

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS PUROS E ACRESCIDOS DE ANTIBIÓTICOS CONTRA DUAS LINHAGENS ATCC DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Antibacterial activity of pure endodontic sealers and antibiotic-loaded sealers against two ATCC strains of Enterococcus faecalis

Caroline de Matos Lourenço¹

Rafaela Pignatti de Freitas¹

Thiago Amadei Pegoraro¹

Patrícia Pinto Saraiva¹

Vanessa Raquel Greatti²

Rodrigo Ricci Vivan³

Marco Antonio Hungaro Duarte³

Paulo Henrique Weckwerth¹

¹Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade do Sagrado Coração, Bauru, SP

²Departamento de Fármacos e Medicamentos, Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, SP

³Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, SP

LOURENÇO, Caroline de Matos *et al.* Atividade antibacteriana de cimentos endodônticos puros e acrescidos de antibióticos contra duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*. *SALUSVITA*, Bauru, v. 35, n. 1, p. 9-25, 2016.

RESUMO

Introdução: canais radiculares necrosados e não tratados se caracterizam pela presença de uma microbiota mista e polimicrobiana. O *E. faecalis* demonstra alta resistência a medicamentos usados durante o

Recebido em: 30/01/2016

Aceito em: 04/04/2016

tratamento endodôntico, sendo um dos poucos microrganismos que tem demonstrado *in vitro* resistir ao efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio. Além disso, é a espécie bacteriana mais frequentemente isolada, com prevalência variando entre 29% e 77% nos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico. **Objetivo:** avaliar a atividade antibacteriana dos cimentos endodônticos MTA Fillapex, Sealapex, Sealer 26 e Endofill puros e acrescidos de amoxicilina e ciprofloxacina frente a duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 e ATCC 4083). **Método:** os testes foram realizados pela técnica de difusão radial dos cimentos aplicados diretamente no ágar, impregnados em discos de papel aplicados sobre o ágar e pelo teste de contato direto. Para a análise estatística utilizaram-se os testes de ANOVA e Tukey com nível de significância de 5%. **Resultados e Discussão:** os resultados mostraram que pela técnica da difusão radial, considerando os cimentos puros, o Sealapex foi o único que apresentou halo de inibição frente às duas linhagens. Já, quando da associação da amoxicilina e ciprofloxacina o MTA Fillapex demonstrou os melhores halos de inibição para as duas linhagens. Todos os cimentos tiveram a ação potencializada pela adição dos antibióticos ($p < 0,05$). Pela técnica de difusão dos cimentos impregnados em discos de papel, o cimento Sealapex puro fresco revelou atividade antimicrobiana e também em todas as variáveis de tempo. Quando acrescidos os antibióticos, todos os cimentos tiveram a ação antimicrobiana potencializada pelas drogas, em todas as variáveis de tempo. Este mesmo resultado foi observado na técnica do contato direto dos cimentos com ambas as linhagens. **Conclusão:** a atividade antibacteriana, frente ao *E. faecalis*, dos cimentos MTA Fillapex, Endofill, Sealer e Sealapex acrescidos os antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina, é potencializada mesmo após um longo período da presa dos cimentos.

Palavras-chave: Cimentos obturadores. Antibióticos. Cimentos-antibióticos. Atividade antibacteriana. *Enterococcus faecalis*.

ABSTRACT

Introduction: necrotic root canals and untreated are characterized by the presence of a mixed and polymicrobial flora. *E. faecalis* show high resistance to drugs used during endodontic treatment, one of the few microorganisms which have shown *in vitro* to resist the antibacterial effect of calcium hydroxide. Furthermore, it is the bacterial species most often isolated, with a prevalence ranging between 29% and

LOURENÇO, Caroline de Matos *et al.* Atividade antibacteriana de cimentos endodônticos puros e acrescidos de antibióticos contra duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*. *SALUSVITA*, Bauru, v. 35, n. 1, p. 9-25, 2016.

LOURENÇO, Caroline de Matos et al. Atividade antibacteriana de cimentos endodônticos puros e acrescidos de antibióticos contra duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*. SALUSVITA, Bauru, v. 35, n. 1, p. 9-25, 2016.

77%, in root canals of teeth with endodontic failure. **Objective:** the aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of the sealers MTA Fillapex, Sealapex, Sealer 26 and Endofill, pure and loaded with amoxicillin and ciprofloxacin against two ATCC strains of *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 and ATCC 4083). **Method:** the tests were conducted by means of radial diffusion technique of the cement applied in to the agar, impregnated paper discs applied on the agar and by the direct contact test. For the statistical analysis, the ANOVA and the Tukey's test were used at a 5% significance level. **Results and Discussion:** results showed that, through the technique of radial diffusion, regarding the pure cements, the Sealapex was the only one that showed inhibition halo for the two strains. However, considering the association of amoxicillin and ciprofloxacin Fillapex, the MTA showed better inhibition zones for the two strains. All cements had their actions enhanced by with addition of antibiotics ($p < 0.05$). Through the technique of diffusion of cements impregnated in paper discs, the Sealapex pure fresh cement revealed an antimicrobial activity and also in all the variables of time. When loaded with antibiotics, all cements had the antimicrobial action potentiated by drugs in all variables of time. The same result was observed in the technique of direct contact of cement with both strains. **Conclusion:** the antibacterial activity against the *E. faecalis*, of the cements MTA Fillapex, Endofill, Sealer and Sealapex loaded with the antibiotics amoxicillin and ciprofloxacin, is enhanced even after a long period of use of cements.

Keywords: Root canal filling materials. Antibiotics. Antibiotics-Cement. Antibacterial activity. *Enterococcus faecalis*.

INTRODUÇÃO

O resultado do tratamento endodôntico é determinado clinicamente pelo acompanhamento radiográfico, cujo surgimento, persistência ou aumento de uma lesão periapical passa a ser um importante indicativo de insucesso, assim como a persistência ou o aparecimento de sinais e sintomas do dente tratado endodonticamente (SIQUEIRA et al., 2002).

Estudos têm demonstrado que a infecção de canais radiculares necrosados e não tratados se caracteriza pela presença de uma microbiota mista e polimicrobiana, comumente em combinações de quatro a sete espécies, predominantemente anaeróbias estritas, com relativo equilíbrio entre bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus* e *Eubacterium* são frequentemente cultivadas de canais radiculares infectados (PINHEIRO *et al.*, 2003).

O *E. faecalis* demonstra alta resistência a medicamentos usados durante o tratamento endodôntico, sendo um dos poucos microrganismos que tem demonstrado *in vitro* resistir ao efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio (WEIGER *et al.*, 1995, EVANS *et al.*, 2002). Além disso, é a espécie bacteriana mais frequentemente isolada, com prevalência variando entre 29% e 77% nos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico (ROÇAS *et al.*, 2003).

O controle antimicrobiano do canal radicular é delegado à sanificação na fase do preparo biomecânico. Embora significativa redução de microrganismos tenha sido observada após a conclusão da limpeza e da modelagem dos canais, alguns trabalhos demonstraram a necessidade da medicação intracanal entre sessões, com o objetivo de potencializar o processo de sanificação do sistema de canais radiculares (ESTRELA *et al.*, 1994). A medicação intracanal mais utilizada é a pasta de hidróxido de cálcio (ESTRELA *et al.*, 1994). Entretanto, mesmo com a utilização do curativo de demora, é impossível a completa eliminação de microrganismos do sistema de canais radiculares (NAIR *et al.*, 2005; NAIR, 2006; KIEVIT e IGLEWSKI, 2000). Com base nessas evidências, parece oportuno afirmar que a presença de microrganismos após o término do tratamento endodôntico pode não conduzir o mesmo ao fracasso, porém, certamente a ausência daqueles favorece o sucesso (SIQUEIRA *et al.*, 2002).

Desta forma, é importante que os materiais obturadores possuam atividade antibacteriana direta, preferivelmente, temporária para, se possível, eliminar os microrganismos que tenham permanecido nas ramificações e túbulos dentinários. Fisicamente, os materiais obturadores, também, podem exercer atividade antibacteriana ao preencherem todos os espaços do sistema de canais radiculares, durante a obturação, provocando, inclusive, o confinamento dos microrganismos remanescentes, no interior dos túbulos dentinários.

A adição de antibióticos aos cimentos pode aumentar seus efeitos antimicrobianos, o que levaria a uma importante redução da concentração de microrganismos, de extrema importância para favorecer a resposta do hospedeiro (HOELSCHER *et al.*, 2006; BAER e MAKI, 2010).

Na literatura não foram encontrados trabalhos acerca da associação de antibióticos aos cimentos Sealer 26, Sealapex, Endofill e FillApex.

Sabendo-se da importância do *Enterococcus faecalis* nas infecções endodônticas e da sua correlação com o fracasso do tratamen-

LOURENÇO, Caroline de Matos *et al.* Atividade antibacteriana de cimentos endodônticos puros e acrescidos de antibióticos contra duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*. *SALUSVITA*, Bauru, v. 35, n. 1, p. 9-25, 2016.

LOURENÇO, Caroline de Matos *et al.* Atividade antibacteriana de cimentos endodônticos puros e acrescidos de antibióticos contra duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*. *SALUSVITA*, Bauru, v. 35, n. 1, p. 9-25, 2016.

to endodôntico e, em virtude da ausência de trabalhos na literatura, o objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* o efeito antimicrobiano sobre diferentes linhagens padrão ATCC de *E. faecalis* da adição dos antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina a vários cimentos endodônticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Avaliação antibacteriana dos cimentos puros e acrescidos dos antibióticos

Avaliação pelo método da difusão radial dos cimentos puros e acrescidos dos antibióticos

Para se avaliar a atividade antibacteriana dos cimentos puros e acrescidos dos antibióticos, foi utilizada a técnica de difusão radial das substâncias sobre a superfície de placas de ágar BHI (Brain Heart ágar Merck®) por duas metodologias diferentes: técnica dos poços escavados sobre ágar e preenchidos com os cimentos frescos, imediatamente após a espatulação e técnica dos discos de papel impregnados com os cimentos, em diferentes variáveis de tempo.

Técnica dos poços escavados sobre o ágar e preenchidos com os cimentos frescos

Duas linhagens de *E. faecalis*, uma ATCC 29212 e outra ATCC 4083, foram ativadas sobre a superfície de Brain Heart ágar (Merck®) a 37°C, por 24 a 48 horas.

A partir dessas placas, 5 colônias foram transferidas para um tubo contendo 5 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion Merck®) que foi incubado a 37°C “overnight”. Após o crescimento, foi preparado em solução salina estéril o ajuste para a densidade ótica do padrão de turbidez da escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias mL⁻¹). Placas de Petri de 150 x 10 mm, previamente preparadas com ágar BHI (Merck®) na espessura de 6 mm, foram escavadas em poços com 5 mm de diâmetro por 3 mm de profundidade. Uma vez ajustada à densidade do inóculo, a semeadura foi feita por meio de zaragatoa de algodão estéril na superfície das placas, tomando cuidado de não semear o interior das escavações. As placas foram, então, colocadas em estufa por 30 minutos para secagem da superfície do meio de cultura antes da colocação dos cimentos. Os seguintes cimentos foram utilizados nos testes: MTA Fillapex, Sealapex, Sealer 26 e Endofill, sendo utilizados puros e acrescidos dos

seguintes antibióticos: amoxicilina e ciprofloxacina. Após a espatulação dos cimentos puros ou com as drogas antibióticas, na proporção de 0,5% do peso total dos cimentos, os poços foram preenchidos por meio de seringas e as placas foram deixadas durante 2 horas em temperatura ambiente para pré-incubação. Após, foram incubadas em estufa a 37°C, sob condições atmosféricas adequadas, por 24 horas. Os halos de inibição foram mensurados com auxílio de um paquímetro digital sob luz refletida. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

LOURENÇO, Caroline de Matos *et al.* Atividade antibacteriana de cimentos endodônticos puros e acrescidos de antibióticos contra duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*. *SALUSVITA*, Bauru, v. 35, n. 1, p. 9-25, 2016.

Tabela 1 - Cimentos endodônticos, suas composições e seus fabricantes.

Material	Composição	Fabricante
MTA Fillapex	Resina salicilato, resina diluente, sílica nanoparticulada, óxido de bismuto, trióxido mineral agregado, pigmentos	Angelus, Londrina, PR, Brasil
Sealer 26	Pó: trióxido de bismuto, hidróxido de cálcio, hexametileno tetramina, dióxido de titânio Líquido: epóxi bisfenol	Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil
Endofill	Pó: óxido de zinco, resina hidrogenada, subcarbonato de bismuto, sulfato de bário, borato de sódio Líquido: eugenol e óleo de amêndoas	Desntsply, Petrópolis, RJ, Brasil
Sealapex	Óxido de cálcio: 20%, trióxido de bismuto: 29%, óxido de zinco: 2,5%, partículas de silício: 3%, dióxido de titânio: 2%, estearato de zinco: 1%, fosfato tricálcio: 3%, mixer de salicilato de isobutila + salicilato de metileno de metila + pigmento: 29%.	SybronEndo, Glendora, CA, USA

Técnica dos discos de papel impregnados com os cimentos

Duas linhagens de *E. faecalis*, uma ATCC 29212 e outra ATCC 4083, foram ativadas sobre a superfície de Brain Heart ágar (Merck®) a 37°C, por 24 a 48 horas.

A partir dessas placas, 5 colônias foram transferidas para um tubo contendo 5 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion Merck®) que foi incubado a 37°C “overnight”. A partir do crescimento, foi preparado em solução salina estéril o ajuste para a densidade ótica do padrão de turbidez da escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias mL⁻¹). Placas de Petri de 150

LOURENÇO, Caroline de Matos *et al.* Atividade antibacteriana de cimentos endodônticos puros e acrescidos de antibióticos contra duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*. *SALUSVITA*, Bauru, v. 35, n. 1, p. 9-25, 2016.

x 10 mm foram previamente preparadas com ágar BHI (Merck®) com espessura de 6 mm de ágar. Uma vez ajustada à densidade do inóculo, a semeadura foi feita por meio de zaragatoa de algodão estéril na superfície das placas. As placas foram colocadas em estufa por 30 minutos para secagem da superfície do meio. Discos de papel estéreis de elevada gramatura foram impregnados com as combinações de cimento-antibiótico e somente com cimentos, conforme descrito na metodologia dos poços escavados. Após a impregnação, os discos foram colocados diretamente sobre a superfície do ágar com uma discreta pressão para que aderissem ao meio de cultura. Após, foram incubadas em estufa a 37°C, sob condições atmosféricas adequadas, por 24 horas. Os halos de inibição foram mensurados com auxílio de um paquímetro digital sob luz refletida. Discos impregnados com os cimentos em estudo foram mantidos numa câmara úmida em ambiente estéril por 24 horas e por 7, 15 e 60 dias para nova realização dos testes. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

Avaliação pelo método do contato direto da bactéria com os cimentos puros e acrescidos dos antibióticos

Técnica do teste de contato direto entre cimentos puros e acrescidos dos antibióticos com a bactéria

Três tubos de Ependorf estéreis de 0,5 mL foram utilizados para o teste de contato direto para cada cimento. Todos os cimentos foram manipulados de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizados os cimentos puros e os cimentos acrescidos de 0,5% do peso total com os antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina. Cinco milímetros da base dos tubos de Ependorf tiveram suas paredes internas totalmente revestidas com os cimentos manipulados. Cada tubo recebeu o mesmo volume de cimento. As variáveis de tempo utilizadas foram baseadas no momento do teste, após a manipulação dos cimentos. Foram assim distribuídas: até 20 minutos, cimentos recentemente preparados (frescos), 24 horas e 7, 15 e 60 dias. Os tubos de Ependorf contendo os cimentos a serem testados nos tempos mais tardios (24 h e 7, 15 e 60 dias) permaneceram armazenados em câmara úmida, a 37°C, até o momento da realização dos testes.

Um volume de 10 microlitros da suspensão bacteriana de cada linhagem contendo $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias mL⁻¹ foi cuidadosamente inoculado nas superfícies de todos os cimentos, para todas as variáveis de tempo. Uma suspensão bacteriana foi inoculada em um tubo não revestido com cimento e serviu como con-

trole. Os tubos foram incubados em câmara úmida a 37°C, por 24 horas. Após, 150 microlitros de caldo BHI foi adicionado em cada tubo revestido, que foi suavemente agitado por 1 minuto com pipeta automática. Após a agitação, 100 microlitros da suspensão de contato foram diluídos em diluições decimais até 10⁻⁴ em caldo BHI. Após, de cada diluição decimal foram transferidos 20 microlitros para a superfície de placas com BHI Agar, semeadas por espalhamento com alça de drigalski e incubadas a 37°C, por 24 horas. As colônias sobre a superfície das placas foram contadas e o valor do crescimento bacteriano, que foi dado em Unidades Formadoras de Colônias mL⁻¹ (UFC mL⁻¹), foi calculado. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

Análise estatística

Os resultados da susceptibilidade bacteriana aos cimentos, obtidos com as diferentes técnicas, foram comparados utilizando-se o teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para comparação múltipla entre os resultados (ESTRELA, 2005).

RESULTADOS

Avaliação pela técnica dos poços escavados sobre o ágar e preenchidos com os cimentos frente à linhagem ATCC 29212

Frente à linhagem *ATCC 29212*, utilizando os cimentos puros, somente Sealapex demonstrou pequeno halo de inibição com média de 7 mm. Quando do acréscimo de amoxicilina e ciprofloxacina aos cimentos, MTA Fillapex associado à amoxicilina demonstrou os melhores halos de inibição (tabela 2).

Tabela 2 - Avaliação pela técnica da difusão dos cimentos frescos puros e acrescidos dos antibióticos sobre poços escavados na superfície do Brain Heart ágar frente à linhagem ATCC 29212 (medidas feitas pela média em mm de halo de inibição, após 24h)

	Puros	Cimento + Amoxicilina	Cimento + Ciprofloxacina
MTA Fillapex	0	30	26
Endofill	0	27,33	21,67
Sealer	0	25,33	25,33
Sealapex	7	12,67	25,67

LOURENÇO, Caroline de Matos *et al.* Atividade antibacteriana de cimentos endodônticos puros e acrescidos de antibióticos contra duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*. *SALUSVITA*, Bauru, v. 35, n. 1, p. 9-25, 2016.

LOURENÇO, Caroline de Matos *et al.* Atividade antibacteriana de cimentos endodônticos puros e acrescidos de antibióticos contra duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*. *SALUSVITA*, Bauru, v. 35, n. 1, p. 9-25, 2016.

Avaliação pela técnica dos poços escavados sobre o ágar e preenchidos com os cimentos, frente à linhagem ATCC 4083

Frente à linhagem *ATCC 4083* utilizando os cimentos puros frescos, somente Sealapex demonstrou pequeno halo de inibição com média de 8 mm. Quando do acréscimo de amoxicilina e ciprofloxacina aos cimentos, MTA Fillapex acrescido da amoxicilina demonstrou os melhores halos de inibição (tabela 3).

Tabela 3 - Avaliação pela técnica da difusão dos cimentos frescos puros e acrescidos dos antibióticos sobre poços escavados na superfície do Brain Heart ágar frente à linhagem ATCC 4083 (medidas feitas pela média em mm de halo de inibição, após 24h)

	Puros	Cimento + Amoxicilina	Cimento + Ciprofloxacina
MTA Fillapex	0	36	27
Endofill	0	30	25,33
Sealer	0	14,33	27
Sealapex	8	34,67	26,67

Avaliação pela técnica dos discos de papel impregnados com os cimentos frente à linhagem ATCC 29212 em diferentes variáveis de tempo

Para os cimentos puros frescos somente Sealapex demonstrou halo de inibição frente à linhagem *ATCC 29212* ($p < 0,05$). Quando acrescidos dos antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina, todos os cimentos frescos foram potencializados pela ação das drogas, bem como, em todas as variáveis de tempo. Os resultados apresentados pelos cimentos MTA Fillapex, Endofill e Sealer acrescidos da amoxicilina não mostraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), conforme dados da tabela 4. Na variável de 24 h, o MTA Fillapex+ amoxicilina também se apresentou mais eficiente, em relação aos outros cimentos ($p < 0,05$). Na variável 7 dias, Sealapex+amoxicilina demonstrou melhor desempenho em relação aos outros cimentos ($p < 0,05$). Na variável de 15 dias, Endofill e Sealapex acrescidos da amoxicilina, demonstraram melhor desempenho que os outros cimentos ($p < 0,05$), sendo que os mesmos se mostraram iguais, estatisticamente, na variável de 60 dias ($p < 0,05$). Em relação ao acréscimo da ciprofloxacina aos cimentos frescos, MTA Fillapex, Endofill e Sealapex, demonstraram desempenho semelhante ($p < 0,05$), o mesmo acontecendo quando da variável 24 horas. Nas variáveis de 7 e 15 dias, a análise estatística demonstrou que os cimentos MTA Fillapex, Endofill e Sealapex, mostraram desempenho semelhante ($p < 0,05$). Na variável de 60 dias, MTA Fillapex e Sealapex demonstraram desempenho semelhante.

Tabela 4 - Avaliação pela técnica da difusão dos cimentos puros e acrescidos dos antibióticos, impregnados em discos de papel na superfície do Brain Heart ágar frente a linhagem ATCC 29212, sob diferentes variáveis de tempo (medidas feitas pela média em mm de halo de inibição)

	Cimentos puros					Cimento + Amoxicilina					Cimento + Ciprofloxacina				
	Fresco	24h	7dd	15dd	60dd	Fresco	24h	7dd	15dd	60dd	Fresco	24h	7dd	15dd	60dd
MTA Fillapex	0	0	0	0	0	29,67	30	30,33	29,33	29,33	25,67	25	25,67	24,33	24,67
Endofill	0	0	0	0	0	27,33	26,67	35	40	36	21,67	20,67	25	26	25
Sealer	0	0	0	0	0	25,33	25,33	30	32	26,67	25	25	17,67	23	19,67
Sealapex	7	6,67	6,33	6,33	6	13	14,33	40	40	40	25,67	24,33	25	27	25,67

Avaliação pela técnica dos discos de papel impregnados com os cimentos frente à linhagem ATCC 4083, em diferentes variáveis de tempo

Considerando os cimentos puros frescos, somente Sealapex revelou halo de inibição frente à linhagem *ATCC 4083*. Quando acrescidos dos antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina, todos os cimentos apresentaram efeito antibacteriano, em todas as variáveis de tempo (tabela 5). O cimento Sealapex teve seu efeito potencializado. Os cimentos MTA Fillapex, Endofill e Sealapex acrescidos da amoxicilina não mostraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), conforme dados da tabela 5, o mesmo acontecendo na variável de 24 horas. Na variável de 7 dias, Sealapex + amoxicilina apresentou melhor desempenho, em relação aos outros cimentos ($p < 0,05$), não ocorrendo diferença entre Endofill e Sealer. Nas variáveis de 15 dias e 60 dias, Sealapex+amoxicilina revelou grande eficiência, sendo estatisticamente significativa, em relação aos outros cimentos. Acrescido da ciprofloxacina, MTA fillapex fresco revelou melhor atividade antimicrobiana, o mesmo ocorrendo em 24 horas. Na variável de 7 dias, MTA Fillapex e Sealapex acrescidos da ciprofloxacina demonstraram eficiência semelhante ($p > 0,05$). Nas variáveis de 15 e 60 dias, Sealapex+ciprofloxacina demonstrou melhor desempenho em relação aos outros cimentos ($p < 0,05$).

Tabela 5 - Avaliação pela técnica da difusão dos cimentos puros e associados aos antibióticos impregnados em discos de papel na superfície do Brain Heart ágar frente a linhagem ATCC 4083 sob diferentes variáveis de tempo (medidas feitas pela média em mm de halo de inibição)

	Cimentos puros					Cimento + Amoxicilina					Cimento + Ciprofloxacina				
	Fresco	24h	7dd	15dd	60dd	Fresco	24h	7dd	15dd	60dd	Fresco	24h	7dd	15dd	60dd
MTA Fillapex	0	0	0	0	0	29,67	30	30,33	30	29,33	26,67	27	26	26	26,33
Endofill	0	0	0	0	0	30	29,33	25	30	26	25	24,67	24	27	23,33
Sealer	0	0	0	0	0	14,33	14,67	24,67	30	26	25	24,67	17	21,67	19,67
Sealapex	7,67	7,33	7,33	7	7	29,67	30	36	38,33	33,67	24,67	24,67	26	29,33	29

LOURENÇO, Caroline de Matos *et al.* Atividade antibacteriana de cimentos endodônticos puros e acrescidos de antibióticos contra duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*. *SALUSVITA*, Bauru, v. 35, n. 1, p. 9-25, 2016.

Avaliação pela técnica do teste de contato direto entre cimentos puros e acrescidos com antibióticos frente à linhagem ATCC 29212

A análise com os cimentos MTA Fillapex, Endofill e Sealer puros permitiram crescimento de grande número de Unidades Formadoras de Colônias/mL⁻¹. Sealapex puro e acrescido dos antibióticos inibiu totalmente a linhagem em estudo, em todas as variáveis de tempo. Somente o cimento Endofill acrescido da amoxicilina demonstrou contagem de colônias em número de 35.000 e 80.000, nas variáveis de tempo de 15 e 60 dias, respectivamente. Todos os cimentos acrescidos da ciprofloxacina não permitiram contagem de colônias em todas variáveis de tempo (tabela 6).

Tabela 6 - Avaliação pela técnica do contato direto dos cimentos puros e acrescidos dos antibióticos com a linhagem ATCC 29212, sob diferentes variáveis de tempo (valores em Unidades Formadoras de Colônias/mL⁻¹)

	Cimentos puros					Cimento + Amoxicilina					Cimento + Ciprofloxacina				
	Fresco	24h	7dd	15dd	60dd	Fresco	24h	7dd	15dd	60dd	Fresco	24h	7dd	15dd	60dd
MTA Fillapex	330.000	330.000	330.000	350.000	370.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Endofill	320.000	320.000	330.000	160.000	350.000	0	0	0	35.000	80.000	0	0	0	0	0
Sealer	350.000	350.000	370.000	370.000	390.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sealapex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Avaliação pela técnica do teste de contato direto entre cimentos puros e acrescidos de antibióticos frente à linhagem ATCC 4083

A análise com os cimentos MTA Fillapex, Endofill e Sealer puros permitiram crescimento de grande número de Unidades Formadoras de Colônias/mL⁻¹. Sealapex puro e acrescido dos antibióticos inibiu totalmente a linhagem *ATCC 4083* em todas as variáveis de tempo. Somente o cimento Endofill acrescido da amoxicilina revelou contagem de colônias em número de 35.000 e 80.000 nas variáveis de tempo de 15 e 60 dias, respectivamente. Todos os cimentos acrescidos da ciprofloxacina não permitiram contagem de colônias nas variáveis de tempo (tabela 7).

Tabela 7. Avaliação pela técnica do contato direto dos cimentos puros e acrescidos dos antibióticos com a linhagem ATCC 4083, sob diferentes variáveis de tempo (valores em Unidades Formadoras de Colônias/mL⁻¹)

	Cimentos puros					Cimento + Amoxicilina					Cimento + Ciprofloxacina				
	Fresco	24h	7dd	15dd	60dd	Fresco	24h	7dd	15dd	60dd	Fresco	24h	7dd	15dd	60dd
MTA Fillapex	280.000	290.000	300.000	300.000	300.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Endofill	310.000	310.000	300.000	290.000	320.000	0	0	0	40.000	110.000	0	0	0	0	0
Sealer	330.000	320.000	330.000	300.000	290.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sealapex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

DISCUSSÃO

O presente estudo analisou o efeito de cimentos obturadores puros e acrescidos de amoxicilina ou ciprofloxacina, sobre duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*, uma isolada de infecção do canal radicular (ATCC 4083) e outra de infecção urinária (ATCC 29212). *Enterococcus faecalis* é um micro-organismo extensivamente relacionado com insucesso do tratamento endodôntico (SUNDQVIST *et al.*, 1998; PINHEIRO *et al.*, 2003; RÖÇAS *et al.* 2003). Devido à sua alta resistência a medicamentos usados durante o tratamento endodôntico, é um dos poucos micro-organismos que tem demonstrado resistência *in vitro* ao efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio (WEIGER *et al.*, 1995, EVANS *et al.*, 2002). No presente estudo, evidenciou-se discreta sensibilidade aumentada da linhagem ATCC 4083. Vários estudos que avaliaram a atividade antimicrobiana de materiais endodônticos são encontrados na literatura, utilizando a linhagem ATCC 29212 (ÇOBANKARA *et al.*, 2004; ELDENIZ *et al.*, 2006; AL-HEZAIMI *et al.*, 2006; MYAGAK *et al.*, 2006) e outros utilizando outra linhagem denominada ATCC 10541 (LEONARDO *et al.*, 2000; TANOMARU-FILHO *et al.*, 2007;). Nesta pesquisa em que, cimentos endodônticos foram testados puros e acrescidos de antibióticos, parece propício que a utilização de uma linhagem, originalmente, isolada de infecção radicular possa reproduzir resultados fidedignos com a clínica endodôntica.

No presente estudo empregaram-se duas metodologias, sendo a difusão radial uma delas, que é amplamente utilizada nos testes antimicrobianos de materiais endodônticos (ÇOBANKARA *et al.*, 2004; ASGARY & KAMRANI, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2010; ZARRABI *et al.*, 2009; TANOMARU-FILHO *et al.*, 2007; LEONARDO *et al.*, 2000; MIYAGAK *et al.*, 2006, HOELSCHER *et al.*, 2006). No entanto, a mesma apresenta algumas limitações; como a falta de padronização da densidade do inóculo que, geralmente, é feita pela turbidimetria referente à escala 0,5 de Mac Farland, meio de cultura adequado para os testes, viscosidade do ágar, condições de estocagem das placas favorecendo a desidratação e conseqüente baixo desempenho do ágar, número de testes por placa de cultura e tempo e temperatura adequados de incubação (PUMAROLA *et al.*, 1992). Além disso, são testes qualitativos, que revelam somente a sensibilidade da linhagem bacteriana expressa em milímetros de halo de inibição e, assim, não permitem distinguir entre propriedades bactericida e bacteriostática dos materiais testados (TOBIAS, 1988).

O outro teste empregado foi o de contato direto, no qual as bactérias são colocadas em contato direto com os materiais testados,

LOURENÇO, Caroline de Matos *et al.* Atividade antibacteriana de cimentos endodônticos puros e acrescidos de antibióticos contra duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*. SALUSVITA, Bauru, v. 35, n. 1, p. 9-25, 2016.

LOURENÇO, Caroline de Matos *et al.* Atividade antibacteriana de cimentos endodônticos puros e acrescidos de antibióticos contra duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*. *SALUSVITA*, Bauru, v. 35, n. 1, p. 9-25, 2016.

durante determinados períodos de tempo, superando algumas das desvantagens dos testes de difusão sobre ágar. Os testes de contato direto consistem em métodos quantitativos e muito reprodutíveis que simulam o contato da bactéria com cimento endodôntico dentro do canal radicular. Também, permite que os efeitos dos cimentos em vários estágios da reação de presa sobre a viabilidade da bactéria podem ser avaliados (ELDENIZ *et al.*, 2006). O método, também, oferece um melhor controle de fatores interferentes nos testes de difusão e têm sido amplamente utilizados nas pesquisas com materiais endodônticos (ÇOBANKARA *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2009; ELDENIZ *et al.*, 2006; BAER & MAKI, 2010; SLUTZKY-GOLDBERG *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos demonstraram que o cimento Sealapex puro foi o único que revelou alguma atividade antibacteriana frente às duas linhagens de *E. faecalis* testadas, corroborando com os resultados de outros estudos (BODRUMLU e SEMIZ, 2006; YASUDA *et al.*, 2008) e discordando de um outro estudo (MIYAGAK *et al.*, 2006).

O primeiro relato de utilização de cimento acrescido de antibióticos foi descrito por Buchholz e Engelbrecht, em 1970, conforme afirma Klekamp *et al.*, 1999. O interessante desse artifício é a possibilidade de disponibilizar altas doses de antibióticos localmente, com baixa toxicidade sistêmica. Deve-se ressaltar que o sucesso desse procedimento depende do antibiótico utilizado, cuja escolha deve ser guiada pela susceptibilidade dos micro-organismos envolvidos, seja ela empírica ou comprovada (KLEKAMP *et al.*, 1999).

Os resultados deste trabalho demonstraram que a adição dos antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina promoveu um efeito antibacteriano positivo em todos os cimentos. A eficiência de cimentos acrescidos de amoxicilina já foi demonstrada por estudos prévios (HOELSCHER *et al.*, 2006, BAER E MAKI, 2010). Os cimentos acrescidos da ciprofloxacina demonstraram uma eficiência muito próxima entre as variáveis, com pequena variação nos halos de inibição para as duas linhagens testadas. Isto não aconteceu com a adição da amoxicilina, cujos halos de inibição foram discrepantes. A ideia de acrescentar antibióticos aos cimentos parece ser pragmática em sua origem, no entanto, o conceito de utilizar os cimentos como um depósito de antibióticos faz sentido, ao passo que permite a liberação do fármaco diretamente no sítio da iminente infecção (HENDRIKSA *et al.*, 2004).

O MTA Fillapex e o Sealapex demonstraram melhor atividade antibacteriana contra a linhagem 4083. Esta linhagem é originalmente isolada de infecção de canal radicular e parece apresentar resultados mais fidedignos quando este tipo de estudo é realizado.

Os resultados obtidos demonstraram que o cimento Sealapex puro foi o único que demonstrou atividade antibacteriana frente às duas linhagens de *E. faecalis* testadas nas diferentes variáveis de tempo, concordando com outros estudos (BODRUMLU e SEMIZ 2006, YASUDA ET AL., 2008). A adição dos antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina promoveu um efeito antibacteriano positivo em todos os cimentos. Sealapex demonstrou eficiência antibacteriana aumentada nas variáveis de tempo de 7, 15 e 60 dias. Isto, talvez, pelo fato de o cimento favorecer a liberação do antibiótico, mesmo por um longo período após a reação de presa e apresentar maior solubilidade (HOELSCHER *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos revelaram que o cimento Sealapex, tanto puro como acrescido dos antibióticos, foi o único que demonstrou atividade antibacteriana frente às duas linhagens de *E. faecalis* testadas nas diferentes variáveis de tempo. O MTA Fillapex, o Sealer e o Endofill puros não demonstraram ação contra as linhagens estudadas. Entretanto, estes três cimentos apresentaram efeito antibacteriano quando da adição dos antibióticos, em todas as variáveis de tempo ($p < 0,05$). O cimento Endofill permitiu crescimento de unidades formadoras de colônias nas variáveis de 15 e 60 dias para as duas linhagens estudadas.

A adição de ambos os antibióticos estudados, aos cimentos endodônticos testados, fez com que todos apresentassem ação frente às duas linhagens de *E. Faecalis* utilizadas.

A amoxicilina é um antibiótico beta-lactâmico semi-sintético, de amplo espectro, que inibe a síntese da parede celular bacteriana. A ciprofloxacina é uma fluorquinolona, de amplo espectro, que atua na inibição da topo-isomerase bacteriana, impedindo a replicação do DNA da bactéria.

Abbott *et al.*, 1990, relataram que os antibióticos são menos tóxicos para células de mamíferos, em concentrações clínicas adequadas, quando comparados a outras substâncias químicas antissépticas utilizadas durante o preparo biomecânico dos canais.

CONCLUSÃO

Este estudo revelou que quando os cimentos MTA Fillapex, Endofill, Sealer e Sealapex foram acrescidos dos antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina, apresentaram ação antibacteriana contra *E. faecalis* em ensaios *in vitro*. O Sealapex teve sua ação potencializada. Esta ação antibacteriana foi também observada

LOURENÇO, Caroline de Matos *et al.* Atividade antibacteriana de cimentos endodônticos puros e acrescidos de antibióticos contra duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*. *SALUSVITA*, Bauru, v. 35, n. 1, p. 9-25, 2016.

LOURENÇO, Caroline de Matos *et al.* Atividade antibacteriana de cimentos endodônticos puros e acrescidos de antibióticos contra duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*. *SALUSVITA*, Bauru, v. 35, n. 1, p. 9-25, 2016.

nos cimentos frescos, imediatamente após a espatulação, bem como depois de 60 dias. Estudos futuros devem ser delineados para que seja verificada possível interferência da adição dos antibióticos, nas propriedades físico-químicas e biocompatibilidade dos cimentos testados.

REFERÊNCIAS

ABBOTT P.V., HUME W.R., PEARMAN J.W. Antibiotics and endodontics. **Australian Dental J.**, Sydney, v. 35, p. 50–60, 1990.

AL-HEZAIMI, K.; AL-SHALAN, T. A.; NAGHSHBANDI, J.; OGLESBY, S.; SIMON, J. H.; ROTSTEIN, I. Antibacterial Effect of two Mineral Trioxide Aggregate (MTA) Preparations Against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus sanguis* In Vitro. **J Endod.**, New York, v. 32, p. 1053-1056, 2006.

BAER, J.; MAKI, J.S. *In vitro* evaluation of the antimicrobial effect of three endodontic sealers mixed with amoxicillin. **J Endod.**, New York, v. 36, p. 1170-1173, 2010.

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

ÇOBANKARA, F. K.; ALTINÖZ, H. C.; ERGANIS, O.; KAV, K.; BELLİ, S. In Vitro Antibacterial Activities of Root-Canal Sealers By Using Two Different Methods. **J Endod.**, New York, v. 30, p.57-60, 2004.

ELDENİZ, A. U.; HADIMLI, H. H.; ATAOĞLU, H.; ORSTAVIK, D. Antibacterial Effect of Selected Root-End Filling Materials. **J Endod.**, New York, v. 32, p. 345-349, 2006.

ESTRELA, C. et al. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. **J Appl Oral Sci**, Bauru, v. 2, p. 29-36, 1994.

EVANS, D.M. et al. Mechanism involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int Endod J**, Oxford, v. 35, p. 221-8, 2002.

HENDRIKSA, J.G.E.; VAN HORNB, J.R.; VAN DER MEIA, H.C.; BUSSCHER, H.J. Backgrounds of antibiotic-loaded bone cement and prosthesis-related infection. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 25, p. 545-56, 2004.

HOELSCHER, A.A.; BAHCALL, J.K.; MAKI, J.S. *In vitro* evaluation of the antimicrobial effects of a root canal sealer-antibiotic combination against *Enterococcus faecalis*. **J Endod**, New York, v. 32, p. 145-147, 2006.

KIEVIT, T.R.; IGLEWSKI, B.H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. **Infect Immun**, Washington, v. 68, p. 4839-4849, 2000.

KLEKAMP, J.; DAWSON, J. M.; HAAS, D. W.; de BOER, D.; CHRISTIE, M. The use of vancomycin and tobramycin in acrylic bone cement biomechanical effects and elution kinetics for use in joint arthroplasty. **J Arthroplasty**, New York, v. 14, p. 339-46, 1999.

LEONARDO, M. R.; SILVA, L. A. B.; TANOMARU-FILHO, M.; BONIFÁCIO, K. C.; ITO, I. Y. In Vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of Sealers and Pastes Used in Endodontics. **J Endod.**, New York, v. 26, n. 7, p.391-394, 2000.

MIYAGAK, D.C.; CARVALHO, E.M.O.F.; ROBAZZA, C.R.C.; CHAVASCO, J.K.; LEVORATO, G.L. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of endodontic sealers. **Braz Oral Res**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 303-306, 2006.

NAIR, P.N.R.; HENRY, S.; CANO, V. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, New York, v. 99, p. 231-52, 2005.

NAIR, P.N.R. On the causes of persistente apical periodontitis: a review. **Int Endod J**, New York, v. 39, p. 249-81, 2006.

PINHEIRO E.T., GOMES B.P.F.A., FERRAZ C.C.R., TEIXEIRA F.B., ZAIA A.A., SOUZA-FILHO F.J. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 18, 100–3, 2003.

PUMAROLA, J.; BERASTEGUI E., BRAU E., CANALDA C., JIMENEZ DE ANTA M.T. Antimicrobial activity of seven root canal sealers. Results of agar diffusion and agar dilution tests. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, New York, v. 74, 216–20, 1992.

RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F. JR; SANTOS, K.R.N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J Endod**, New York, v. 30, p. 315-20, 2003.

LOURENÇO, Caroline de Matos *et al.* Atividade antibacteriana de cimentos endodônticos puros e acrescidos de antibióticos contra duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*. **SALUSVITA**, Bauru, v. 35, n. 1, p. 9-25, 2016.

LOURENÇO, Caroline de Matos *et al.* Atividade antibacteriana de cimentos endodônticos puros e acrescidos de antibióticos contra duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis*. *SALUSVITA*, Bauru, v. 35, n. 1, p. 9-25, 2016.

SIQUEIRA JR., J. F. Endodontic infections: Concepts, paradigms and perspectives. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, New York, v. 94, p. 281-93, 2002.

SLUTZKY-GOLDBERG, I.; SLUTZKY, H.; SOLOMONOV, M.; MOSHONOV, J.; WEISS, E. I.; MATALON, S. Antibacterial properties of four endodontic sealers. **J Endod.**, New York, vol. 34, n. 6, p. 735-738, 2008.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, New York, v. 85, p. 85-93, 1998.

TANOMARU-FILHO, M.; TANOMARU, J.M.G.; BARROS, D.B.; WATANABE, E.; ITO, I.Y. *In vitro* antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. **J Oral Sci**, Tokyo, v. 49, p. 41-45, 2007.

TOBIAS R.S. Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. **Int Endod J**, New York, v. 21, 155–60, 1988.

ZHANG, H.; PAPPEN, F. G.; HAAPASALO, M. Dentin Enhances the Antibacterial Effect of Mineral Trioxide Aggregate and Bioaggregate. **J Endod.**, New York, v. 35, n. 2, p. 221-224, 2009.

ZARRABI, M.H.; JAVIDI, M.; NADERINASAB, M.; GHARE-CHAHI, M. Comparative evaluation of antimicrobial activity of three cements: new endodontic cement (NEC), mineral trioxide aggregate (MTA) and Portland. **J Oral Sci.**, Tokyo, v. 51, n. 3, p. 437-442, 2009.

WEIGER, R. et al. Microbial flora of sinus tracts and root canals of non-vital teeth. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v. 11, p. 15-19, 1995.

YASUDA, Y.; KAMAGUCHI, A.; SAITO, T. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a new resin-based endodontic sealer against endodontic pathogens. **J Oral Sci**, Tokyo, v. 50, p. 309-313, 2008.