 0.069) ^b
14 DIAS	7.897 (± 0.073) ^a	7.914 (± 0.100) ^a	7.901 (± 0.125) ^a	7.396 (± 0.237) ^b
21 DIAS	8.049 (± 0.1560) ^a	7.991 (± 0.213) ^a	8.038 (± 0.126) ^a	7.619 (± 0.082) ^b
28 DIAS	7.954 (± 0.157) ^a	7.797 (± 0.116) ^a	7.939 (± 0.220) ^a	7.531 (± 0.061) ^b

MTA: Mineral Trióxido Agregado; FAR: Farnesol; Controle: água destilada. *Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

A atividade antibiofilme foi avaliada pelos testes CV e DCTM. A adição de Farnesol nas duas concentrações aumentou significativamente a capacidade de redução de biomassa de *E. Faecalis*, assim como diminuiu significativamente as UFC/mL⁻¹ quando comparado com o grupo MTA, que apresentou diferença significativa também com o controle (Tabela 4)

Tabela 4: Média e (desvio padrão) da atividade antibiofilme do MTA e suas associações com FAR, teste de CV expresso em absorbância (Asb), e DCTM em UFCmL⁻¹

MTA: Mineral Trióxido Agregado; FAR: Farnesol; Controle: água destilada; CV: Cristal

TESTE	MTA	MTA/FAR 1%	MTA/FAR 2%	CONTROLE
CV	0.299 (± 0.049) ^b	0.150 (± 0.040) ^a	0.152 (± 0.020) ^a	0.462 (± 0.030) ^c
DCTM	5.685 (± 0.164) ^b	4.834 (± 0.372) ^a	4.617 (± 0.331) ^a	7.806 (± 0.387) ^c

Violeta; DCTM: Contato Direto Modificado. *Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

MTA apresenta limitada atividade antimicrobiana (5). No entanto, é desejável que os cimentos reparadores apresentem ação antimicrobiana sobre micro-organismos resistentes destacando o *E. faecalis*, que demonstra resistência ao ambiente altamente alcalino produzido pelo hidróxido de cálcio e pode invadir túbulos dentinários formando biofilme (1). A adição de substâncias com potencial antimicrobiano aos materiais endodônticos está sendo amplamente estudada (18-20). A adição de clorexidina 2% ou Nanopartículas de prata (7, 21) ao MTA demonstrou aumento da efetividade sobre *E. faecalis*.

A proporção utilizada foi de 3 partes de pó para 1 de água, pois favorece as propriedades físico-químicas do MTA branco (15). Os nossos resultados mostraram que a adição de FAR nas duas concentrações estudadas também altera o tempo de presa do cimento, aumentando o tempo de presa tanto inicial quanto final ($p < 0,05$). De forma semelhante, a adição de substâncias (propilenoglicol) ao MTA também promoveu o aumento do tempo de presa do material (23). Assim, a incorporação deste álcool sesquiterpeno pode retardar o processo de hidratação.

A solubilidade foi avaliada com teste convencional pela diferença de massa, antes e após a imersão em água (19). A avaliação da alteração volumétrica pelo micro-CT proporciona dados precisos e tridimensionais. Os períodos de avaliação na literatura variam desde 24 (12) horas até 78 dias (24, 25). No entanto o período de 7 dias tem sido amplamente utilizado (26-28). Por tanto, neste trabalho foram analisadas a solubilidade e a alteração volumétrica nos períodos de 7 e 30 dias.

As associações de FAR ao MTA nas duas concentrações estudadas foram semelhantes ao material puro ($p > 0,05$), mantendo seus valores dentro dos limites recomendados pela ISO 6876:2002 e concordando com estudos prévios (27, 28). Aos 30 dias MTA apresentou maior solubilidade, com valores superiores a 3% (29). Discordando com os achados de outros autores que avaliaram a solubilidade de diversos materiais reparadores, e aos 30 dias obtiveram valores menores a 3% (30). No entanto, MTA/FAR 1% apresentou diminuição de massa e MTA/FAR 2% aumento. Aos 7 dias os três materiais foram semelhantes em relação à alteração volumétrica. No entanto, MTA mostrou diminuição de

volume, enquanto que a associação ao FAR apresentou aumento. No período de 30 dias o MTA mostrou diminuição de volume, que pode ser relacionada à maior solubilidade. MTA/FAR 1% e MTA/FAR 2% aumentaram de volume neste período. Concordando com resultados de solubilidade, MTA/FAR 1% apresentou pequena perda de massa e MTA/FAR 2% mostrou aumento de massa após 30 dias.

A solubilidade do MTA pode estar relacionada com a presença do óxido de bismuto como radiopacificador, que tem mostrado aumentar a porosidade do cimento, diminuindo sua estabilidade mecânica e aumentando sua solubilidade (4, 31). Por outro lado, a adição de farnesol pode ter diminuído a dissociação dos componentes do cimento. Ainda, o aumento de volume dos cimentos com Farnesol pode estar relacionado ao maior tempo de presa e tempo de hidratação do material. Desta forma, na presença de maior concentração de farnesol foi observada menor solubilidade e maior alteração volumétrica no micro-CT.

No teste de radiopacidade foram todos os materiais foram semelhantes ($p>0,05$), evidenciando que a adição de FAR não interfere nessa propriedade. Estes resultados superaram o valor mínimo de 3 mm de Al recomendado pela norma ISO 6876. Estudos que avaliaram a radiopacidade do MTA em sangue e água destilada encontraram valores superiores a 3 mm de Al (32, 33).

O teste de pH foi realizado segundo Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2011 (17). Os nossos resultados mostraram que a adição do FAR aumentou alcalinização do meio nos períodos de 1 e 3 dias ($p<0,05$). No entanto, nos demais períodos avaliados, a capacidade de alcalinização foi semelhante entre os materiais. Embora utilizando metodologia diferente, Cavenago *et al.*, 2014 também observaram valores de pH semelhantes aos do presente estudo.

A associação do FAR ao MTA foi proposta no presente estudo por ser uma substância natural com potencial antibiofilme e antifúngico (10, 11) e que não apresenta desenvolvimento de resistência microbiana (9). Desta forma, é objetivo favorecer a atividade antibiofilme do MTA, sem prejudicar as propriedades físico-químicas e biológicas do material. A adição de FAR ao MTA mostrou aumentar a atividade antimicrobiana. Os ensaios CV e DCTM são dos métodos mais utilizados para avaliação dos efeitos antimicrobianos de diversas substâncias na biomassa de biofilme (8, 22). E são reconhecidos por sua

reprodutibilidade (8). A atividade antibiofilme foi realizada sobre biomassa de biofilme de *E. faecalis*, micro-organismo resistente presente nos casos de insucesso do tratamento endodôntico (1, 2) e usado para avaliação do potencial antimicrobiano de materiais endodônticos (5, 18).

No ensaio CV todos os materiais apresentaram capacidade de reduzir biomassa de biofilme, entretanto, MTA/FAR 1% e MTA/FAR 2% mostraram melhores resultados quando comparado ao MTA ($p < 0,05$). O ensaio DCTM mostrou resultados concordantes, indicando que a incorporação de farnesol nas duas concentrações diminui as UFC/mL⁻¹ quando em contato com o biofilme de *E. faecalis*.

CONCLUSÃO

A incorporação de Farnesol 1 e 2% ao MTA aumenta a atividade antimicrobiana sobre a biofilmes de *Enterococcus faecalis*. A radiopacidade e o pH não foram alteradas, entretanto, ocorreu aumento do tempo de presa e alteração no volume aos 30 dias. As associações do MTA e Farnesol apresentam potencial para uso clínico.

REFERÊNCIAS

1. Ricucci D, Siqueira JF, Jr., Lopes WS, Vieira AR, Rocas IN. Extraradicular infection as the cause of persistent symptoms: a case series. *Journal of endodontics* 2015;41(2):265-273.
2. Yang J, Park OJ, Kim J, Baik JE, Yun CH, Han SH. Lipoteichoic Acid of *Enterococcus faecalis* Inhibits the Differentiation of Macrophages into Osteoclasts. *Journal of endodontics* 2016.
3. Kakani AK, Veeramachaneni C, Majeti C, Tummala M, Khiyani L. A Review on Perforation Repair Materials. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 2015;9(9):ZE09-13.
4. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *Journal of endodontics* 2007;33(3):295-298.
5. Kim RJ, Kim MO, Lee KS, Lee DY, Shin JH. An in vitro evaluation of the antibacterial properties of three mineral trioxide aggregate (MTA) against five oral bacteria. *Archives of oral biology* 2015;60(10):1497-1502.
6. Bidar M, Naderinasab M, Talati A, Ghazvini K, Asgari S, Hadizadeh B, et al. The effects of different concentrations of chlorhexidine gluconate on the antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate and calcium enrich mixture. *Dental research journal* 2012;9(4):466-471.
7. Jonaidi-Jafari N, Izadi M, Javidi P. The effects of silver nanoparticles on antimicrobial activity of ProRoot mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium enriched mixture (CEM). *Journal of clinical and experimental dentistry* 2016;8(1):e22-26.
8. Alves FR, Silva MG, Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Biofilm biomass disruption by natural substances with potential for endodontic use. *Brazilian oral research* 2013;27(1):20-25.
9. Gomes F, Teixeira P, Cerca N, Azeredo J, Oliveira R. Effect of farnesol on structure and composition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm matrix. *Current microbiology* 2011;63(4):354-359.
10. Fernandes RA, Monteiro DR, Arias LS, Fernandes GL, Delbem AC, Barbosa DB. Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. *Biofouling* 2016;32(3):329-338.
11. Brilhante RS, de Lima RA, Marques FJ, Silva NF, Caetano EP, Castelo-Branco Dde S, et al. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. *Journal of medical microbiology* 2015;64(Pt 4):394-399.
12. Standardization IOF. Root Canal Sealing Materials. International Organization for Standardization 2002;Geneva, Switzerland:ISO 6876.
13. Materials ASfTa. Standard Test Method for Time and Setting of Hydraulic-Cement Paste by Gillmore Needles. ASTM International, West Conshohocken 2008:ASTM C266-208.
14. Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, Sinhoreti MA, Consani S, Sousa-Neto MD. Solubility and dimensional change after setting of root canal sealers: a proposal for smaller dimensions of test samples. *Journal of endodontics* 2007;33(9):1110-1116.
15. Cavenago BC, Pereira TC, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Marciano MA, Bramante CM, et al. Influence of powder-to-water ratio on radiopacity, setting time, pH, calcium ion release and a micro-CT volumetric solubility of white mineral trioxide aggregate. *International endodontic journal* 2014;47(2):120-126.
16. Vivan RR, Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, Hungaro Duarte MA, et al. Evaluation of the radiopacity of some commercial and experimental root-end filling materials. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2009;108(6):e35-38.
17. Guerreiro-Tanomaru JM, Morgental RD, Flumignan DL, Gasparini F, Oliveira JE, Tanomaru-Filho M. Evaluation of pH, available chlorine content, and antibacterial activity of endodontic irrigants and their combinations against *Enterococcus faecalis*. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2011;112(1):132-135.

18. Del Carpio-Perochena A, Kishen A, Shrestha A, Bramante CM. Antibacterial Properties Associated with Chitosan Nanoparticle Treatment on Root Dentin and 2 Types of Endodontic Sealers. *Journal of endodontics* 2015;41(8):1353-1358.
19. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *Journal of endodontics* 2010;36(3):400-413.
20. Samiei M, Aghazadeh M, Lotfi M, Shakoei S, Aghazadeh Z, Vahid Pakdel SM. Antimicrobial Efficacy of Mineral Trioxide Aggregate with and without Silver Nanoparticles. *Iranian endodontic journal* 2013;8(4):166-170.
21. Holt DM, Watts JD, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. The anti-microbial effect against enterococcus faecalis and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chlorhexidine liquid. *Journal of endodontics* 2007;33(7):844-847.
22. Barros J, Silva MG, Rocas IN, Goncalves LS, Alves FF, Lopes MA, et al. Antibiofilm effects of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *Journal of endodontics* 2014;40(8):1167-1171.
23. Duarte MA, Alves de Aguiar K, Zeferino MA, Vivan RR, Ordinola-Zapata R, Tanomaru-Filho M, et al. Evaluation of the propylene glycol association on some physical and chemical properties of mineral trioxide aggregate. *International endodontic journal* 2012;45(6):565-570.
24. Ceci M, Beltrami R, Chiesa M, Colombo M, Poggio C. Biological and chemical-physical properties of root-end filling materials: A comparative study. *Journal of conservative dentistry : JCD* 2015;18(2):94-99.
25. Samiei M, Shahi S, Aslaminabadi N, Valizadeh H, Aghazadeh Z, Pakdel SM. A new simulated plasma for assessing the solubility of mineral trioxide aggregate. *Iranian endodontic journal* 2015;10(1):30-34.
26. Abbaszadegan A, Sedigh Shams M, Jamshidi Y, Parashos P, Bagheri R. Effect of calcium chloride on physical properties of calcium-enriched mixture cement. *Australian endodontic journal : the journal of the Australian Society of Endodontology Inc* 2015;41(3):117-121.
27. Dawood AE, Manton DJ, Parashos P, Wong RH, Palamara JE, Stanton DP, et al. The physical properties and ion release of CPP-ACP-modified calcium silicate-based cements. *Australian dental journal* 2014.
28. Tanomaru-Filho M, Garcia AC, Bosso-Martelo R, Berbert FL, Nunes Reis JM, Guerreiro-Tanomaru JM. Influence of addition of calcium oxide on physicochemical properties of Portland cement with zirconium or niobium oxide. *Journal of conservative dentistry : JCD* 2015;18(2):105-108.
29. ANSI/ADA. Specification No. 57 Endodontic Sealing Material. ANSI/ADA, Chicago 2000.
30. Singh S, Podar R, Dadu S, Kulkarni G, Purba R. Solubility of a new calcium silicate-based root-end filling material. *Journal of conservative dentistry : JCD* 2015;18(2):149-153.
31. Camilleri J, Mallia B. Evaluation of the dimensional changes of mineral trioxide aggregate sealer. *International endodontic journal* 2011;44(5):416-424.
32. Guerreiro Tanomaru JM, Storto I, Da Silva GF, Bosso R, Costa BC, Bernardi MI, et al. Radiopacity, pH and antimicrobial activity of Portland cement associated with micro- and nanoparticles of zirconium oxide and niobium oxide. *Dental materials journal* 2014;33(4):466-470.
33. Guimaraes BM, Tartari T, Marciano MA, Vivan RR, Mondeli RF, Camilleri J, et al. Color stability, radiopacity, and chemical characteristics of white mineral trioxide aggregate associated with 2 different vehicles in contact with blood. *Journal of endodontics* 2015;41(6):947-952.

5 CONCLUSÃO

A incorporação de óleo de Melaleuca 2% ao MTA aumenta a atividade antimicrobiana sobre biofilmes de *Enterococcus faecalis*. A adição de OME 1 e 2% ao MTA aumentou o tempo de presa e alterou a solubilidade aos 30 dias, no entanto, não alterou as demais propriedades físico-químicas avaliadas.

A adição de Farnesol 1 e 2% ao MTA aumenta o tempo de presa inicial e final deste material, diminui a solubilidade e aumenta o volumen do MTA em períodos mais longos (30 dias). Estas associações não interferem na radiopacidade do material, e melhoram a capacidade de alcalinização nos períodos de 1 e 3 dias. MTA/FAR 1% e MTA/FAR 2% têm melhor capacidade antibiofilme sobre biofilmes de *Enterococcus faecalis* que o MTA puro.

As associações do MTA ao óleo de Melaleuca e ao Farnesol apresentam potencial para utilização uso clínico.

REFERÊNCIAS*

1. American National Standards Institute, American Dental Association. ANSI/ADA. Specification no. 57 ADA. Laboratory testing methods: endodontic filling and sealing materials. Endodontic sealing materials. Chicago: ADA; 2000.
2. Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of proroot mta to improve handling characteristics and decrease setting time. *J Endod*. 2007; 33(10): 1231-4.
3. Bidar M, Naderinasab M, Talati A, Ghazvini K, Asgari S, Hadizadeh B, et al. The effects of different concentrations of chlorhexidine gluconate on the antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate and calcium enrich mixture. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012; 9(4): 466-71.
4. Bodrumlu E. Biocompatibility of retrograde root filling materials: a review. *Aust Endod J*. 2008; 34(1): 30-5.
5. Brilhante RS, de Lima RA, Marques FJ, Silva NF, Caetano EP, Castelo-Branco Dde S, et al. Histoplasma capsulatum in planktonic and biofilm forms: in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. *J Med Microbiol*. 2015; 64(Pt 4): 394-9.
6. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res*. 1981; 89(4): 321-8.
7. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1983; 55(3): 307-12.
8. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol*. 1985; 1(5): 170-5.
9. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater*. 2005; 21(4): 297-303.
10. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(1): 50-62.
11. Dagli N, Dagli R, Mahmoud RS, Baroudi K. Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015; 5(5): 335-40.
12. Duarte MA, Alves de Aguiar K, Zeferino MA, Vivan RR, Ordinola-Zapata R, Tanomaru-Filho M, et al. Evaluation of the propylene glycol association on some physical and chemical properties of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2012; 45(6): 565-70.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca:
<http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf>

13. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pecora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J.* 2000; 11(1): 3-9.
14. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002; 35(3): 221-8.
15. Fernandes RA, Monteiro DR, Arias LS, Fernandes GL, Delbem AC, Barbosa DB. Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. *Biofouling.* 2016; 32(3): 329-38.
16. Gomes F, Teixeira P, Cerca N, Azeredo J, Oliveira R. Effect of farnesol on structure and composition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm matrix. *Curr Microbiol.* 2011; 63(4): 354-9.
17. Gomes F, Leite B, Teixeira P, Cerca N, Azeredo J, Oliveira R. Farnesol as antibiotics adjuvant in *Staphylococcus epidermidis* control in vitro. *Am J Med Sci.* 2011; 341(3): 191-5.
18. Gomes FI, Teixeira P, Azeredo J, Oliveira R. Effect of farnesol on planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis*. *Curr Microbiol.* 2009; 59(2): 118-22.
19. Halcon L, Milkus K. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. *Am J Infect Control.* 2004; 32(7): 402-8.
20. Hassan ST, Majerova M, Sudomova M, Berchova K. [Antibacterial activity of natural compounds - essential oils]. *Ceska Slov Farm.* 2015; 64(6): 243-53.
21. Holt DM, Watts JD, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. The anti-microbial effect against *enterococcus faecalis* and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chlorhexidine liquid. *J Endod.* 2007; 33(7): 844-7.
22. Holt DM, Watts JD, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. The anti-microbial effect against *enterococcus faecalis* and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chlorhexidine liquid. *J Endod.* 2007; 33(7): 844-7.
23. Hsieh SC, Teng NC, Lin YC, Lee PY, Ji DY, Chen CC, et al. A novel accelerator for improving the handling properties of dental filling materials. *J Endod.* 2009; 35(9): 1292-5.
24. International Organization for Standardization Dentistry. ISO. 6876:2002. Root canal sealing materials. British Standards Institution. London, UK; 2001.
25. Jabra-Rizk MA, Meiller TF, James CE, Shirtliff ME. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(4): 1463-9.

26. Kakani AK, Veeramachaneni C, Majeti C, Tummala M, Khiyani L. A Review on Perforation Repair Materials. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9(9): ZE09-13.
27. Knezevic P, Aleksic V, Simin N, Svircev E, Petrovic A, Mimica-Dukic N. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Ethnopharmacol.* 2016; 178: 125-36.
28. Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA, et al. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. *J Dent Res.* 2005; 84(11): 1016-20.
29. Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001; 34(5): 399-405.
30. Marciano MA, Guimaraes BM, Amoroso-Silva P, Camilleri J, Hungaro Duarte MA. Physical and Chemical Properties and Subcutaneous Implantation of Mineral Trioxide Aggregate Mixed with Propylene Glycol. *J Endod.* 2016; 42(3): 474-9.
31. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31(1): 1-7.
32. Morgental RD, Vier-Pelisser FV, Oliveira SD, Antunes FC, Cogo DM, Kopper PM. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *Int Endod J.* 2011; 44(12): 1128-33.
33. Nelson RR. In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother.* 1997; 40(2): 305-6.
34. Nowak MA, Nelson RE, Breidenbach JL, Thompson PA, Carson PJ. Clinical and economic outcomes of a prospective antimicrobial stewardship program. *Am J Health Syst Pharm.* 2012; 69(17): 1500-8.
35. Odabas ME, Cinar C, Akca G, Araz I, Ulusu T, Yucel H. Short-term antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate with incorporated silver-zeolite. *Dent Traumatol.* 2011; 27(3): 189-94.
36. Ramage G, Saville SP, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(11): 5459-63.
37. Ricucci D, Siqueira JF, Jr., Lopes WS, Vieira AR, Rocas IN. Extraradicular infection as the cause of persistent symptoms: a case series. *J Endod.* 2015; 41(2): 265-73.
38. Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004; 30(5): 315-20.

39. Schwartz RS, Mauger M, Clement DJ, Walker WA, 3rd. Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. *J Am Dent Assoc.* 1999; 130(7): 967-75.
40. Shah PM, Chong BS, Sidhu SK, Ford TR. Radiopacity of potential root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996; 81(4): 476-9.
41. Siqueira JF, Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001; 34(1): 1-10.
42. Stowe TJ, Sedgley CM, Stowe B, Fenno JC. The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2004; 30(6): 429-31.
43. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85(1): 86-93.
44. Torabinejad M, Pitt Ford TR. Root end filling materials: a review. *Endod Dent Traumatol.* 1996; 12(4): 161-78.
45. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* 1995; 21(7): 349-53.
46. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. *J Endod.* 1995; 21(8): 403-6.
47. Wilkinson JM, Cavanagh HM. Antibacterial activity of essential oils from Australian native plants. *Phytother Res.* 2005; 19(7): 643-6.

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 29 de março de 2018

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 29 de março de 2016

GABRIELA MARIANA CASTRO NÚÑEZ