

Faculdade de Odontologia de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Carolina Andolfatto

**CITOCOMPATIBILIDADE, PROPRIEDADES ANTIBIOFILME E
FÍSICAS DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS ASSOCIADOS À
AMOXICILINA**

Araraquara
2015

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Carolina Andolfatto

**CITOCOMPATIBILIDADE, PROPRIEDADES ANTIBIOFILME E
FÍSICAS DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS ASSOCIADOS À
AMOXICILINA**

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 Doutor em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho

Araraquara
2015

CAROLINA ANDOLFATTO

**CITOCOMPATIBILIDADE, PROPRIEDADES ANTIBIOFILME E
FÍSICAS DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS ASSOCIADOS À
AMOXICILINA**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Professor Doutor Idomeo Bonetti Filho

2º Examinador: Professora Doutora Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

3º Examinador: Professora Doutora Yara Teresinha Corrêa Silva Sousa

4º Examinador: Professora Doutora Gisele Faria

5º Examinador: Professora Doutora Flaviana Bombarda de Andrade

Araraquara, 05 de Fevereiro de 2015

DADOS CURRICULARES

CAROLINA ANDOLFATTO

NASCIMENTO	06.02.1986 – Bariri/SP
FILIAÇÃO	Rubens Pierre Andolfatto Maria Cleusa Mazotti Andolfatto
2004 – 2007	Curso de Graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia de Araraquara– UNESP
2007-2008	Curso de Aperfeiçoamento em Endodontia na Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP
2008-2010	Curso de Especialização em Endodontia na Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP
2009- 2011	Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP, Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr-UNESP)
2011- 2015	Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP, Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr-UNESP)

DEDICATÓRIA

A Deus, pela força.

Aos meus pais Cleusa e Rubens, pelo o amor incondicional e pelo incentivo.

Ao meu irmão Júnior, pelo conselhos e pela amizade.

Ao meu noivo Arthur, pelo amor e pela paciência.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Idomeo Bonetti Filho, pelos ensinamentos.

A Professora Doutora Gisele Faria, que me adotou como orientada com muito carinho e me guiou durante todo este trabalho. Sem a ajuda dela e seus ensinamentos, nada disso seria possível.

Ao Professor Doutor Mário Tanomaru Filho e a Professora Doutora Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, por inúmeras vezes me aconselharam e ajudarem diretamente na confecção desta dissertação.

Aos demais professores, Professor Doutor Fábio Luis Camargo Villela Bebert, Professor Doutor Renato Toledo Leonardo e Professor Doutor Carlos Milton Kuga, pela convivência agradável e pela contribuição na minha formação profissional durante aulas e clínicas.

Aos colegas de pós-graduação, nível Mestrado e nível Doutorado, pela amizade, pelos encontros festivos, pela ajuda e pelo companheirismo durante esta caminhada. De maneira especial a Ana Livia, que sempre esteve me ajudando.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora e da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 PROPOSIÇÃO.....	17
3 CAPÍTULO 1.....	19
4 CAPITULO 2.....	39
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
6 REFERÊNCIAS	62

Resumo

Andolfatto C. Citocompatibilidade, propriedades antibiofilme e físicas de cimentos endodônticos associados à amoxicilina [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

RESUMO

Cimentos endodônticos associados à amoxicilina têm sido pesquisados como uma alternativa para obturação do canal radicular. Os objetivos do presente estudo foram: Avaliar a citocompatibilidade do AH Plus e do Sealapex associados com amoxicilina em quantidade de 10% do peso total dos cimentos (Capítulo 1) e avaliar o escoamento e o tempo de presa dos cimentos AH Plus e Sealapex associados à amoxicilina em diferentes concentrações e a atividade antibiofilme dos cimentos associados a uma maior concentração de amoxicilina que não altera as propriedades físicas de ambos os cimentos (Capítulo 2). No Capítulo 1 a citocompatibilidade dos materiais foi avaliada utilizando fibroblastos L929 expostos por 24 horas a diferentes diluições dos extratos dos cimentos puros e associados à amoxicilina. Os ensaios de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) e vermelho neutro foram utilizados para avaliação da viabilidade celular e a fluorescência para actina e α -tubulina foram utilizadas para análise do citoesqueleto. Os dados foram analisados empregando a análise de variância a dois critérios e pós teste de Bonferroni, com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que a incorporação de amoxicilina na concentração de 10% do peso total dos cimentos não diminuiu a viabilidade dos fibroblastos e não causou alterações estruturais nos componentes do citoesqueleto estudados. Conclui-se que à amoxicilina poderia ser um agente antimicrobiano promissor para ser incorporada aos cimentos endodônticos. No Capítulo 2 o escoamento e o tempo de presa dos cimentos puros ou associados à amoxicilina em concentrações de 0,25 a 10% foram estudadas de acordo com a especificação nº6876 da Organização Internacional de Padronização (ISO 2012). A avaliação antibiofilme dos cimentos puros e associados à amoxicilina 1% foi realizada por teste de contato direto com biofilme de *Enterococcus faecalis* previamente induzido em dentina bovina por 14 dias. Os cimentos frescos ficaram em contato com o biofilme por 30 minutos e aqueles com dois dias de manipulação por 15 horas. Em seguida foi determinado o número de unidades formadoras de colônias de *E. faecalis* no biofilme remanescente. Os dados foram analisados por ANOVA e pós teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Os resultados mostraram que para o escoamento, ficaram dentro da norma ISO 6876 (2012) o AH Plus puro e associado à amoxicilina a 1,0; 0,5 e 0,25% e o Sealapex puro e associado à amoxicilina a 5,5; 2,5; 1,0; 0,5 e 0,25% . O maior tempo de presa foi observado para o AH Plus puro, seguido pelas associações AH Plus + amoxicilina a 1,0, 0,5% e 0,25%. O Sealapex puro ou associado à amoxicilina não apresentou reação de presa completa. A adição de 1% de amoxicilina, tanto para AH Plus quanto para Sealapex, não aumentou a atividade antibiofilme destes cimentos. Conclui-se que quando associados à amoxicilina em concentrações de 1,0; 0,5 e 0,25% para o AH Plus e 5,5; 2,5; 1,0; 0,5 e 0,25% para o Sealapex os cimentos apresentaram escoamento dentro da norma ISO nº 6876 (2012). O tempo de presa do AH Plus associado à amoxicilina em concentrações 1,0; 0,5 e 0,25% foi adequado para o uso clínico e o Sealapex puro ou associado à amoxicilina não completou a reação de presa. O acréscimo de 1,0% de amoxicilina aos cimentos endodônticos não aumentou a atividade antibiofilme. Portanto a adição de amoxicilina à 1% do peso total dos cimentos AH Plus e Sealapex não é vantajosa.

Abstract

Andolfatto C. Cytocompatibility of endodontic sealers associated with amoxicillin [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

ABSTRACT

Sealers associated with amoxicillin have been developed as an alternative to root canal filling. The objectives of this study were to evaluate the cytocompatibility of AH Plus and Sealapex associated with amoxicillin in concentration of 10% of the total weight of sealer (Chapter 1) and evaluate the flow and the setting time of AH Plus sealer and Sealapex associated with amoxicillin at different concentrations and the activity of sealers antibiofilm associated with higher concentrations of amoxicillin which does not alter the physical properties of both sealers (Chapter 2). In Chapter 1 cytocompatibility of the materials was assessed using the L929 fibroblasts exposed for 24 hours with different dilutions of the extracts of pure sealer and associated with amoxicillin. The testing of 3- (4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium (MTT), and neutral red were used for evaluation of cell viability and fluorescence actin and α -tubulin were used for analysis of the cytoskeleton. Data were analyzed using analysis of variance and two criteria Bonferroni post test at 5% significance level. The results showed that incorporation of amoxicillin at a concentration of 10% by weight of the sealer did not decrease the viability of fibroblasts and did not cause structural changes in the cytoskeletal components studied. It is concluded that amoxicillin could be a promising antimicrobial agent to be incorporated in sealers. In chapter 2 the flow and setting time of the sealer pure or associated with amoxicillin from 0.25 to 10% concentrations were evaluated according to n° 6876 specification of the International Organization for Standardization (ISO 2012). The antibiofilm evaluation of pure sealer and 1% associated with amoxicillin was performed by direct contact test with *Enterococcus faecalis* biofilm previously induced in bovine dentin for 14 days. Fresh sealer were in contact with the biofilm for 30 minutes and those with two days of manipulation for 15 hours. Then was determined the number of units forming colonies of *E. faecalis* biofilms remaining on. Data were analyzed by ANOVA and Tukey post test ($\alpha = 0.05$). The results showed that for the flow, were within the ISO 6876 standard (2012) AH Plus pure and associated with amoxicillin 1.0; 0.5 to 0.25% and the pure Sealapex and associated with amoxicillin 5.5; 2.5; 1.0; 0.5 and 0.25%. The increased setting time was observed for pure AH Plus, followed by amoxicillin + AH Plus associations 1.0, 0.5% and 0.25%. The pure or associated with amoxicillin Sealapex not had complete setting reaction. The addition of 1% of amoxycillin, both as to Sealapex AH Plus, antibiofilm not increase the activity of these sealers. We conclude that when associated with amoxicillin at concentrations 1.0; 0.5 and 0.25% to AH Plus and 5.5; 2.5; 1.0; 0.5 and 0.25% for Sealapex sealers showed flow within the ISO standard in 6876 (2012). The setting time of AH Plus associated with amoxicillin concentrations in 1.0; 0.5 and 0.25% was adequate for clinical use and the pure Sealapex or associated with amoxicillin did not complete the setting reaction. The increase of 1.0% of amoxicillin to sealers did not increase antibiofilm activity. Therefore the addition of amoxicillin to 1% by weight of sealer Sealapex AH Plus and is not advantageous.

1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

Embora vários fatores possam contribuir para falhas da terapia endodôntica, a persistência da infecção intra-radicular ou infecções secundárias são as principais causas dos insucessos (Siqueira, 2001). Desse modo, os principais objetivos do tratamento endodôntico são a redução ou eliminação da infecção microbiana do sistema de canais radiculares (Bystrom et al., 1981) e a prevenção da sua infecção após o tratamento endodôntico (Peters et al., 2002).

O controle das infecções endodônticas é realizado por meio de vários procedimentos combinados (Miranda et al., 2013). A instrumentação, irrigação e medicação intracanal reduzem significativamente a população microbiana do sistema de canais radiculares. No entanto, estes procedimentos não eliminam completamente os microrganismos de áreas de difícil acesso, como túbulos dentinários, canais laterais e ramificações apicais (Ricucci et al., 2013; Roças et al., 2013).

A obturação do canal radicular deve, portanto, evitar que fluidos dos tecidos periapicais alcancem esses microrganismos favorecendo sua sobrevivência. Além disto, a obturação deve prevenir que os microrganismos residuais atinjam os tecidos periapicais, além de agir como uma barreira contra possíveis infiltrações bacterianas (Donadio et al., 2009). Se houver infiltração, os microrganismos remanescentes no sistema de canais radiculares reiniciam o seu crescimento e há manutenção ou desenvolvimento da lesão periapical (Peciulienė et al., 2001).

Estudos têm mostrado que a microbiota do canal radicular de dentes com insucesso do tratamento endodôntico é diferente daquela dos dentes não tratados endodonticamente (Molander et al., 1998; Sundqvist et al., 1998; Peciulienė et al., 2001). *Enterococcus faecalis*, ocasionalmente detectados em infecções

endodônticas primárias (Lana et al., 2009), são os mais frequentemente isolados nas infecções secundárias ou persistentes (Stuart et al., 2006; Tennert et al., 2013) estando, portanto, intimamente relacionados a falhas do tratamento endodôntico (Pinheiro et al., 2003; Williams et al., 2006). Isto porque *E. faecalis* apresenta resistência a medicações intracanal como o hidróxido de cálcio e alguns antibióticos (Byström e Sundqvist, 1985; Haapasalo e Orstavik, 1987; Orstavik e Haapasalo 1990) e uma capacidade de sobreviver no canal radicular como um único organismo sem o suporte de outras bactérias (Fabricius et al., 1982). Adicionalmente, outra característica que parece aumentar substancialmente a resistência do *E. faecalis* é sua capacidade de permanecer viável, embora sem se multiplicar, na ausência de nutrientes; com retorno da disponibilidade de suplemento nutricional, *E. faecalis* reinicia seu crescimento (Portenier et al., 2005).

Para evitar o reinício do crescimento bacteriano, os materiais obturadores deveriam apresentar propriedades antimicrobianas e, idealmente, manter este efeito ao longo do tempo (Zhang et al., 2009). O AH Plus, um cimento endodôntico à base de resina epóxica (Dentsply, DeTrey, Konstanz, Germany) e o Sealapex, um cimento a base de hidróxido de cálcio, (Kerr, Romulus, MI) são amplamente utilizados. No entanto, apresentam limitações quanto ao seu poder antimicrobiano sobre *E. faecalis* (Cobankara et al., 2004; Zhang et al., 2009). Uma alternativa para melhorar a propriedade antibacteriana destes cimentos seria acrescentar a eles um antibiótico que atue sobre *E. faecalis* (Hoelscher et al., 2006; Razmi et al. 2008; Baer e Maki, 2010).

O uso tópico de antibiótico permite que altas concentrações sejam utilizadas sem que haja riscos sistêmicos ao paciente (Goodson et al., 1989). De acordo com Mohammadi e Abbot (2009) a aplicação local de antibióticos por meio de sua

incorporação ao cimento endodôntico pode se constituir em um modo eficiente de uso de antibióticos em Endodontia.

Hoelscher et al. (2006) avaliaram a efetividade da adição de amoxilina, clindamicina, penicilina, metronidazol e doxiciclina ao Kerr Pulp Canal Sealer EWT (cimento a base de óxido de zinco e eugenol) sobre *E. faecalis* e verificaram que a amoxicilina foi a que levou a maior efetividade antibacteriana da mistura. A amoxicilina foi utilizada em quantidade equivalente a 10% do peso total do cimento. A escolha desta concentração foi baseada em estudo piloto, no qual foram avaliadas as concentrações de 0; 0,1; 0,5; 1; 10; 25 e 50% de amoxicilina. Os resultados mostraram que a concentração de 10% foi a que apresentou maior atividade antibacteriana e que concentrações mais elevadas não aumentaram as zonas de inibição do crescimento do *E. faecalis*.

A amoxicilina é um antibiótico beta-lactâmico, bactericida, de espectro de ação ampliado, que inibe a síntese da parede celular e apresenta alta toxicidade seletiva, ou seja, apresenta toxicidade para o micro-organismo mas não para as células do hospedeiro (Yagiela et al., 2011).

Baer e Maki (2010) avaliaram a efetividade antibacteriana, através do teste de contato direto, do Pulp Canal Sealer EWT, o AH Plus e o RealSeal SE misturados com amoxicilina em quantidade de 10% do peso total do cimento. Todos os cimentos misturados com a amoxicilina inibiram completamente o crescimento de *E. faecalis*, antes e 1, 3 e 7 dias após a presa. Os cimentos sem adição de amoxicilina não inibiram o crescimento do *E. faecalis*.

Razmi et al. (2008) avaliaram o efeito antimicrobiano do cimento AH 26 associado a 1%, 5%, 10%, 25% e 50% de amoxicilina e de doxiciclina por meio de teste de difusão em ágar e também empregado, para obturar canais radiculares

contaminados experimentalmente com *E. faecalis*. Os resultados mostraram que todas as concentrações de antibióticos usadas apresentaram eficácia antibacteriana maiores que o cimentos puros, não havendo diferença entre as concentrações usadas, sendo, portanto, a concentração de 1% suficiente para o efeito antibacteriano. A combinação AH26/amoxicilina apresentaram zonas de inibição maiores do que a combinação AH26/doxiciclina em todas as concentrações; entretanto ambas eliminaram *E. faecalis* dos túbulos dentinários.

Um cimento endodôntico acrescido de antibiótico que perturbe o ambiente dos micro-organismos, e que mantenha sua propriedade antimicrobiana após a reação de presa, seria benéfico no resultado do tratamento endodôntico e na prevenção da reinfecção do canal radicular (Baer e Maki, 2010). Portanto a adição de amoxicilina ao AH Plus e ao Sealapex seria uma opção para aumentar a atividade antimicrobiana destes cimentos.

Por outro lado, os cimentos endodôntico devem não somente ser capazes de eliminar/minimizar a entrada e saída de bactérias do canal radicular, mas também levar a uma resposta tecidual que favoreça o reparo dos tecidos periapicais (Donadio et al., 2009) ou ou que pelo menos não interfira nele (Leonardo 2002).

Além do mais, ao acrescentar amoxilina nos cimentos endodônticos, estes devem apresentar um tempo de presa suficiente para sua aplicação clínica (Massi et al., 2011) e um escoamento que permita o preenchimento do canal radicular principal, dos canais acessórios e dos espaços entre os cones de guta-percha, sem que haja extrusão para os tecidos periapicais (Orstavik 1988).

Até o presente momento, não há trabalhos na literatura avaliando se a adição de amoxicilina a 10% do peso dos cimentos AH Plus e Sealapex altera a sua compatibilidade biológica e propriedades físicas. Além disto, há necessidade de

avaliar a atividade antimicrobiana desses cimentos associados a concentrações menores que 10% de amoxicilina.

2 Proposição

2 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo serão avaliar:

- 1- A citocompatibilidade do AH Plus e do Sealapex associados com amoxicilina em quantidade de 10% do peso total dos cimentos (Capítulo 1);
- 2- Avaliar o escoamento e o tempo de presa dos cimentos AH Plus e Sealapex associados à amoxicilina em diferentes concentrações e a atividade antibiofilme dos cimentos associados a uma maior concentração de amoxicilina que não altera as propriedades físicas de ambos os cimentos (Capítulo 2).

3 Capítulo 1

Cytocompatibility of endodontic sealers associated with amoxicillin

Artigo submetido para publicação no periódico Journal of Biomedical Materials Research: Part A

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the cytocompatibility of AH Plus and Sealapex associated with amoxicillin in a quantity of 10% by total weight of the sealers. L929 fibroblasts were exposed to dilutions of the pure sealer extracts or sealers associated with amoxicillin for 24 hours using culture media with or without 10% fetal bovine serum (FBS). Assays with 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) and neutral red were used to evaluate cell viability, and fluorescence for actin and α -tubuline were used for cytoskeletal analysis. The data were analyzed using two-way ANOVA and Bonferroni post test ($\alpha=0.05$). The incorporation of amoxicillin in the sealers did not diminish the viability of the fibroblasts and did not cause any structural changes in the cytoskeletal components evaluated. The presence of 10% FBS in the culture media did not alter the viability of cells exposed to AH Plus and pure amoxicillin but increased the viability of the cells exposed to Sealapex. The incorporation of amoxicillin in the endodontic sealers in concentration of 10% by total weight of the sealers caused no toxic effects on L929 fibroblasts. Therefore, amoxicillin could be a promising antimicrobial agent to be incorporated into endodontic sealers.

Key Words: amoxicillin, cytotoxicity, endodontic sealer, L929 fibroblasts

INTRODUCTION

Endodontic infections are controlled by means of instrumentation, irrigation and intracanal medication.¹ However, these procedures do not completely eliminate the microorganisms in root canal systems.² Therefore, root canal filling must prevent periapical tissue fluids from reaching these microorganisms, and should also act as a barrier preventing the microorganisms from attaining the periapical tissues.³

Enterococcus faecalis, bacteria occasionally detected in primary endodontic infections,⁴ are those most frequently isolated in secondary or persistent infections^{5,6} and are therefore closely related to endodontic treatment failures.^{7,8}

To prevent bacterial growth, filling materials should present antimicrobial properties, and ideally maintain this effect over the course of time.⁹ Endodontic sealers such as AH Plus (Dentsply DeTrey, GmbH, Konstanz, Germany), and Sealapex, (Kerr, Romulus, MI, USA) present limitations as regards their antimicrobial power against *E. faecalis*.^{9,10} An alternative for improving the antibacterial property of endodontic sealers would be to add to them, an antibiotic that acts against *E. faecalis*.^{11,12}

Hoelscher et al.¹² evaluated the effectiveness of the addition of amoxicillin, clindamycin, penicillin, metronidazol or doxycyclin to Kerr Pulp Canal Sealer EWT against *E. faecalis*, and verified that amoxicillin, in quantity of 10% by total weight of the sealer was the agent that led to the greatest antibacterial effectiveness of the mixture. More recently, Baer and Maki¹¹ evaluated the antibacterial effectiveness of the endodontic sealers Pulp Canal Sealer EWT, AH Plus and Real Seal SE with amoxicillin in the quantity of 10% by total weight of the sealers. All the sealers completely inhibited the growth of *E. faecalis*, before and 1, 3 and 7 days after setting.

Therefore, the addition of amoxicillin to AH Plus and Sealapex would be an option for increasing the antimicrobial activity of these sealers. On the other hand, endodontics sealers must lead to a tissue response that favors periapical tissue repair³ or that at least does not interfere in it. Up to the present moment, there are no studies in the literature evaluating whether the addition of amoxicillin to endodontic sealers alters their biologic compatibility.

The aim of the study was to evaluate the cytocompatibility of the AH Plus and Sealapex associated with amoxicillin in a quantity of 10% by total weight of the sealers in culture of L929 fibroblasts.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture

The mouse fibroblast cell line L929 were cultured in bottles, with DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrocell, Campinas, SP, Brazil) and 1% penicillin and streptomycin (Sigma-Aldrich) and incubated at 37°C, with 5% CO₂.

Preparation of sealers

AH Plus, AH Plus + amoxicillin (Arte e Ciência, Araraquara, SP, Brazil), Sealapex, Sealapex + amoxicillin and pure amoxicillin were evaluated. The sealers were prepared in accordance with the manufacturers' instructions in laminar flow. The quantity of amoxicillin equivalent to 10% by total weight of the sealers^{11,12} was used and was added to the sealers during manipulation. After this, the sealers were diluted in DMSO (Sigma-Aldrich) in the concentration of 60mg/mL and sonicated (Vibra Cell, Sonic & Materials Inc. Danbury, CT, USA) for 3 cycles of 5 seconds at a

70 W power. After this, dilutions of the sealers were made in DMEM, with or without 10% FBS. The final concentrations for AH Plus ranged from 25 to 175 µg/mL; and for Sealapex from 50 to 350 µg/mL. These concentrations were established for evaluating the dose-response of materials. The pure amoxicillin was used in the concentrations from 2.5 to 35 µg/mL, values that corresponded to 10% of the concentrations of endodontic sealers evaluated.

MTT assay

To evaluate whether the FBS could interfere in the cytotoxicity of the pure endodontic sealers and amoxicillin, we performed two evaluations. Initially the L929 fibroblasts were cultivated in 96-well plates (Corning Corp, Corning, NY), in the concentration of 7×10^4 cells/mL in DMEM containing 10% FBS for 24 hours. After this, the medium was replaced by the extracts of the materials diluted in DMEM with 10% FBS. In a second evaluation, the fibroblasts were cultivated in 96-well plates, in DMEM containing 5% FBS and were incubated for 24 hours. Next, the medium was replaced by the sealer and amoxicillin extracts diluted in DMEM without FBS.

After 24 hours of the fibroblasts in contact with the sealers, amoxicillin and control substances (DMSO and DMEM), the supernatant was removed, and 100 µL of the 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT-Sigma/Aldrich) solution was added at 1.0 mg/mL, and the cells were incubated at 37°C for 3 hours. After this period, this solution was removed and 100 µL acidified isopropyl alcohol was added to solubilize the formazan crystals. The absorbance of the solutions was measured in a spectrophotometer at wavelengths of 540 and 620 nm (ThermoPlate, Nashan District, Shenzhen, China). The absorbance readouts were normalized with cells exposed to the DMEM and represented the succinate

dehydrogenase activity (cell metabolism). It was verified that the FBS interfered in the viability of the cells exposed to Sealapex; therefore, in the neutral red, MTT and cytoskeletal assays, the materials evaluated were diluted in DMEM without FBS.

Neutral red assay

The fibroblasts were cultivated in the concentration of 7×10^4 cells/mL, in 96-well culture plates with DMEN containing 5% FBS. After 24 hours, the cells were incubated with the materials diluted in DMEM without FBS. After 24 hours, the supernatant was removed, and 100 μ L of the neutral red solution (Sigma/ Aldrich) was added at 0.05mg/mL, and the cells were incubated at 37°C for 3 hours. The solution was discarded and 100 μ L of 1% acetic acid solution in 50% alcohol was added to each well. The absorbance of the solutions was measured in a spectrophotometer at wavelengths of 540 and 620 nm. The absorbance readouts were normalized with the cells exposed to DMEM and represented the ability of viable cells to incorporate the neutral red within lysosomes where it accumulates on membrane-intact cells.

Fluorescence for actin and α -tubulin

The L929 fibroblasts were cultivated on Lab-Tek™ slides (Nalge Nunc, Rochester, NY) in the concentration of 1×10^5 cells/mL in medium containing 5% FBS for 24 hours. After the period the cells were incubated with pure amoxicillin in the concentration of 35 μ g/mL and with the sealers diluted in DMEM without FBS for 24 hours. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes, permeabilized with 0.5% Triton X-100 (Sigma–Aldrich) and the non-specific binds were blocked with 1% BSA/PBS. The cells were then incubated overnight at 4°C with primary antibody for α tubulin (monoclonal mouse anti- α -tubulin; Santa Cruz

Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, USA; 1:200). After, the cells were incubated with FITC-conjugated anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Inc., Burlingame; 1:200) at 37°C for 1 h, and afterwards the actin filaments were stained with phalloidin conjugated with rhodamine (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) for 1 hour at room temperature and DNA was stained with DAPI. The cells were analyzed and photographed using a Leica DM 6000M microscope equipped with Leica AF6000 Deconvolution System (Leica Microsystems, Wetzlar-Germany).

Statistical analysis

The assays were performed in triplicate and repeated three times and the data were presented as mean and standard deviation of the mean. The data were analyzed using two-way ANOVA and the Bonferroni post-test ($\alpha = 0.05$).

RESULTS

MTT and neutral red assays

The MTT and neutral red assays are shown in the Figure 1(1A-C). The MTT assay show that the presence of 10% FBS did not alter the viability of cells exposed to AH Plus and pure amoxicillin ($p > 0.05$); however, it led to a significant increase in the viability of cells exposed to Sealapex ($p < 0.05$).

The addition of amoxicillin to AH Plus led to an increase in cell viability at the concentrations of 100 ($p < 0.001$), 125 ($p < 0.01$) and 150 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.01$) in the MTT (Figure 1D) and neutral red (Figure 1E) assays. On the other hand the addition of amoxicillin to Sealapex did not alter the cell viability ($p > 0.05$) in both assays (Figure 1F-G).

The MTT and neutral red assays showed that pure amoxicillin did not alter cell viability at the concentrations used in the sealers. The vehicle DMSO did not altered viability of the cells (data not shown).

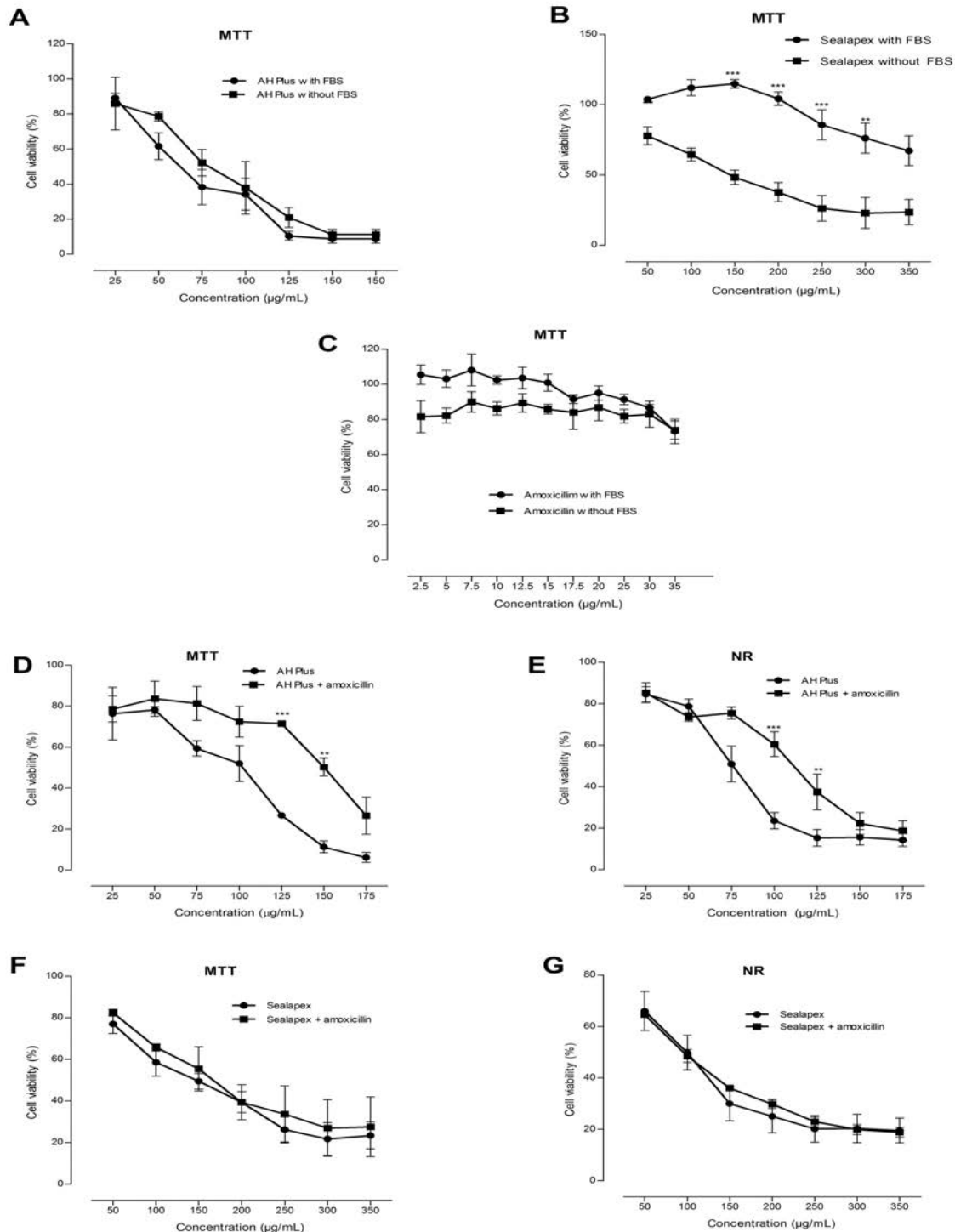


FIGURE 1. (A-C) L929 viability evaluated by MTT after exposure to different concentrations of AH Plus (A), Sealapex (B) and amoxicillin (C) diluted in culture medium with and without 10% FBS; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in relation to sealer at the same concentration without FBS. (D-G) Cell viability after exposure to different concentrations of AH Plus and AH Plus+amoxicillin evaluated by MTT (D) and neutral red (E) assays and after exposure to different concentrations of Sealapex and Sealapex+amoxicillin evaluated by MTT (F) and neutral red (G) assays; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in relation to sealer at the same concentration without amoxicillin. NR= Neutral Red, FBS = Fetal bovine serum.

Cytoskeletal analysis

In the control cells, the α -tubuline and actin filaments were shown to be delicate, forming a dense, uniformly distributed network around the nucleus, occupying the cytoplasm. The cytoskeleton of cells that were exposed to the pure amoxicillin at the highest concentration (35 $\mu\text{g/mL}$) was shown to be similar to those of the control (Figure 2).

At the lowest concentration of pure AH Plus, 50 $\mu\text{g/mL}$, both with and without amoxicillin, the cells presented cytoskeletal components similar to those of the control (Figure 3A and B, Figure 4A and B). At the concentrations of 75 and 100 $\mu\text{g/mL}$, α -tubuline (Figure 3C) and actin filaments (Figure 4C) were less evident, and at the concentrations of 125 and 150 $\mu\text{g/mL}$ they were shown to be disrupted, disorganized and disposed in a condensed manner around the nucleus; the elongated shape of the cells was lost, and the majority presented an oval or rounded appearance. When amoxicillin was added in the AH Plus concentrations of 50, 75, 100, 125 and 150 $\mu\text{g/mL}$ no changes were observed in α -tubuline (Figure 3B, D, F and H) and actin (Figure 4B, D, F and H). At the concentration of 175 $\mu\text{g/mL}$ of AH Plus with and without amoxicillin there was collapse of the two cytoskeletal components, preventing the fluorescence required for capturing the images.

For Sealapex (Figure 5 and 6), the addition of amoxicillin did not alter the cytoskeletal components. At the concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ the cells presented actin and α -tubuline similar to those of the control, and as from the concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ the cytoskeleton underwent progressive structural changes, and at the concentrations of 250 and 300 $\mu\text{g/mL}$ there was collapse and disappearance of the actin and α -tubuline bundles.

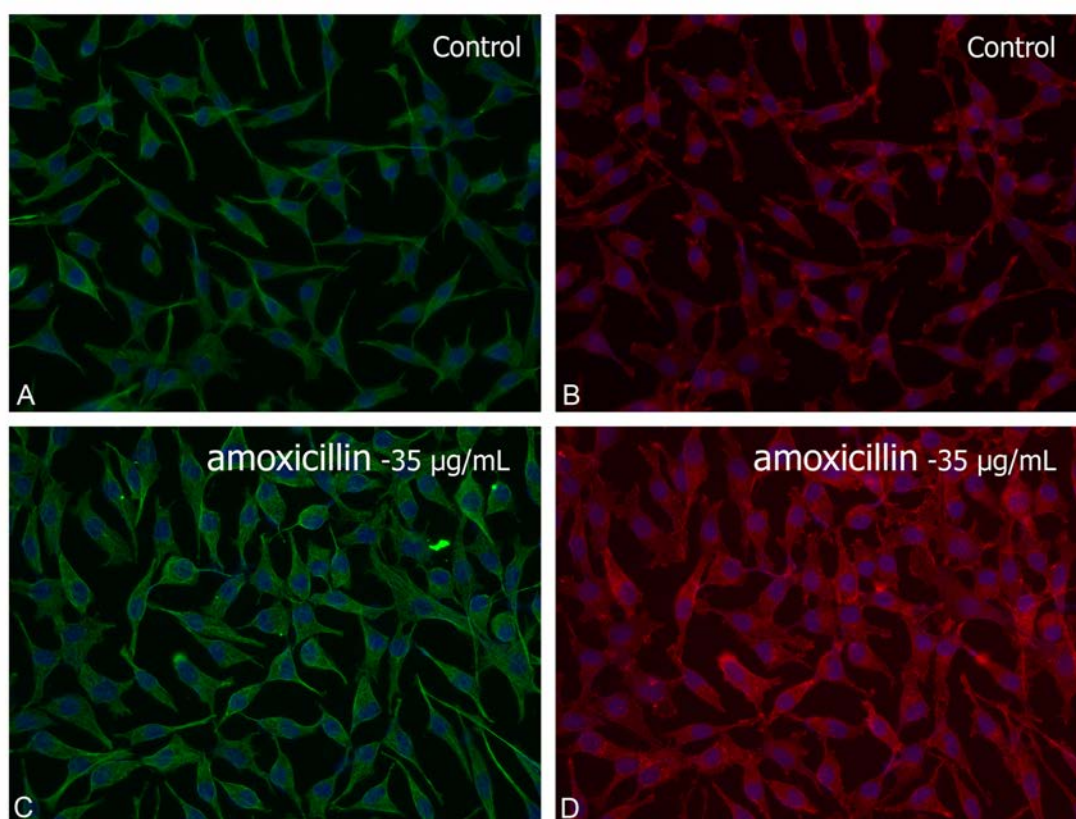


FIGURE 2. Fluorescence images representative of L929 fibroblasts exposed to the culture medium – control (A and B) and amoxicillin at concentration of 35 µg/mL (C and D). The microtubules were immunostained with anti- α -tubuline (green fluorescence), the actin filaments were stained with phalloidin (red fluorescence) and the nucleus stained with DAPI (blue fluorescence).

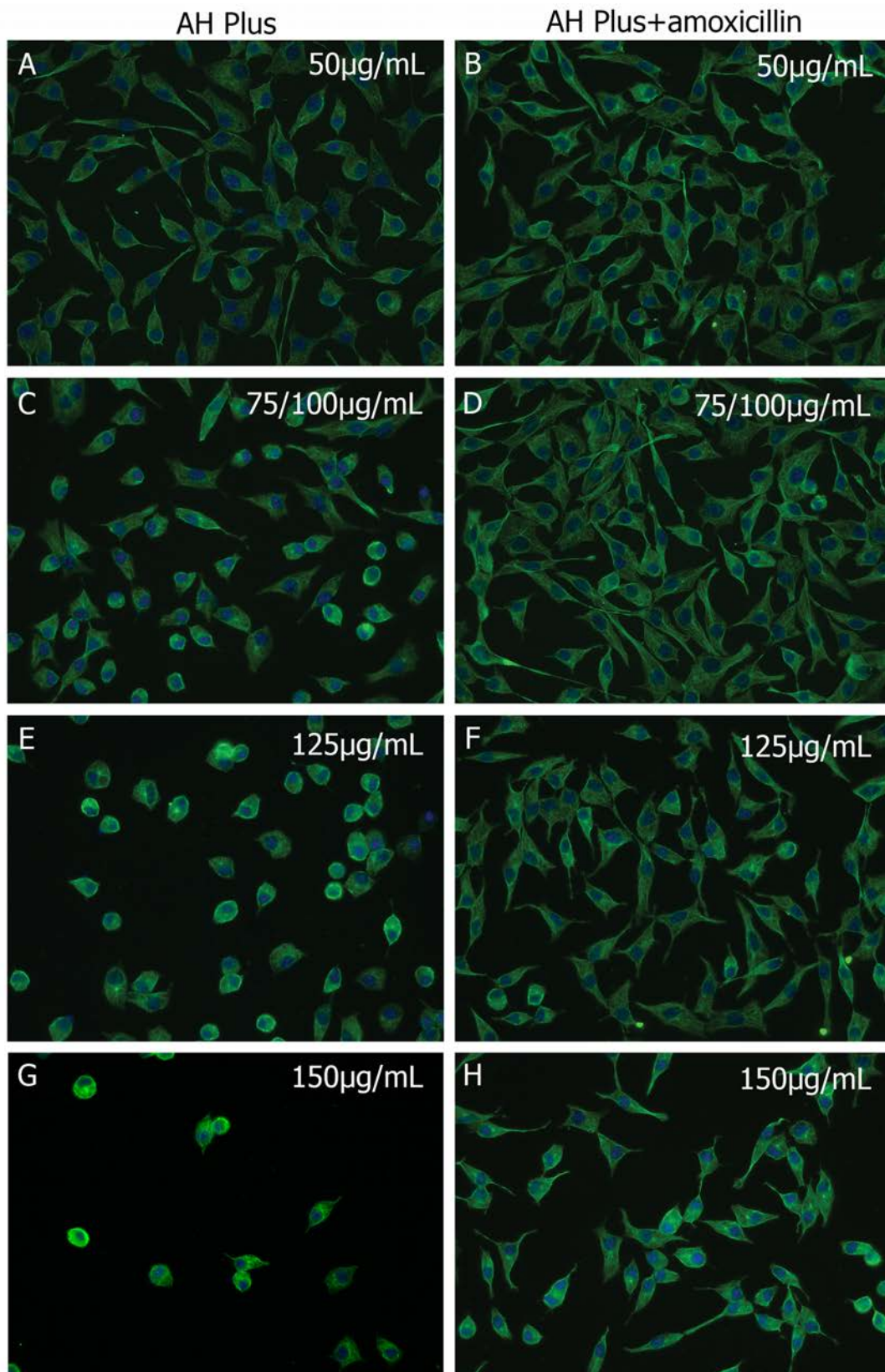


FIGURE 3. Immunostaining for α -tubuline. Fluorescence images representative of L929 fibroblasts exposed to different concentrations of AH Plus (A, C, E and G) and AH Plus+amoxicillin (B, D, F and H). The microtubules were stained with anti- α -tubuline (green fluorescence) and the nucleus with DAPI (blue fluorescence).

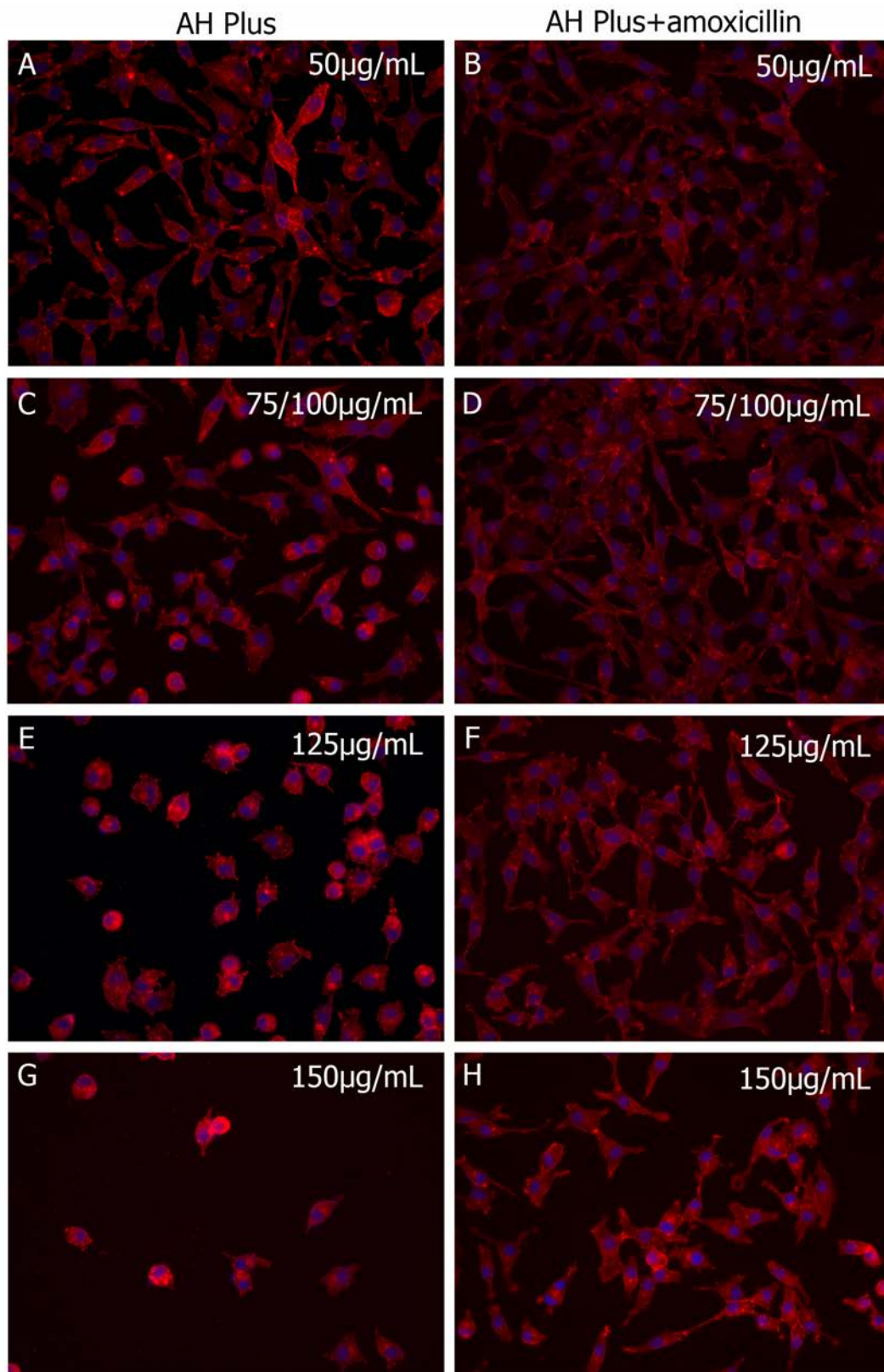


FIGURE 4. Staining for actin. Fluorescence images representative of L929 fibroblasts exposed to different concentrations of AH Plus (A, C, E and G) and AH Plus+amoxicillin (B, D, F and H). The actin filaments were stained with phalloidin (red fluorescence) and the nucleus with DAPI (blue fluorescence).

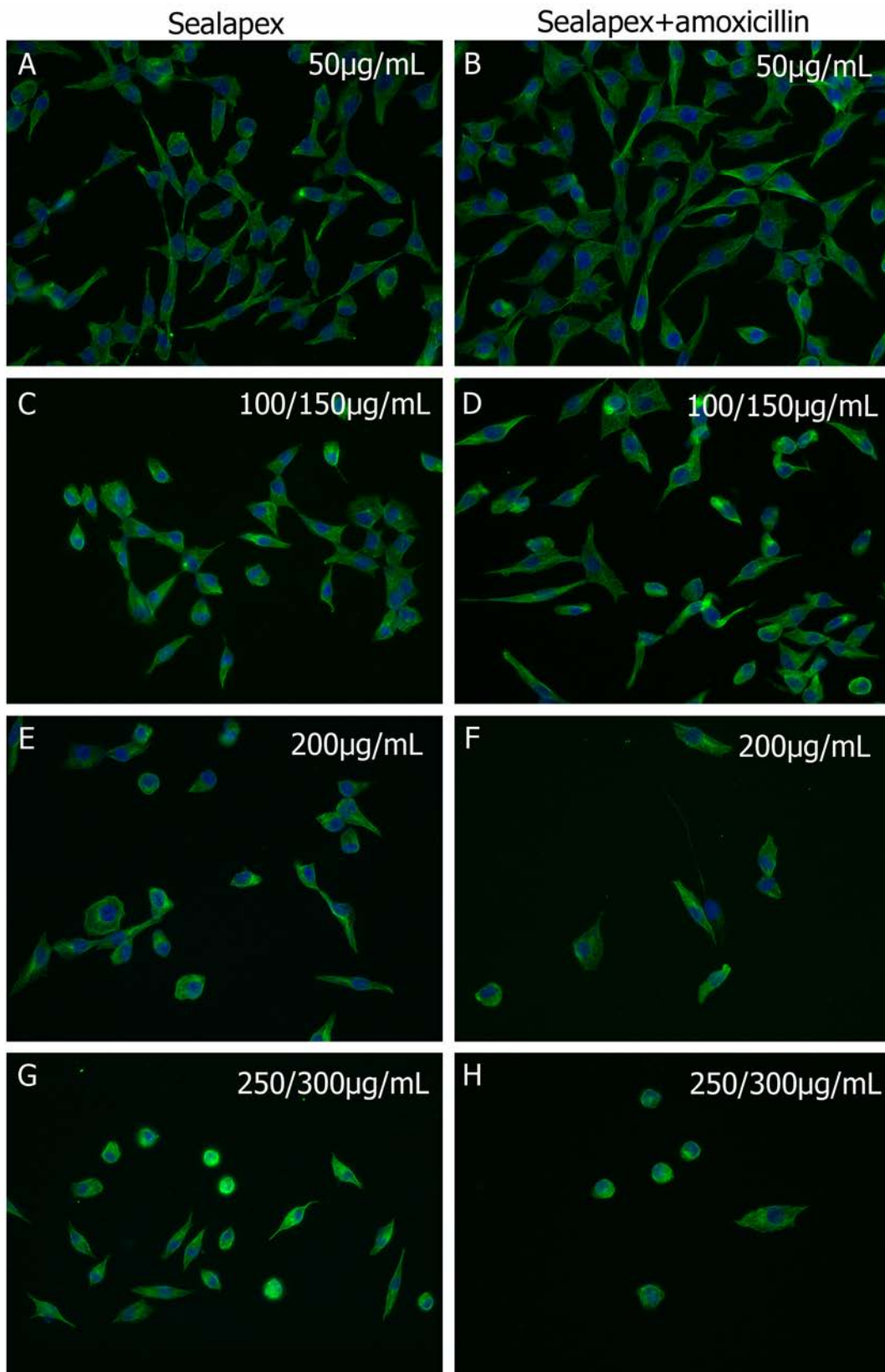


FIGURE 5. Immunostaining for α -tubuline. Fluorescence images representative of L929 fibroblasts exposed to different concentrations of Sealapex (A, C, E and G) and Sealapex+amoxicillin (B, D, F and H). The microtubules were stained with anti- α -tubuline (green fluorescence) and the nucleus with DAPI (blue fluorescence).

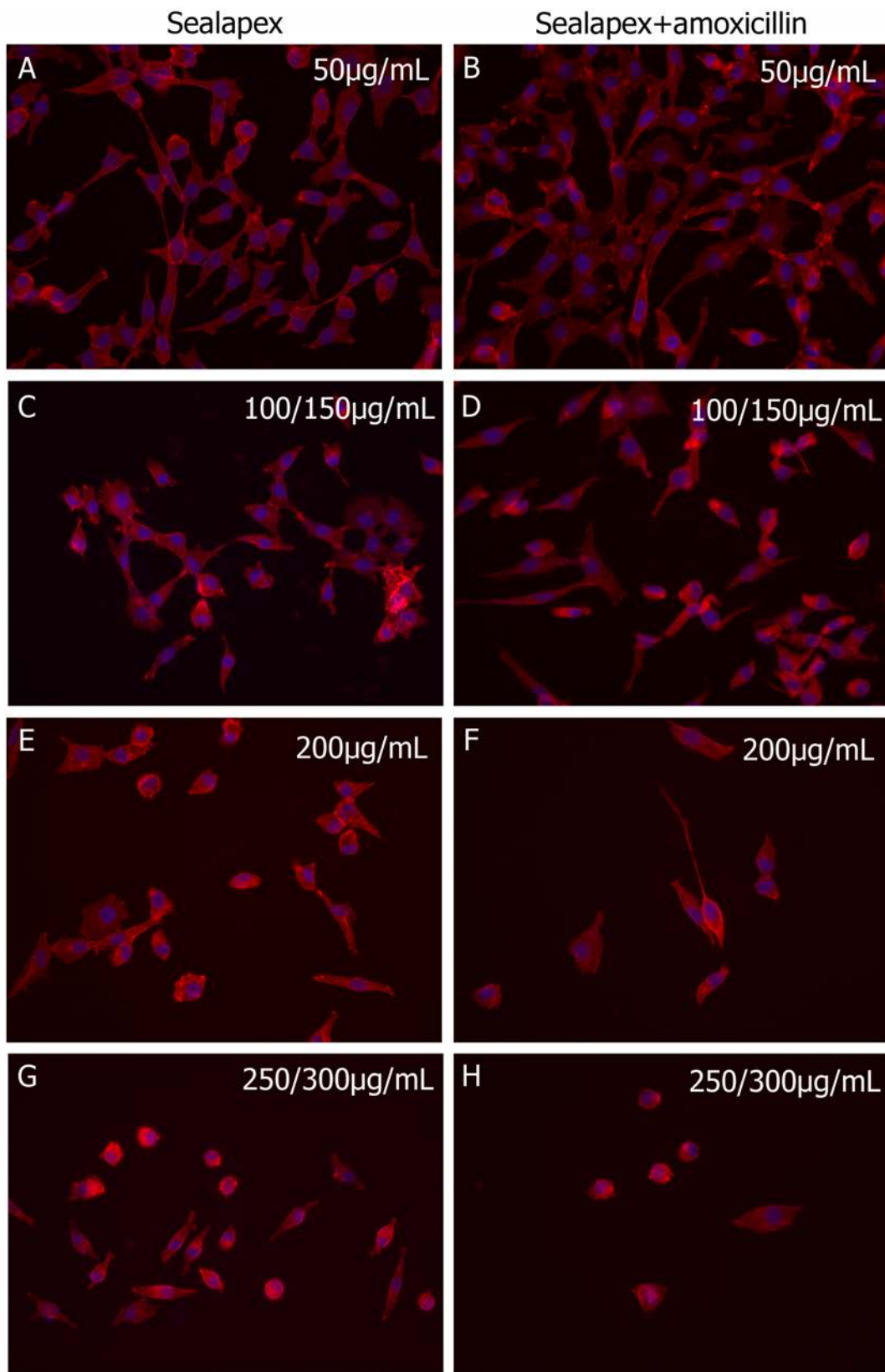


FIGURE 6. Staining for actin. Fluorescence images representative of L929 fibroblasts exposed to different concentrations of Sealapex (A, C, E and G) and Sealapex+amoxicillin (B, D, F and H). The actin filaments were stained with phalloidin (red fluorescence) and the nucleus with DAPI (blue fluorescence).

DISCUSSION

Recently, antibiotics have been incorporated into glass ionomer cements^{13,14} and endodontic sealers with the purpose of increasing the antimicrobial activity.^{11,12} This study was conducted to determine whether the addition of amoxicillin at the concentration of 10% by total weight of AH Plus and of Sealapex would alter the cytocompatibility of these sealers.

The extraction vehicle used was DMSO,¹⁵ since using the culture medium itself was not possible to obtain a homogeneous mixture of the extract. DMSO is an adequate extraction vehicle, provided it is used in the concentration below 0.5 %, ¹⁶ as was used in the present study.

The cells exposed to the materials were L929 fibroblasts, as they are indicated by the International Organization for Standardization (ISO) 10993-5 ¹⁶ and are frequently used in cytotoxicity tests of dental materials,^{3,17,18} they are easy to cultivate and present excellent sensitivity,¹⁹ metabolic and genetic stability and good reproducibility.²⁰

MTT, neutral red assays and fluorescence of cytoskeletal were performed because, according to the literature, to increase the reliability of the cytotoxicity results obtained, more than one type of assay must be used in *in vitro* studies.²¹ Furthermore, the simultaneous evaluation of different cell parameters increases the probability of detecting cytotoxic effects, allows the correlation of different parameters, sometimes provides indications of the mechanisms of toxicity²² and allows more precise identification of eventual cytotoxic effects of the sealers.²³

Although the cytotoxicity of dental materials is routinely tested in the presence of FBS,^{3,17,22,24} this agent can modify the results. Studies have shown that the presence of FBS in culture medium decreases the cytotoxicity of chlorhexidine,

hydrogen peroxide and sodium hypochlorite. This effect is likely to be related to a protective effect of FBS itself or the reaction of dental material with the FBS compounds or the increase in organic material.^{25,26} In the present study, the presence of FBS in the culture medium used to obtain the extracts of the sealers decreased the cytotoxicity of Sealapex, but not cytotoxicity of AH Plus or pure amoxicillin, probably because the FBS may bind to some component of Sealapex,¹⁶ diminishing its cytotoxicity. So, the FBS should not be used in the culture medium to obtain the extract of endodontic sealers. Therefore, the assays of the present study were performed without FBS.^{23,27}

The sealers were evaluated when freshly mixed,¹⁷ because the majority of endodontic sealers present greater cytotoxicity immediately after manipulation when compared with sealers after setting.^{24,28} The addition of amoxicillin to AH Plus and Sealpex sealers did not harm their cytocompatibility as demonstrated in the MTT and neutral red assays and cytoskeletal structure analyses. Amoxicillin is a beta-lactam, bactericidal, broad spectrum antibiotic that acts by inhibiting the synthesis of the bacterial cell wall. It presents highly selective toxicity; that is, it presents toxicity to the microorganism but not to the host cells, because these do not present a cell wall.²⁹

In conclusion, the incorporation of amoxicillin in the sealers in concentration of 10% by total weight of the sealers caused no toxic effects on L929 fibroblasts. Therefore, amoxicillin could be a promising antimicrobial agent to be incorporated into endodontic sealers. Nevertheless, further studies are needed to assess if the dose of amoxicillin cause allergic response, the length of time the sealer maintain its antimicrobial effect and if the antibiotic affect the physico-chemicals properties of the sealers.

REFERENCES

1. Miranda RG, Santos EB, Souto RM, Gusman H, Colombo AP. Ex vivo antimicrobial efficacy of the EndoVac system plus photodynamic therapy associated with calcium hydroxide against intracanal *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2013;46:499-505.
2. Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF, Jr. Exuberant Biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case. *J Endod* 2013;39:712-718.
3. Donadio M, Jiang J, He J, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Activ GP and Resilon sealers in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:e74-78.
4. Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, et al. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16:100-105.
5. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006;32:93-98.
6. Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod* 2014;40:670-677
7. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:100-103.
8. Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod* 2006;32:715-721.
9. Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2009;35:1051-1055.
10. Cobankara FK, Altinoz HC, Ergani O, Kav K, Belli S. In vitro antibacterial activities of root-canal sealers by using two different methods. *J Endod* 2004;30:57-60.
11. Baer J, Maki JS. In vitro evaluation of the antimicrobial effect of three endodontic sealers mixed with amoxicillin. *J Endod* 2010;36:1170-1173.
12. Hoelscher AA, Bahcall JK, Maki JS. In vitro evaluation of the antimicrobial effects of a root canal sealer-antibiotic combination against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2006;32:145-147.

13. de Castilho AR, Duque C, Negrini Tde C, et al. Mechanical and biological characterization of resin-modified glass-ionomer cement containing doxycycline hyclate. *Arch Oral Biol* 2012;57:131-138.
14. Ferreira JM, Pinheiro SL, Sampaio FC, Menezes VA. Use of glass ionomer cement containing antibiotics to seal off infected dentin: a randomized clinical trial. *Braz Dent J* 2013;24:68-73.
15. Li PY, Chang YC, Tzang BS, Chen CC, Liu YC. Antibiotic amoxicillin induces DNA lesions in mammalian cells possibly via the reactive oxygen species. *Mutat Res* 2007;629:133-139.
16. Standardization IOF. ISO 10993:5 Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. London: British Standards Institution 2009;
17. Cotti E, Petreucic V, Re D, Simbula G. Cytotoxicity evaluation of a new resin-based hybrid root canal sealer: an in vitro study. *J Endod* 2014;40:124-128.
18. Faria G, Cardoso CR, Larson RE, Silva JS, Rossi MA. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: A role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;234:256-265.
19. Johnson HJ, Northup SJ, Seagraves PA, Garvin PJ, Wallin RF. Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro. I. Comparative test system sensitivity. *J Biomed Mater Res* 1983;17:571-586.
20. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. *J Dent* 1994;22 Suppl 2:S6-11.
21. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 2006;160:171-177.
22. De-Deus G, Canabarro A, Alves G, Linhares A, Senne MI, Granjeiro JM. Optimal cytocompatibility of a bioceramic nanoparticulate cement in primary human mesenchymal cells. *J Endod* 2009;35:1387-1390.
23. Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J* 2012;45:12-18.
24. Camargo CH, Oliveira TR, Silva GO, Rabelo SB, Valera MC, Cavalcanti BN. Setting time affects in vitro biological properties of root canal sealers. *J Endod* 2014;40:530-533.
25. Hidalgo E, Bartolome R, Dominguez C. Cytotoxicity mechanisms of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts and its bactericidal effectiveness. *Chem Biol Interact* 2002;139:265-282.
26. Tatnall FM, Leigh IM, Gibson JR. Assay of antiseptic agents in cell culture: conditions affecting cytotoxicity. *J Hosp Infect* 1991;17:287-296.

27. Modareszadeh MR, Di Fiore PM, Tipton DA, Salamat N. Cytotoxicity and alkaline phosphatase activity evaluation of endosequence root repair material. *J Endod* 2012;38:1101-1105.
28. Rodrigues C, Costa-Rodrigues J, Capelas JA, Fernandes MH. Long-term dose- and time-dependent effects of endodontic sealers in human in vitro osteoclastogenesis. *J Endod* 2013;39:833-838.
29. Yagiela JA, Dowd FJ, Johnson B, Mariotti A, Neidle EA. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry* . 6th ed. St Louis: Mosby Elsevier; 2011.

4 Capítulo 2

Propriedades físicas e antibiófilme de cimentos endodônticos associados à amoxicilina

Artigo a ser submetido para publicação no periódico International Endodontics Journal

4 CAPÍTULO 2

RESUMO

Objetivo: Avaliar o escoamento e o tempo de presa dos cimentos AH Plus e Sealapex associados à amoxicilina em diferentes concentrações e a atividade antibiofilme dos cimentos associados a uma maior concentração de amoxicilina que não altera as propriedades físicas de ambos os cimentos.

Metodologia: O escoamento e o tempo de presa dos cimentos puros ou associados à amoxicilina em concentrações de 0,25 a 10% foram estudadas de acordo com a especificação nº6876 da Organização Internacional de Padronização (ISO 2012). A avaliação antibiofilme dos cimentos puros e associados à amoxicilina 1% foi realizada por teste de contato direto com biofilme de *Enterococcus faecalis* previamente induzido em dentina bovina por 14 dias. Os cimentos frescos ficaram em contato com o biofilme por 30 minutos e aqueles com dois dias de manipulação por 15 horas. Em seguida foi determinado o número de unidades formadoras de colônias de *E. faecalis* no biofilme remanescente. Os dados foram analisados por ANOVA e pós teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Resultados: Para o escoamento, ficaram dentro da norma ISO 6876 (2012) o AH Plus puro e associado à amoxicilina a 1,0; 0,5 e 0,25% e o Sealapex puro e associado à amoxicilina a 5,5; 2,5; 1,0; 0,5 e 0,25% . O maior tempo de presa foi observado para o AH Plus puro, seguido pelas associações AH Plus + amoxicilina a 1,0, 0,5% e 0,25%. O Sealapex puro ou associado à amoxicilina não apresentou reação de presa completa. A adição de 1% de amoxicilina, tanto para AH Plus quanto para Sealapex, não aumentou a atividade antibiofilme destes cimentos.

Conclusão: Quando associados à amoxicilina em concentrações de 1,0; 0,5 e 0,25% para o AH Plus e 5,5; 2,5; 1,0; 0,5 e 0,25% para o Sealapex os cimentos

apresentaram escoamento dentro da norma ISO nº 6876 (2012). O tempo de presa do AH Plus associado à amoxicilina em concentrações 1,0; 0,5 e 0,25% foi adequado para o uso clínico e o Sealapex puro ou associado à amoxicilina não completou a reação de presa. O acréscimo de 1,0% de amoxicilina aos cimentos endodônticos não aumentou a atividade antibiofilme. Portanto a adição de amoxicilina à 1% do peso total dos cimentos AH Plus e Sealapex não é vantajosa.

Palavras-chave: amoxicilina, cimento endodôntico, escoamento, atividade antibiofilme, tempo de presa

INTRODUÇÃO

O espectro de bactérias detectado no sistema de canais radiculares infectado é amplo (Siqueira Jr. 2009). No entanto, *Enterococcus faecalis*, bactéria anaeróbia facultativa gram-positiva, é o principal micro-organismo relacionado a falhas do tratamento endodôntico (Ozbek *et al.* 2009). Esta espécie é detectável em aproximadamente 77% dos casos de insucesso (Stuart *et al.* 2006). *E. faecalis* é capaz de invadir os túbulos dentinários, ligar-se à dentina, formar comunidades organizadas em biofilmes e sobreviver por muito tempo nos canais radiculares, mesmo após o tratamento endodôntico (Chivatxaranukul *et al.* 2008).

O preparo químico-mecânico, embora promova uma redução na contagem de bactérias intracanal, não é suficiente para desinfetar totalmente o sistema de canais radiculares (Alves *et al.* 2013, Roças *et al.* 2013). Assim, uma alternativa para o controle efetivo da infecção radicular, chave do sucesso do tratamento endodôntico (Siqueira *et al.* 2008), seria o uso de cimentos endodônticos que apresentam efeito antimicrobiano (Baer e MaKi 2010).

O uso de cimento endodôntico com propriedade antibacteriana pode contribuir para eliminação de bactérias (Grosman 1980), pois entra em contato direto com micro-organismos remanescentes que ficam áreas inacessíveis ao preparo mecânico do canal radicular (Nair *et al.* 2005). O cimento AH Plus é um cimento à base de resina epóxica, com boas propriedades físicas (Viapiana *et al.* 2014) e biológicas (Al-Hiyasat *et al.* 2010) e com elevada resistência de união à dentina radicular (Guiotti *et al.* 2014). O Sealapex, à base de hidróxido de cálcio é reconhecido pelas suas propriedades biológicas satisfatórias (Huang *et al.* 2002). Entretanto, ambos apresentam limitações quanto ao seu poder antimicrobiano (Cobankara *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2009).

Para aumentar a atividade antibacteriana de cimentos endodônticos alguns agentes antimicrobianos tem sido incorporados a eles (Razmi *et al.* 2008, Baer e Maki 2010). A avaliação da associação dos antibióticos amoxicilina, clindamicina, doxiciclina, penicilina ou metronidazol ao cimento Pulp Canal Sealer EWT na concentração de 10%, mostrou que a amoxicilina é a que apresenta maior efetividade frente a *E. faecalis* (Holscher *et al.* 2006). Baer e Maki (2010) mostraram que os cimentos AH Plus, Pulp Canal Sealer EWT e Real Seal SE misturados com amoxicilina na concentração de 10% do peso total do cimento, apresentam efeito antimicrobiano satisfatório sobre *E. faecalis*.

O acréscimo de substâncias ao cimento endodôntico pode alterar suas propriedades físicas como tempo de presa, escoamento, entre outras, dependendo da concentração do agente incorporado (Bortuluzzi *et al.* 2009; Tuzuner *et al.* 2011). O tempo de presa de um cimento endodôntico é importante para permitir que haja tempo e consistência adequados para sua aplicação clínica (Massi *et al.* 2011). O escoamento permite que o cimento se distribua de forma satisfatória no sistema de canais radiculares e irregularidades anatômicas sem que haja extrusão periapical (Orstavik 1988).

Assim o objetivo deste estudo será avaliar o escoamento e o tempo de presa do AH Plus e Sealapex associados à amoxicilina em diferentes concentrações e a atividade antibiofilme dos cimentos associados a uma maior concentração de amoxicilina que não altera as propriedades físicas de ambos os cimentos.

MATERIAL E MÉTODO

Avaliação de propriedades físicas

Escoamento

A avaliação do escoamento foi realizada de acordo com a especificação da ISO nº 6876 (2012). Os cimentos AH Plus e Sealapex foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. A amoxicilina foi utilizada em quantidade equivalente a 10%, 7,5%, 5,5%, 2,5%, 1,0%, 0,5 e 0,25% do peso total dos cimentos e foi acrescentada a eles durante a espatulação. O AH Plus e o Sealapex puros foram utilizados como controles (n=10). Em seguida, 0,05 mL do cimento manipulado foi colocado no centro de uma placa de vidro usando uma seringa graduada (Becton Dickinson, Curitiba, Brasil). Após 180s do início da espatulação, outra placa de vidro e um peso foram colocados sobre o cimento, totalizando uma massa de 120 g. Dez minutos após o início da manipulação, a carga foi removida e os diâmetros maior e menor do disco de cimento compactado foram medidos com um calibrador digital com resolução de 0,01 mm (Mitutoyo MTI Corporation, Tóquio, Japão). Os diâmetros médios de cada disco de cimento foram calculados. As amostras, em que a diferença entre o maior e o menor diâmetro foi maior que 1 mm, foram descartadas.

Tempo de presa

Para a avaliação do tempo de presa foram empregadas apenas as concentrações de amoxicilina que mantiveram o escoamento dos cimentos AH Plus e Sealapex dentro das especificações da norma ISO nº 6876 (2012). O cimento AH Plus foi manipulado com amoxicilina nas concentrações de 1,0%, 0,5% e 0,25% do peso total do cimento e o Sealapex com 5,5%, 2,5 %, 1,0%, 0,5% e 0,25%. O AH

Plus e o Sealapex puros foram utilizados como controles.

Os cimentos foram inseridos em moldes metálicos com o formato de anel de 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura (n=8). Para determinar o tempo de presa foi utilizada a técnica da agulha Gillmore com peso de 100g e diâmetro de 2mm de acordo com a norma ISO 6876 (2012). Os anéis contendo os cimento foram mantidos em estufa em uma temperatura de 37 °C e 95% de humidade. O tempo de presa de cada cimento foi estabelecido calculando a média de tempo decorrido a partir do momento da manipulação até a agulha Gillmore deixar de causar indentações na superfície dos espécimes.

Avaliação da atividade antibiofilme

Incisivos centrais bovinos com as raízes completamente formadas foram utilizados como substrato para o desenvolvimento do biofilme. Com o auxílio de um disco diamantado (Isomet, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), em baixa velocidade, sob irrigação abundante, as raízes foram seccionadas em blocos medindo 5x5x0,7mm. Este blocos foram colocados em água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Os procedimentos microbiológicos e a manipulação dos blocos de dentina foram realizados em uma câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda., Campinas, Brasil). Uma cepa padrão do *E. faecalis* (ATCC 29212) foi utilizada para formação do biofilme. Depois que pureza da cepa foi confirmada por coloração de Gram e morfologia das colônias, o micro-organismo foi reativado em 4,0 mL de caldo BHI, (Disco Laboratories Inc., Detroit, MI, EUA) e mantidos em estufa a 37°C durante a noite. Depois disso, a densidade óptica do meio foi medida em espectrofotometro (modelo 600 Plus Femto, São Paulo, SP, Brasil), empregando 600 nm de

comprimento de onda. A densidade celular foi ajustada em $3,2 \times 10^7$ unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹).

Os blocos de dentina bovina foram colocados em placas de cultura com 24 poços, e em cada poço foi acrescentado 200 microlitros do inóculo e 1,8 mL de meio BHI estéril. As placas com os blocos de dentina submersos foram mantidas em câmara de anaerobiose dentro de uma incubadora (modelo Q816M20, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil), sob agitação constante, em um ambiente de microaerofilia a 37°C por 14 dias. O meio BHI de cada espécime foi substituído a cada 48 horas, sem a adição de novos micro-organismos.

Previamente ao contato com os cimentos, os blocos de dentina contendo biofilme foram previamente imersos duas vezes em solução salina para remoção das bactérias plânctônicas.

Foram estudados os cimentos AH Plus e Sealapex puros e associados à amoxicilina (Farmácia Arte e Ciência, Araraquara-SP, Brasil) em quantidade de 1% do peso total do cimento. Esta quantidade de amoxicilina foi escolhida por ser a concentração que não alterou as propriedades físicas tanto do cimento AH Plus quanto do Sealapex.

A atividade antibiofilme foi avaliada com os cimentos frescos e dois dias após reação de presa. Para confecção das amostras, os cimentos foram manipulados, inseridos em molde de silicone de 7x1mm (diâmetro interno X espessura) e mantidas em estufa a 37°C e umidade relativa do ar de 100% por dois dias. Em seguida, os discos de cimento foram colocados sobre os blocos de dentina e retornaram a estufa por período de 15 horas de contato (Faria Jr. *et al.* 2013). Como controle foram utilizados discos de polietileno.

Para o experimento com os cimentos frescos, estes foram manipulados,

inseridos em uma seringa graduada de 5 mL, sendo a quantia de 0,05 mL dispensada sobre os blocos de dentina contendo o biofilme, de maneira a cobrir todo bloco com uma espessura padronizada de cimento. Os cimentos permaneceram em contato com o biofilme por 30 minutos. Como controle foi usada uma mistura de amoxicilina com propilenoglicol.

Após os períodos de contato, os discos de cimentos foram removidos e o blocos de dentina com o biofilme foram colocados em tubos do tipo eppendorf contendo 1 mL de solução salina e duas pérolas de vidro estéreis. Os tubos foram agitados em um vórtex (modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) por um minuto para romper o biofilme. Os cimentos frescos foram separados/removidos dos blocos de dentina durante a agitação dos tubos no vórtex. O movimento de agitação fez com que o cimento se separasse do bloco de dentina e se aderisse as paredes do tubo.

Em seguida, diluições decimais seriadas de *E. faecalis* foram feitas. No final das diluições, três alíquotas de 20 microlitros de cada suspensão foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de Tryptic Soy agar (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, EUA). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

A contagem de colônias resultou da média UFC mL⁻¹ das três áreas de crescimento bacteriano, em diluições que geraram entre 5 e 50 colônias por campo. Os dados foram submetidos a transformação logarítmica, e o resultado foi apresentado como a média e desvio padrão das seis amostras em cada grupo.

Análise estatística

A comparação dos resultados de cada cimento com e sem amoxicilina, foi efetuada empregando análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey, com nível de significância de 5% .

RESULTADOS

Escoamento

O escoamento do AH Plus e Sealapex puros ou associados as diferentes concentrações de amoxicilina foi baseado na média dos diâmetros (mm) dos discos obtidos para cada material analisado. Os resultados encontram-se na tabela 1. De acordo com a norma ISO nº 6876 (2012), os discos dos cimentos endodônticos devem apresentar pelo menos um diâmetro de 17 mm de escoamento. Para o grupo do AH Plus, ficaram dentro da norma o AH Plus puro e o AH Plus associado à amoxicilina a 1,0; 0,5 e 0,25%. O AH Plus puro apresentou o maior escoamento ($p < 0,05$); não houve diferença entre as associações AH Plus + amoxicilina nas concentrações de 2,5; 1,0; 0,5 e 0,25% ($p > 0,05$). Para o grupo do Sealapex, os cimentos puro e associados à amoxicilina a 5,5; 2,5; 1,0; 0,5 e 0,25% ficaram dentro da especificação da norma ISO 6876 (2012) e não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0,05$).

Tabela 1. Médias e desvios padrões do escoamento (mm) dos cimentos avaliados

Cimento	Escoamento	Cimento	Escoamento
AH Plus	22±(0,73) ^a	Sealapex	20±(0,45) ^a
AH Plus+amox 10%	10±(0,61) ^b	Sealapex+amox 10%	11±(0,73) ^b
AH Plus+amox 7,5%	14±(0,57) ^c	Sealapex+amox 7,5%	14±(1,28) ^b
AH Plus+amox 5,5%	14±(1,10) ^c	Sealapex+amox 5,5%	17±(2,24) ^a
AH Plus+amox 2,5%	16±(0,88) ^e	Sealapex+amox 2,5%	18±(0,69) ^a
AH Plus+amox 1,0%	17±(0,22) ^e	Sealapex+amox 1,0%	18±(1,04) ^a
AH Plus+amox 0,5%	17±(0,87) ^e	Sealapex+amox 0,5%	18±(1,00) ^a
AH Plus+amox ,25%	18±(0,66) ^e	Sealapex+amox ,25%	19±(0,85) ^a

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre grupos da mesma coluna. Amox= amoxicilina

Tempo de presa

O tempo de presa observado para o AH Plus puro e o AH Plus associado à amoxicilina em quantidades equivalentes a 1,0; 0,5 e 0,25% do peso total do cimento estão representados na tabela 2. O maior tempo de presa foi observado para o AH Plus puro ($p < 0,05$), seguido pelas associações AH Plus + amoxicilina a 1,0 e a 0,5% ($p > 0,05$) e pela associação AH Plus + amoxicilina a 0,25% ($p < 0,05$). O Sealapex puro e o Sealapex associado com amoxicilina a 5,5; 2,5; 1,0; 0,5 e 0,25% não apresentaram reação completa de presa.

Tabela 2. Médias e desvios padrões do tempo de presa (minutos) dos cimentos avaliados

Cimento	Tempo de presa
AH Plus	730,0±(8,66) ^a
AH Plus+amox 1,0%	439,2±(8,61) ^b
AH Plus+amox 0,5%	455,0±(5,47) ^b
AH Plus+amox 0,25%	474,2±(14,29) ^c

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre grupos. Amox=amoxicilina

Atividade antibiofilme

A atividade antibiofilme dos cimentos fresco, esta mostrada na figura 1. Depois de 30 minutos de contato, apenas o AH Plus e o AH Plus+amoxicilina a 1% apresentaram significativa atividade antibiofilme. O Sealapex puro ou associado a amoxicilina a 1% não apresentou atividade antibiofilme.

A figura 2 mostra média log CFU mL⁻¹ depois de 15 horas de contato do biofilme com os cimentos de dois dias de manipulação. A comparação entre os materiais mostrou que apenas o Sealapex puro reduziu significativamente o *E. faecalis* quando comparado ao controle ($p < 0,05$). A adição de 1% de amoxicilina não alterou a atividade antibiofilme do Sealapex ($p > 0,05$). O AH Plus puro ou associado a amoxicilina 1% não apresentou atividade antibiofilme.

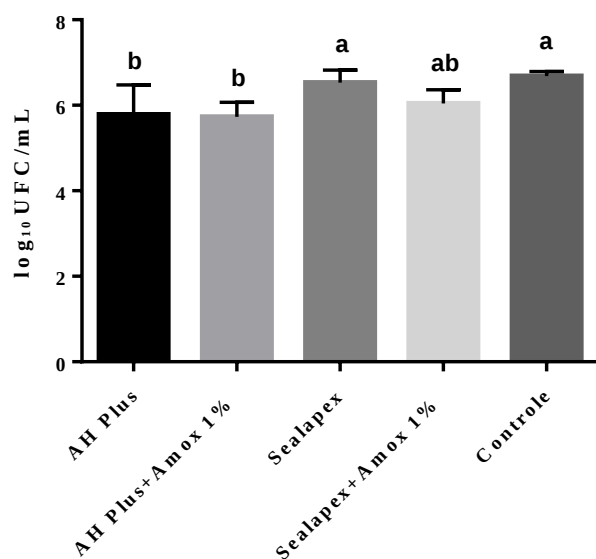


Figura 1. Média logarítima (10) CFU mL⁻¹ após 30 minutos de contato dos cimentos frescos com o biofilme. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre grupos.

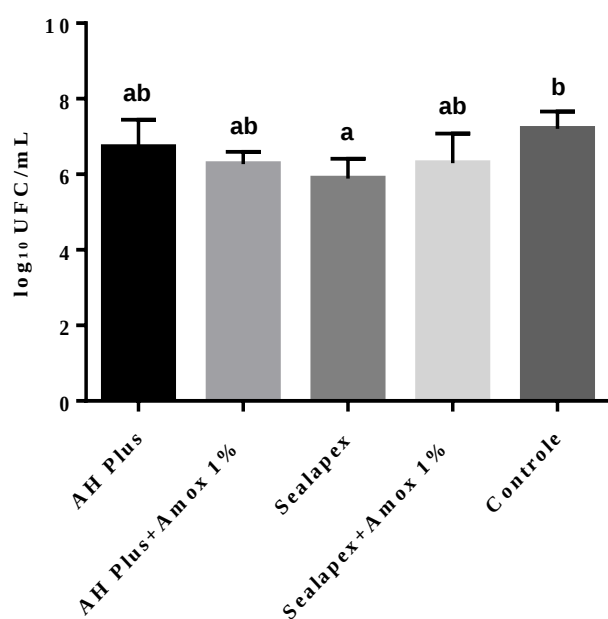


Figura 2. Média logarítima (10) CFU mL⁻¹ após 15 horas de contato dos cimentos com o biofilme, dois dias após a manipulação. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre grupos.

DISCUSSÃO

A proposta deste estudo foi investigar se o acréscimo de amoxicilina em diferentes concentrações aos cimentos AH Plus e Sealapex alteram o tempo de presa e o escoamento, e se a maior concentração de amoxicilina que não altera estas propriedades de ambos os cimentos possui efetividade frente ao biofilme de *E. faecalis*.

Os resultados mostraram que os valores do escoamento e do tempo de presa dos cimentos variou de forma dependente da concentração de amoxicilina adicionada; quanto maior a concentração de amoxicilina, menores os valores do escoamento e do tempo de presa.

Os testes físicos foram realizados de acordo com as especificações da ISO 6876 (2012), para permitir reprodutibilidade e futuras comparações entre os estudos. Recentemente, a norma ISO 6876 foi revista e foram estabelecidos novos padrões para o escoamento (ISO 6876, 2012). As alterações nas especificações incluíram a forma como os valores de escoamento devem ser apresentados, o que significa que eles devem ser arredondados para o número inteiro mais próximo em milímetros e o valor mínimo exigido para o escoamento diminuiu de 20 mm para 17 mm. Por outro lado, é importante salientar que um escoamento excessivo não é desejável, uma vez que pode aumentar o risco de extrusão apical do cimento (Viapiana *et al.* 2014). O cimento AH Plus puro e associado com amoxicilina nas concentrações de 1,0; 0,50 e 0,25%, assim como o Sealapex puro e associado com amoxicilina 5,5; 2,50; 1,0; 0,50; e 0,25% ficaram dentro das especificações da norma ISO 6876 (2012).

O escoamento é influenciado diretamente pela composição e tempo de presa do cimento (Grossman 1976). Ao acrescentar o pó de amoxicilina nas pastas de

ambos os cimentos, houve um espessamento da massa final. No entanto, quando a amoxicilina foi adicionada em quantidades pequenas ao AH Plus (1,0; 0,50; 0,25%), o escoamento se manteve acima de 17mm. O Sealapex, por possuir um escoamento maior do que o AH Plus, possibilitou que quantidades maiores de amoxicilina (2,5% e 5,5%) fossem acrescentadas a ele mantendo níveis aceitáveis de escoamento.

Para avaliação do tempo de presa a norma ISO 6876 (2012) preconiza o uso de um identador com peso na cabeça e de moldes para colocação do cimento. Este foi o método adotado para este estudo e por isso foi usada uma agulha Guillmore de 100 gramas para avaliar o tempo de presa dos cimentos colocados em moldes de 10 mm de diâmetro por 2 mm de espessura. Outra norma encontrada na literatura para avaliar o tempo de presa dos cimentos é a ASTM C 266 (2008). Esta norma é específica para avaliar o tempo de presa de cimentos hidráulicos e utiliza duas agulhas Gillmore com pesos diferentes para determinar o tempo de presa inicial e final. Este método não é considerado apropriado para o nosso estudo, já que esta norma preconiza a confecção de blocos de cimentos com grandes dimensões. Portanto, grande volume de material é necessário para reproduzir o teste e isto pode interferir nos resultados de forma que os valores obtidos podem não representar de forma fidedigna o tempo de presa dos materiais dentários (Viapiana *et al.* 2014).

O tempo de presa de um cimento não deve ser muito elevado pois pode aumentar a solubilidade e a possibilidade de contato com os tecidos do periodonto. Porém se for muito baixo, não permite um tempo adequado para o preenchimento do canal radicular (Grossman 1976). Ao acrescentar a amoxicilina ao AH Plus nas concentrações de 1,0; 0,50 e 0,25% houve uma diminuição estatisticamente

significante no tempo de presa em relação ao AH Plus puro, de 730,0 minutos para 439,2 ; 455,0 e 474,2 minutos respectivamente.

Os cimentos Sealapex puro e associados à amoxicilina não atingiram a reação de presa completa, como previamente relatado na literatura (Marín-Bauza *et al.* 2012, Viapiana *et al.* 2014).

O teste de contato direto utilizado foi baseado no estudo de Faria Jr. *et al.* (2013). Esta metodologia permite que materiais sejam colocados diretamente sobre o biofilme, permitindo analisar seu potencial antimicrobiano sobre este.

Foi utilizado o biofilme de *E. faecalis*, pois a sua presença em casos de insucesso do tratamento endodôntico mostra a relevância deste micro-organismo no tratamento do canal radicular (Evans *et al.* 2002). *E. faecalis* é uma das espécies mais resistentes do canal radicular e pode sobreviver em canais obturados mesmo sem suporte de outra bactéria e com pouco substrato (Hancock *et al.* 2001, Rôças *et al.* 2004, Rôças e Siqueira 2004, Siqueira e Rôças 2004).

Foi utilizada a concentração de amoxicilina de 1%, porque esta não alterou as propriedades físicas tanto do cimento AH Plus quanto do Sealapex. A amoxicilina, derivada da penicilina, é comumente usada no tratamento da infecção bacteriana, pois é um antibiótico beta-lactâmico, bactericida e de espectro de ação ampliado que atua inibindo a síntese da parede celular bacteriana (Belal *et al.* 2000, Yagiela *et al.* 2011).

Os cimentos foram avaliados frescos e após dois dias de manipulação, uma vez que o efeito antimicrobiano do cimento testado depende do intervalo de tempo entre a mistura e a aplicação da metodologia (Pizzo *et al.* 2006). O AH Plus fresco apresenta maior atividade antimicrobiana em relação ao tomado presa devido à maior liberação de formaldeído nesta fase (Zhang *et al.* 2009; Wang *et al.*, 2014),

enquanto que o Sealapex apresenta sua maior efetividade antimicrobiana quando tomado presa, pois é nesta fase que ocorre maior liberação de íons cálcio e hidroxila (Duarte *et al.* 2000, Faria Jr. *et al.* 21013) responsáveis pelo efeito antimicrobiano.

A adição de amoxicilina na quantidade de 1% do peso total do AHPlus e do Sealapex, não aumentou a atividade antibiofilme de ambos, tanto frescos como dois dias após a manipulação. Isto ocorreu, provavelmente porque a quantidade de amoxicilina utilizada foi muito pequena.

Baer *et al.* (2010) adicionaram amoxicilina aos cimentos endodônticos Pulp Canal Sealer, AH Plus e Real Seal SE. Uma suspensão de *E. faecalis* foi colocada sobre estes cimentos frescos, 1, 3 e 7 dias após a mistura. Encontraram melhor atividade bacteriana sobre *E. faecalis*, tanto para os cimentos frescos quanto tomado presa. Entretanto a concentração utilizada foi de 10% do peso total do cimentos, o que provavelmente levaria a um escoamento inadequado.

Razmi *et al.* (2008) avaliaram o efeito antimicrobiano do cimento AH 26 associado a 1%, 5%, 10%, 25% e 50% de amoxicilina e de doxiciclina por meio de teste de difusão em ágar, utilizando os cimentos frescos, e obturando canais radiculares contaminados experimentalmente com *E. faecalis*. Os resultados mostraram que a concentração de 1% de amoxicilina foi suficiente para aumentar o efeito antibacteriano. A diferença de resultados apresentados entre o trabalho de Razmi *et al.* (2008) e o presente estudo, ocorre provavelmente, porque as metodologias e os cimentos utilizado não são os mesmos.

CONCLUSÃO

Quando associados à amoxicilina em concentrações de 1,0; 0,5 e 0,25% para o AH Plus e 5,5; 2,5; 1,0; 0,5 e 0,25% para o Sealapex os cimentos apresentaram escoamento dentro da norma ISO nº 6876 (2012). O tempo de presa do AH Plus associado à amoxicilina em concentrações 1,0; 0,5 e 0,25% foi adequado para o uso clínico e o Sealapex puro ou associado à amoxicilina não completou a reação de presa. O acréscimo de 1,0% de amoxicilina aos cimentos endodônticos não aumentou a atividade antibiofilme. Portanto a adição de amoxicilina à 1% do peso total dos cimentos AH Plus e Sealapex não é vantajosa.

REFERÊNCIAS

Al-Hiyasat AS, Tayyar M, Darmani H (2010) Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *International Endodontics Journal* **43**, 148-53.

Alves FR, Rôças IN, Almeida BM, Neves MA, Zoffoli J, Siqueira JF Jr (2012) Quantitative molecular and culture analyses of bacterial elimination in oval-shaped root canals by a single-file instrumentation technique. *International Endodontics Journal* **45**, 871-7.

ASTM C 266 (2008) Standard test method for time of setting of hydraulic-cement paste by Gillmore needles. Designation C 266-03.

Baer J, Maki JS (2010) In vitro evaluation of the antimicrobial effect of three endodontic sealers mixed with amoxicillin. *Journal of Endodontics* **36**, 1170-3.

Baldi JV, Bernardes RA, Duarte MA et al. (2012) Variability of physicochemical properties of an epoxy resin sealer taken from different parts of the same tube. *International Endodontic Journal* **45**, 915–20.

Belal F, El-Kerdawy MM, El-Ashry SM, El-Wasseef DR (2000) Kinetic spectrophotometric determination of ampicillin and amoxicillin in dosage forms, *Farmaco* **55**, 680–686.

Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, et al. (2009) The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *Journal of Endodontics* **4**, 550–4.

Brackett MG, Martin R, Sword J, et al. (2006) Comparison of seal after obturation techniques using a polydimethylsiloxane-based root canal sealer *Journal of Endodontics* **32**, 1188–90.

Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH (2008) Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* **41**, 873–82.

Cobankara FK, Altinöz HC, Ergani O, Kav K, Belli S (2004) In vitro antibacterial activities of root-canal sealers by using two different methods. *Journal of Endodontics* **30**, 57-60.

Duarte MA, Demarchi AC, Giaxa MH, Kuga MC, Fraga SC, de Souza LC (2000) Evaluation of pH and calcium ion release of three root canal sealers. *Journal of Endodontics* **26**, 389–90.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D (2002) Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontic*

Journal **35**, 221–8.

Guiotti FA, Kuga MC, Duarte MA, Sant'Anna AJ, Faria G (2014) Effect of calcium hydroxide dressing on push-out bond strength of endodontic sealers to root canal dentin. *Brazilian Oral Research* **28**, 1.

Grossman LI (1976) Physical properties of root canal cements. *Journal of Endodontics* **2**, 166-75.

Groosman L (1980) Antimicrobial effect of root canal cements. *Journal of Endodontics* **6**, 594–7.

Hoelscher AA, Bahcall JK, Maki JS (2006) In vitro evaluation of the antimicrobial effects of a root canal sealer-antibiotic combination against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* **32**, 145-7.

Hancock 3rd HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J (2001) Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* **91**, 579–86.

Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC (2002) Cytotoxicity of resin, zinc oxide-eugenol, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cell and permanent V79 cells. *International Endodontic Journal* **35**, 153–8.

International Organization for Standardization. ISO 6876: Dentistry — root canal sealing materials. London: British Standards Institution; 2012.

Marín-Bauza GA, Silva-Sousa YT, da Cunha SA, Rached-Junior FJ, Bonetti-Filho I, Sousa-Neto MD, Miranda CE. (2012) Physicochemical properties of endodontic sealers of different bases. *Journal of Applied Oral Science* **4**, 455-61.

Massi S, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Duarte MA, Grizzo LT, Buzalaf MA, Guerreiro-Tanomaru JM (2011) pH, calcium ion release, and setting time of an experimental mineral trioxide aggregate-based root canal sealer. *Journal of Endodontics* **37**, 844-6.

Nair PN, Henry S, Cano V, et al (2005) Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics* **99**, 231–52.

Ørstavik D (1988) Endodontic materials. *Advances in Dental Research* **2**, 12-24.

Ozbek SM, Ozbek A, Erdorgan AS (2009) Analysis of *Enterococcus faecalis* in samples from Turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR SYBR green method. *Journal of Applied Oral Science* **17**, 370–4.

Pizzo G, Giammanco GM, Cumbo E, Nicolosi G, Gallina G (2006) In vitro

antibacterial activity of endodontic sealers. *Journal of Dentistry* **1**, 35-40.

Razmi H, Ashofteh Yazdi K, Jabalameli F, Parvizi S (2008) Antimicrobial Effects of AH26 Sealer/Antibiotic Combinations Against *Enterococcus Faecalis*. *Iranian Endodontics Journal* **3**, 103-108.

Rôças IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira Jr JF (2004) Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root- filled teeth in a South Korean population. *Journal of Endodontics* **30**, 504–8.

Rôças IN, Siqueira Jr JF, Santos KR (2004) Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *Journal of Endodontics* **30**, 315–20.

Rôças IN, Lima KC, Siqueira JF Jr (2013) Reduction in bacterial counts in infected root canals after rotary or hand nickel-titanium instrumentation--a clinical study. *International Endodontics Journal* **46**, 681-7.

Siqueira Jr JF, Rocas IN (2004) Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodon- tic treatment. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology* **97**, 85–94.

Siqueira JF Jr, Rôças IN (2008) Clinical implications and microbiology of bacterial persis- tence after treatment procedures. *Journal of Endodontics* **34**, 1291–301.

Siqueira Jr JF, Rôças IN (2009) Diversity of endodontic microbiota revisited. *Journal of Dental Research* **88**, 969–81.

Stuart CH, Schwartz SA ,Beeson TJ, Owatz CB (2006) *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics* **32**,93–8.

Tuzuner T, Kusgoz A, Er K, et al. (2011)Antibacterial activity and physical properties of conventional glass-ionomer cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixtures. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* **23**, 46–55.

Viapiana R, Flumignan DL, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J, Tanomaru-Filho M (2014) Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *International Endodontics Journal* **47**, 437-48.

Yagiela JA, Neidle EA, Dowd FJ. Farmacologia e terapêutica para dentistas. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.

Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M (2009) Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* **35**, 1051-5.

Wang Z, Shen Y, Haapasalo M (2014) Dental materials with antibiofilm properties. *Dental Materials* **2**, e1-16.

5 Considerações

Finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A incorporação de amoxicilina na concentração de 10% do peso total do AH Plus e do Sealapex não causou efeitos tóxicos nos fibroblasto L929. Porém o escoamento deste cimentos ficaram fora da norma ISO nº 6876 (2012) e houve diminuição do tempo de presa. A análise do escoamento e do tempo de presa mostrou que a concentração de 1% de amoxicilina permite propriedades física satisfatórias para ambos os cimentos. No entanto, esta concentração não aumentou a atividade antibiofilme.

Estudos adicionais são necessários para avaliar se as concentrações de 2,5% e 5,5% de amoxicilina do peso total do Sealapex, possui propriedade antimicrobiana, já que estas quantidades de antibiótico não alteraram a propriedades físicas deste cimento.

6 Referência

6 REFERÊNCIAS

Baer J, Maki JS. In vitro evaluation of the antimicrobial effect of three endodontic sealers mixed with amoxicillin. *J Endod* 2010;36:1170-3.

Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981;89:321-8.

Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *International Endodontic Journal* 1985;18:35-40.

Cobankara FK, Altinöz HC, Ergani O, Kav K, Belli S. In vitro antibacterial activities of root-canal sealers by using two different methods. *J Endod* 2004;30:57-60.

Donadio M, Jiang J, He J, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Activ GP and Resilon sealers in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:74-8.

Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Möller ÅJR. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of non-key teeth. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1982;90:200-6.

Goodson JD, Lehmann JW, Richter JM, Read JL, Atamian S, Colditz GA. Is upper gastrointestinal radiography necessary in the initial management of uncomplicated dyspepsia? A randomized controlled trial comparing empiric antacid therapy plus patient reassurance with traditional care. *J Gen Intern Med* 1989;4:367-74.

Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *Journal of Dental Research* 1987;66:1375-9.

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

Lana PE, Scelza MF, Silva LE, Mattos-Guaraldi AL, Hirata Júnior R. Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in root canal systems. *Braz Dent J* 2009;20:32-6.

Leonardo M. Tratamento de canais radiculares 4^a ed. São Paulo: Artes Médicas; 2002.

Massi S, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Duarte MA, Grizzo LT, Buzalaf MA, Guerreiro-Tanomaru JM. pH, calcium ion release, and setting time of an experimental mineral trioxide aggregate-based root canal sealer. *J Endod* 2011;37:844-6.

Miranda RG, Santos EB, Souto RM, Gusman H, Colombo AP. Ex vivo antimicrobial efficacy of the EndoVac system plus photodynamic therapy associated with calcium hydroxide against intracanal *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2013;46:499-505.

Mohammadi Z, Abbott PV. On the local applications of antibiotics and antibioticbased agents in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J* 2009;42:555–67.

Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1-7.

Ørstavik D. Endodontic materials. *Adv Dent Res* 1988;2:12-24.

Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endodontics and Dental Traumatology* 1990;6,142 – 9.

Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001;34:429-34.

Peters LB, Wesselink PR. Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. *Int Endod J* 2002;35:660-7.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:100-3.

Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. *J Endod* 2005;31:380-6.

Razmi H, Ashofteh Yazdi K, Jabalameli F, Parvizi S. Antimicrobial Effects of AH26 Sealer/Antibiotic Combinations Against *Enterococcus Faecalis*.. *Iran Endod J* 2008;3:103-108.

Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF Jr. Exuberant Biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case. *J Endod*. 2013 May;39(5):712-8

Rôças IN, Lima KC, Siqueira JF Jr. Reduction in bacterial counts in infected root canals after rotary or hand nickel-titanium instrumentation--a clinical study. *Int Endod J*. 2013 Jul;46(7):681-7.

Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001;34:1-10.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006;32:93-8.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren 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;85:86-93.

Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, Hellwig E, Al-Ahmad A. New Bacterial Composition in Primary and Persistent/Secondary Endodontic Infections with Respect to Clinical and Radiographic Findings. *J Endod* 2013; 1-8.

Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod* 2006;32:715-21.

Yagiela JA, Neidle EA, Dowd FJ. *Farmacologia e terapêutica para dentistas*. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.

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