**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

BRUNO CAVALINI CAVENAGO

**O efeito do uso de fitoterápicos e da própolis nas
propriedades físico-químicas, antimicrobiana e
biocompatibilidade do MTA**

**BAURU
2015**

BRUNO CAVALINI CAVENAGO

O efeito do uso de fitoterápicos e da própolis nas propriedades físico-químicas, antimicrobiana e biocompatibilidade do MTA

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas.

Área de concentração: Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte
Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Versão corrigida

BAURU
2015

C315e Cavenago, Bruno Cavalini
O efeito do uso de fitoterápicos e da própolis nas propriedades físico-químicas, antimicrobiana e biocompatibilidade do MTA / Bruno Cavalini Cavenago. – Bauru, 2015.

183 p. : il. ; 30cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte
Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 028/2011
Data: 20/10/2011

Dados Curriculares

Bruno Cavalini Cavenago

Nascimento	27 de dezembro de 1984 Campo Mourão – PR
Filiação	Valdir Varea Cavenago Roseli Cavalini Cavenago
2002 – 2005	Graduação em Odontologia – Centro Universitário de Maringá – Cesumar, Maringá, PR.
2006 – 2006	Curso de Aperfeiçoamento em Endodontia – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista.
2007 – 2008	Curso de Especialização em Endodontia - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
2009 – 2011	Curso de Pós-Graduação, Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração em Endodontia, pela Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
2011 – 2015	Curso de Pós-Graduação, Doutorado em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração em Endodontia, pela Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
Associações	CRO-SP – Conselho Regional de Odontologia do Estado do São Paulo. APCD – Associação Paulista dos Cirurgiões-Dentistas IADR – International Association for Dental Research SBENDO – Sociedade Brasileira de Endodontia. ESE – European Society of Endodontology IADT - International Association of Dental Traumatology

DEDICATÓRIA

À **Deus**, por minha vida repleta de luz e força, sempre abençoada e guiada por caminhos iluminados.

À minha esposa **Leuci Freitas Cavenago**, que me agraciou com seu amor e cumplicidade para ser minha maior companheira, juntos hoje e sempre vamos construindo nossas vidas. Seu amor incondicional e seu apoio irrestrito me fortalecem para superar todas as adversidades.

Aos meus pais **Valdir Varea Cavenago** e **Roseli Cavalini Cavenago**, que por uma vida de amor, dedicação e trabalho, tomaram a minha educação como prioridade e possibilitaram as oportunidades para a realização dos meus sonhos. Exemplos de dignidade, honestidade, humildade e perseverança. Minha eterna gratidão.

À minha irmã **Amanda Cavalini Cavenago**, sempre presente em minha vida agradeço por todo cuidado, carinho e incentivo. É com grande ternura que a tenho no meu coração.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte**, o qual tenho um grande apreço e sinto-me privilegiado por ter a oportunidade de ser seu orientado, aliás temos um vínculo maior que apenas professor e aluno, certamente é um dos meus maiores amigos. O tenho como referência pois considero um profissional completo e diferenciado, sendo tanto um exímio pesquisador quanto um clínico habilidoso, que consegue como poucos aplicar a ciência na prática clínica. Para mim fica o exemplo de professor, na essência da palavra, pois transparece o entusiasmo e o prazer em ensinar, repassando sem restrições seu conhecimento, sendo nítida sua vocação como educador. Agradeço pela confiança e por todas oportunidades concedidas.

Aos professores da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru:

Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan pela amizade e todo incentivo em minha carreira acadêmica, agradeço pela confiança e por conceder tantas oportunidades valiosas. Fico feliz com seu recente ingresso a equipe de professores, que certamente será muito enriquecida, pois é um excelente exemplo de conquista pelo mérito e perseverança.

Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante, que apresenta um vigor admirável, apesar de tudo o que já fez e representa para a Endodontia, está sempre em busca do avanço científico. Nunca hesitou em compartilhar seus conhecimentos.

Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade, sempre gentil e solícita, agradeço por todo empenho e dedicação em me passar valiosos conhecimentos que foram de suma importância para execução da pesquisa e para minha formação.

Prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes, consegue como poucos transmitir seu vasto e profundo conhecimento de maneira simples e objetiva. Admiro sua simplicidade e disposição tanto para ensinar quanto para ouvir, sempre com as palavras certas no conselho amigo. Sou grato pela amizade e confiança.

Prof. Dr. Norberti Bernardineli sempre bem humorado, seus ensinamentos e conselhos faz a Endodontia parecer mais simples. Agradeço pela amizade e por sua constante disponibilidade e atenção.

Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia, apresenta de maneira primorosa a sublime vocação para docência, comprovada por experiência própria durante meu mestrado sob sua orientação. Serei sempre grato por me abrir as portas da pós-graduação.

Aos funcionários do departamento de Endodontia **Andressa Barraviera Tiossi Laureando, Edimauro de Andrade, Neide Leandro e Suely Regina Bettio** pela amizade e convivência harmoniosa durante esses anos, sempre que necessitei nunca mediram esforços em me auxiliar.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet** que contribuiu com seu rico conhecimento, transferido de forma objetiva, muito auxiliou no desenvolvimento da pesquisa e em minha formação acadêmica. Agradeço pela disponibilidade e por ser tão solícito em sanar e esclarecer minhas dúvidas.

Ao **Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth** colega de pós-doutorado e docente da Universidade Sagrado Coração, por fornecer todos os extratos de fitoterápicos utilizados nessa pesquisa. Agradeço pela grande amizade e por todas as dicas e ensinamentos de um profundo conhecedor da microbiologia.

A **Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro** da Universidade Anhanguera de São Paulo que forneceu a própolis utilizada na pesquisa e abriu as portas de seu laboratório para realizar todas as análises necessárias. Agradeço pela receptividade e por compartilhar seu profundo conhecimento.

À todos professores do curso de Pós-Graduação pelos ensinamentos transmitidos através das disciplinas ministradas durante o doutorado.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru **Erasmu Gonçalves da Silva, Elias, Luiz Carlos da Silva e Richard Nelson Guanaes Simões** pelas orientações quanto ao manejo e pelo desvelo que tiveram com os animais utilizados nessa pesquisa.

Aos funcionários da disciplina de Histologia, **Danielle Santi Ceolin, Patrícia de Sá Mortágua Germino e Tania Mary Cestari** pela atenção e dedicação quanto aos procedimentos histotécnicos.

Aos funcionários da disciplina de Bioquímica, **Aline Leite, Larissa Tercilia Grizzo, Ovídio dos Santos Sobrinho e Thelma Lopes Silva** pelo auxílio com as análises químicas dos cimentos e com o preparo das amostras biológicas para análise molecular, disponibilizando todos os equipamentos necessários.

Aos funcionários da disciplina de Microbiologia, especialmente **André Luis da Silva** pelo auxílio e cordialidade.

Aos funcionários do Centro Integrado de Pesquisas da Faculdade de Odontologia de Bauru, pela atenção e disponibilidade para ajudar em procedimentos importantes da pesquisa realizada.

À **Ms. Márcia Sirlene Zardin Graeff** pela amizade e simpatia que transformaram, de forma amena, horas de trabalho em momentos produtivos.

Aos funcionários da disciplina de Farmacologia, especialmente **Thiago José Dionísio** pelo empenho e paciência durante a execução das análises moleculares.

Aos funcionários da Pós-Graduação e Biblioteca, **Giane Tenorio Quintela, Margareth Mokarzel, Fatima Carvalho, Ana Leticia Momesso, Rita Paglione, Maristela Ferrari e Maria Helena Ronchesel** pela cordialidade e eficiência na prestação de informações e auxílios.

Aos queridos amigos de pós-graduação:

Aldo Enrique Del Carpio Perochena pela grande amizade e parceria de longa data, essa boa amizade levarei para vida toda, independentemente dos nossos rumos. Com convivência diária e por todos os momentos passo a tê-lo como irmão.

Ronald Ordinola Zapata também é uma grande amizade que pude construir, considero como irmão que muito se dedicou a me ajudar e ensinar de maneira irrestrita o que sabe de melhor. Minha formação deve muito a parceria nos muitos trabalhos realizados.

Pablo Andrés Amoroso Silva pela convivência harmoniosa tornou-se um amigo pelo qual tenho grande apreço e confiança.

Marina Angélica Marciano da Silva, Paloma Gagliardi Minotti e Raquel Zanin Midená pela amizade e companheirismo, também agradeço pela horas de biotério dedicadas em meu auxílio, aprendi muito trabalhando com vocês e desejo sinceramente sucesso a todas.

Marcelo Haas Villas Bôas, Clarissa Teles Rodrigues e Thais Vieira Rizzo Nunes da Cunha pela amizade desde o mestrado e apoio para aprendizado mútuo, com incontáveis momentos agradáveis.

Samuel Lucas Fernandes e Murilo Priori Alcalde amigos dedicados sempre dispostos a me ajudar, os quais certamente terão um futuro brilhante.

Amanda Maliza, Bruno Guimarães, Bruno Piazza, Denise Oda, Francine Cesario, Jussaro Duque, Layla Vasconcelos, Lincoln Fruchi, Marcela Arias, Marcela Milanezi, Marcelo Vitoriano, Rafaela Zancan, Sávio Brands, Talita Tartari e Thais Pereira pela excelente convivência durante esse período de pós-graduação. Vejo em cada um futuro promissor, certamente a Endodontia brasileira estará repleta de grandes profissionais.

Camila Lopes Cardoso pela disponibilidade e dedicação em auxiliar nos procedimentos cirúrgicos realizados no biotério.

Cláudia Cristina Bigueti pela dedicação e paciência em ensinar a realizar as análises histológicas.

Ana Carolina Morandini pelo desprendimento e paciência em auxiliar nas análises moleculares.

Arnaldo Sant'Anna Júnior, Christian Giampietro Brandão, Járcio Baldi e Ricardo Affonso Bernardes pós-graduandos egressos com os quais tenho grande amizade e consideração, adquiri muito conhecimento por permitirem participar de suas respectivas pesquisas.

E a todas pessoas que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa da Diretora **Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa do Presidente, **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação, na área de concentração em Endodontia, **Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte**.

Ao Centro Integrado de Pesquisas da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira**.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de estudo (processo nº 2011/18272-1), este apoio financeiro possibilitou a realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo durante meu primeiro semestre de doutorado.

Ao Programa Pró-Aluno – Capes, pelo auxílio quanto à disponibilização financeira para impressões de pôsteres para apresentações deste trabalho em encontros científicos nacionais e internacionais.

"Nós somos o que fazemos repetidas vezes. Portanto, a excelência não é um ato, mas um hábito."

Aristóteles

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades físico-químicas, antimicrobianas e biocompatibilidade do MTA branco manipulado com extratos aquoso e/ou em propilenoglicol da *Arctium lappa* L., *Casearia sylvestris* Sw. e própolis. Dentre os testes físico-químicos foram avaliados o tempo de presa, escoamento, pH, liberação de íons cálcio e alteração volumétrica. Para verificar o efeito antimicrobiano foram aplicadas as metodologias do contato direto (*Enterococcus faecalis* e a *Cândida albicans*) e da descontaminação dentinária, empregando a microscopia confocal de varredura laser para verificar a viabilidade de *Enterococcus faecalis*. Para a avaliação da biocompatibilidade, 162 ratos Wistar foram utilizados, onde cada animal recebeu dois implantes subcutâneos e um alveolar. Após os períodos experimentais de 15, 30 e 60 dias foram realizadas análises microtomográfica, histológica descritiva e histomorfométrica. Adicionalmente amostras do tecido alveolar foram processadas para dosagem das citocinas TNF- α e IL-10 por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com os testes ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn. Os resultados revelaram que a variação do veículo associado ao MTA aumentou significativamente o tempo de presa, no entanto, não houve influência na alteração volumétrica ($P>0,05$) e na capacidade do cimento em manter o meio alcalino e liberar íons cálcio. Os cimentos manipulados com extratos em propilenoglicol apresentaram maior escoamento ($P<0,05$). Apenas o extrato da própolis agregou ao MTA efeito contra o *Enterococcus faecalis* após 24 e 48 horas (descontaminação dentinária e contato direto respectivamente) e contra a *Cândida albicans* após 10 horas ($P<0,05$). De acordo com as avaliações histológica e histomorfométrica dos implantes em tecidos subcutâneo e alveolar não foi constatada diferença significativa entre os grupos experimentais quando comparados com o grupo no qual o MTA foi manipulado com água destilada. Segundo a análise microtomográfica e a expressão das citocinas TNF- α e IL-10 houve similaridade ($P>0,05$) entre todos os grupos. Apesar de ter alterado algumas propriedades físico-químicas, o extrato da própolis potencializou o efeito antimicrobiano do MTA sem, contudo, alterar sua biocompatibilidade.

Palavras-chave: Teste de Materiais. *Enterococcus faecalis*. *Cândida albicans*. Biocompatibilidade. Fitoterápicos. Própolis.

ABSTRACT

The effect of the use of phytotherapics and propolis in physicochemical properties, antimicrobial and biocompatibility of MTA

The aim of this study was to evaluate the physicochemical, antimicrobial properties and biocompatibility of white MTA mixed with aqueous or propylene glycol extracts of *Arctium lappa* L., *Casearia sylvestris* Sw. and propolis. Among physicochemical tests were evaluated the setting time, flowability, pH, ion calcium release and volumetric change. To verify the antimicrobial effects were applied the methods of direct contact (*Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*) and dentin decontamination by using the confocal laser scanning microscopy to verify the *Enterococcus faecalis* viability. To evaluate the biocompatibility were used 162 Wistar rats. Each animal received one alveolar and two subcutaneous implants. After the experimental periods of 15, 30 and 60 days were performed the microtomography, histological description and histomorphometric analyses. Additionally alveolar tissue samples were processed for the measurement of TNF- α e IL-10 cytokines by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The data were statistically analyzed by the ANOVA and Tukey or Kruskal–Wallis and Dunn's tests. The results revealed that the variation of the vehicle associated to MTA significantly increased its setting time, however did not influence the volumetric change ($P>0,05$) and the cement's ability to maintain the alkaline medium and ion calcium release. Cements mixed with propylene glycol extracts showed higher flowability ($P<0,05$). Only propolis extract added to MTA the effect against *E. faecalis* after 24 and 48 hours (dentin decontamination and direct contact respectively) and against *Candida albicans* after 10 hours ($P<0,05$). According to the histological and histomorphometric evaluation of the implants in subcutaneous and alveolar tissue was not observed significant differences between the experimental groups in comparison to the reference group (MTA was mixed with distilled water). The microtomography analysis and expression of TNF- α and IL-10 showed that the groups were similar ($P>0,05$). Although the propolis extract modified some physicochemical properties of MTA it is potentiated the antimicrobial effect and did not influence the biocompatibility.

Keywords: Materials testing. *Enterococcus faecalis*. *Candida albicans*. Biocompatibility. Phytotherapics. Propolis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 - (A) Agulhas de Gilmore utilizadas no teste de tempo de presa. (B) Uso da agulha de 113,4g. (C) Uso da agulha de 453,6g.....	65
Figura 2 - Interface do programa Image J utilizado para avaliar o perímetro dos corpos de prova	65
Figura 3 - Dente de acrílico e retrocavidades preenchidas com cimento	68
Figura 4 - Imagens tridimensionais de amostras de MTA manipuladas com <i>Arctium lappa</i> L. em extrato aquoso (A) e em propilenoglicol (B), <i>Casearia sylvestris</i> Sw. em extrato aquoso (C) e em propilenoglicol (D), própolis (E) e água destilada (F), tanto inicial (fileira superior) quanto após 7 dias de imersão em água (fileira inferior).....	68
Figura 5 - Cilindros de dentina radicular bovina, preparados para o experimento	74
Figura 6 - Representação do protocolo de contaminação, troca do inóculo e centrifugação.....	74
Figura 7 - Espécime preparado para avaliação no microscópio confocal de varredura laser. Os quadros amarelos representam os campos nos quais foram obtidas as imagens	74
Figura 8 - Incisão (A) e inserção do tubo por meio de trocarte (B)	79
Figura 9 - Implante no tecido subcutâneo.....	79
Figura 10 - Corte histológico de um implante no tecido subcutâneo corado com H&E	79
Figura 11 - Sequência operatória: alveolo após exodontia (A); inserção do tubo (B); sutura (C).....	82
Figura 12 - Maxila dissecada (A e B) e congelada em nitrogênio líquido (C e D).....	82
Figura 13 - Composição de imagens microscópicas (1,6x) evidenciando o corte realizado e a coloração HE. Observa-se a área ocupada pelo tubo e toda a extensão do alvéolo	82

Figura 14 -	Representação da análise histomorfométrica. Graticulo de integração sobre a imagem de um corte histológico formando um campo contendo 100 pontos equidistantes (10x10).	84
Figura 15 -	Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H ₂ O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 7 horas	93
Figura 16 -	Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H ₂ O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 12 horas	94
Figura 17 -	Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H ₂ O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 24 horas	94
Figura 18 -	Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H ₂ O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 48 horas	94
Figura 19 -	Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H ₂ O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 168 horas	95
Figura 20 -	Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H ₂ O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 10 horas	96
Figura 21 -	Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H ₂ O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 24 horas	96
Figura 22 -	Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H ₂ O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 48 horas	96

Figura 23 -	Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H ₂ O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 168 horas	97
Figura 24 -	Imagens de microscopia confocal de varredura laser após o período de 24 horas, onde pode-se visualizar bactérias viáveis (verde) e mortas (vermelho)	99
Figura 25 -	Imagens de microscopia confocal de varredura laser após o período de 169 horas, onde pode-se visualizar bactérias vivas (verde) e mortas (vermelho)	103
Figura 26 -	Fotomicrografias representativas dos grupos controle e experimentais no período de 15 dias. As áreas correspondentes ao tubo preenchido com os cimentos implantados estão indicadas com (*). Na imagem do grupo GTP uma célula gigante está indicada com seta. Coloração H&E. Objetiva de 40x. Escala de 50µm	109
Figura 27 -	Fotomicrografias representativas dos grupos controle e experimentais no período de 30 dias. As áreas correspondentes ao tubo preenchido com os cimentos implantados estão indicadas com (*). Coloração H&E. Objetiva de 40x. Escala de 50µm	111
Figura 28 -	Fotomicrografias representativas dos grupos controle e experimentais no período de 60 dias. As áreas correspondentes ao tubo preenchido com os cimentos implantado estão indicadas com (*). Coloração H&E. Objetiva de 40x. Escala de 50µm	113
Figura 29 -	Imagens bidimensionais e tridimensionais de cortes sagitais e axiais de espécimes representativos do período de 15 dias. Implante de MTA manipulado com extrato da própolis (A) e água destilada (B)	122
Figura 30 -	Imagens microtomográficas bidimensionais e tridimensionais de cortes sagitais e axiais de espécimes representativos do período de 30 dias. Implante de MTA manipulado com BDA (A) e água destilada (B)	123

Figura 31 -	Imagens microtomográficas bidimensionais e tridimensionais de cortes sagitais e axiais de espécimes representativos do período de 60 dias. Implante de MTA manipulado com água destilada (A) e com ausência do implante (B), conforme achado frequente neste período	123
Figura 32 -	Imagens de cortes representativos dos diferentes grupos no período de 15 dias, evidenciando áreas teciduais na interface do cimento e adjacentes. A área branca demarcada com (*) representa a área previamente ocupada pelo tubo. Área indicada por (O) representa matriz óssea, as setas na primeira imagem indicam a presença de células gigantes multinucleadas. Coloração HE e objetiva de 40x. Escala de 50µm	127
Figura 33 -	Imagens de cortes representativos dos diferentes grupos no período de 30 dias, evidenciando áreas teciduais na interface do cimento e adjacentes. A área branca demarcada com (*) representa a área previamente ocupada pelo tubo. Área indicada por (O) representa matriz óssea. Coloração HE e objetiva de 40x. Escala de 50µm	127
Figura 34 -	Imagens de cortes representativos dos diferentes grupos no período de 60 dias, evidenciando áreas teciduais na interface do cimento e adjacentes. A área branca demarcada com (*) representa a área previamente ocupada pelo tubo. Área indicada por (O) representa matriz óssea. Coloração HE e objetiva de 40x. Escala de 50µm	129

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - Representação gráfica das médias e desvios padrão do perímetro em milímetros dos grupos avaliados. Diferentes letras indicam diferença estatisticamente significativa	90
Gráfico 2 -Representação gráfica da mediana da porcentagem de bactérias viáveis após o período de 24 horas. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P<0,05$)	98
Gráfico 3 -Representação gráfica da mediana do biovolume (μm^3) bacteriano após o período de 24 horas. Houve similaridade ($P>0,05$) entre os grupos	98
Gráfico 4 -Representação gráfica da mediana da porcentagem de bactérias viáveis após o período de 168 horas. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P<0,05$)	101
Gráfico 5 -Representação gráfica da mediana do biovolume (μm^3) bacteriano após o período de 24 horas. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P<0,05$)	101
Gráfico 6 -Análise comparativa da densidade de área (%) de tecido conjuntivo e parâmetros constituintes, no período de 15 dias, representados com os valores da média e desvio-padrão. Diferentes letras representam diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$)	116
Gráfico 7 -Análise comparativa da densidade de área (%) do infiltrado inflamatório e parâmetros constituintes, no período de 15 dias, representados com os valores da média e desvio-padrão. Diferentes letras representam diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$).....	116
Gráfico 8 -Análise comparativa da densidade de área (%) de tecido conjuntivo e parâmetros constituintes, no período de 30 dias, representados com os valores da média e desvio-padrão. Diferentes letras representam diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$)	117
Gráfico 9 -Análise comparativa da densidade de área (%) do infiltrado inflamatório e parâmetros constituintes, no período de 30 dias, representados com os valores da média e desvio-padrão. Diferentes letras representam diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$).....	118

Gráfico 10 - Análise comparativa da densidade de área (%) de tecido conjuntivo e parâmetros constituintes, no período de 60 dias, representados com os valores da média e desvio-padrão. Diferentes letras representam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$)	119
Gráfico 11 - Análise comparativa da densidade de área (%) do infiltrado inflamatório e parâmetros constituintes, no período de 60 dias, representados com os valores da média e desvio-padrão. Diferentes letras representam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).....	119
Gráfico 12 - Análise comparativa da densidade de área (%) de outras estruturas, nos períodos de 15, 30 e 60 dias, representados com os valores da média e desvio-padrão. Diferentes letras representam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).....	120
Gráfico 13 - Evolução dos grupos em função dos períodos experimentais na variável densidade de área (%) de tecido conjuntivo	120
Gráfico 14 - Evolução dos grupos em função dos períodos experimentais na variável densidade de área (%) de infiltrado inflamatório.....	120
Gráfico 15 - Análise comparativa da densidade de área (%) de tecido conjuntivo e dos parâmetros constituintes, no período de 15 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Diferentes letras representam diferença significativa ($P < 0,05$)	132
Gráfico 16 - Análise comparativa da densidade de área (%) do infiltrado inflamatório e dos parâmetros constituintes, no período de 15 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Diferentes letras representam diferença significativa ($P < 0,05$)	132
Gráfico 17 - Representação da densidade de área (%) de tecido conjuntivo e dos parâmetros constituintes, no período de 30 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Não houveram diferenças significativas ($P < 0,05$) para as variáveis representadas	133
Gráfico 18 - Representação da densidade de área (%) de tecido ósseo e dos parâmetros constituintes, no período de 30 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Não houveram diferenças significativas ($P < 0,05$) para as variáveis representadas	134

Gráfico 19 - Representação da densidade de área (%) do infiltrado inflamatório e dos parâmetros constituintes, no período de 30 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Diferentes letras representam diferença significativa ($P < 0,05$)	134
Gráfico 20 - Representação da densidade de área (%) do parâmetro outras estruturas, nos períodos de 15 e 30 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos grupos. Diferentes letras representam diferença estatisticamente significante ($P < 0,05$)	135
Gráfico 21 - Expressão de TNF- α em pg/mg de proteínas, também encontra-se a expressão de TNF- α em pg/mL do concentrado tecidual e a dosagem de proteínas totais apresentado em mg/mL no período de 15 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Não houveram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos	136
Gráfico 22 - Expressão de TNF- α em pg/mg de proteínas, também encontra-se a expressão de TNF- α em pg/mL do concentrado tecidual e a dosagem de proteínas totais apresentado em mg/mL no período de 30 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Não houveram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos	136
Gráfico 23 - Expressão de IL-10 em pg/mg de proteínas, também encontra-se a expressão de IL-10 em pg/mL do concentrado tecidual e a dosagem de proteínas totais apresentado em mg/mL no período de 15 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Não houveram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos	137
Gráfico 24 - Expressão de IL-10 em pg/mg de proteínas, também encontra-se a expressão de IL-10 em pg/mL do concentrado tecidual e a dosagem de proteínas totais apresentado em mg/mL no período de 30 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Não houveram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Grupos experimentais	61
Tabela 2 -	Média (valor máximo e mínimo) e desvio padrão dos tempos de presa inicial e final para os grupos avaliados. Diferentes letras em cada coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$)	89
Tabela 3 -	Média e desvio padrão do pH encontrado nos diferentes períodos para os grupos avaliados. Diferentes letras em cada coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$)	90
Tabela 4 -	Média e desvio padrão da liberação de íons cálcio (mg/L) nos diferentes períodos para os grupos avaliados. Diferentes letras em cada coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$)	91
Tabela 5 -	Média e desvio padrão da solubilidade (%) para os grupos avaliados. Diferentes letras em cada coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$)	92
Tabela 6 -	Média e desvio padrão da quantidade de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) encontradas nos diferentes períodos para os grupos avaliados. Diferentes letras em cada coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$)	93
Tabela 7 -	Média e desvio padrão da quantidade de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) encontradas nos diferentes períodos para os grupos avaliados. Diferentes letras em cada coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$)	95

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
+	mais
<	menor
=	igual
>	maior
3D	tridimensional
BHI	brain heart infusion (infusão cérebro coração)
Ca(OH)₂	hidróxido de cálcio
CEEPA	Comissão de Ética em Pesquisa com Animais
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio imunoenzimático)
G	grupo
g	grama (s)
H&E	hematoxilina e eosina
IL-10	interleucina - 10
kV	kilovoltagem
MCVL	microscopia confocal de varredura a laser
mg	miligrama (s)
Micro-CT	microtomografia computadorizada
min	minuto (s)
mL	mililitro (s)
mm	milímetro (s)
MTA	mineral trioxide aggregate (agregado trióxido mineral)
NaOCl	hipoclorito de sódio
nm	nanômetro (s)
°C	grau Celsius
P	significância estatística
PBS	phosphate buffer solution (solução salina tamponada com fosfato)

pg	picograma (s)
PG	propilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
RPM	rotações por minuto
s	segundo (s)
TNF-α	tumor necrosis factor alpha (fator de necrose tumoral alfa)
UFC	unidades formadoras de colônias
X	vezes/aumento
μA	microampere (s)
μg	micrograma (s)
μL	microlitro (s)
μm	micrometro (s)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	MTA: desenvolvimento, composição e aplicações clínicas	33
2.2	Propriedades físicas e químicas.....	35
2.3	Propriedades antimicrobianas	40
2.4	Propriedades biológicas	44
2.5	Extratos de produtos naturais.....	49
3	PROPOSIÇÃO	55
4	MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1	Materiais utilizados	61
4.1.1	Preparo dos extratos da <i>Arctium lappa</i> L.	62
4.1.2	Preparo dos extratos da <i>Casearia sylvestris</i> Sw.	62
4.1.3	Análises e preparo do extrato da própolis	62
4.1.3.1	Qualidade do extrato da própolis.....	63
4.2	Testes físico-químicos.....	63
4.2.1	Tempo de presa	64
4.2.2	Escoamento	64
4.2.3	pH e liberação de íons cálcio	65
4.2.4	Alteração volumétrica	67
4.3	Testes antimicrobianos.....	68
4.3.1	Método do contato direto.....	69
4.3.2	Método de descontaminação dentinária.....	70
4.4	Avaliação da resposta biológica	75
4.4.1	Animais de experimentação	75
4.4.2	Avaliação em tecido subcutâneo.....	75
4.4.2.1	Análise histológica descritiva	78
4.4.2.2	Análise histomorfométrica	78
4.4.3	Avaliação em tecido ósseo.....	80
4.4.3.1	Análise microtomográfica descritiva	83

4.4.3.2	Análise histológica descritiva	83
4.4.3.3	Análise histomorfométrica	84
4.4.3.4	Dosagem de citocinas	85
4.5	Análise estatística.....	86
5	RESULTADOS.....	87
5.1	Testes físico-químicos.....	89
5.1.1	Tempo de presa	89
5.1.2	Escoamento	89
5.1.3	Leitura do pH.....	90
5.1.4	Liberação de íons cálcio.....	91
5.1.5	Alteração volumétrica	91
5.2	Testes antimicrobianos.....	92
5.2.1	Método do contato direto.....	92
5.2.1.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	92
5.2.1.2	<i>Cândida albicans</i>	95
5.2.2	Método de descontaminação dentinária.....	97
5.3	Avaliação da resposta biológica	105
5.3.1	Análise em tecido subcutâneo.....	105
5.3.1.1	Análise histológica descritiva dos implantes em tecido subcutâneo.....	105
5.3.1.2	Análise histomorfométrica dos implantes em tecido subcutâneo.....	115
5.3.2	Análise em tecido alveolar.....	121
5.3.2.1	Análise microtomográfica descritiva.....	121
5.3.2.2	Análise histológica descritiva dos implantes em tecido alveolar	124
5.3.2.3	Análise histomorfométrica dos implantes em tecido alveolar.....	129
5.3.2.4	Dosagem de citocinas	135
6	DISCUSSÃO	139
7	CONCLUSÕES	157
	REFERÊNCIAS.....	161
	ANEXOS	175

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O insucesso do tratamento endodôntico geralmente está associado com a persistência de microrganismos remanescentes em espaços vazios no sistema de canais radiculares e na região perirradicular (SUNDQVIST et al., 1998; SIQUEIRA, 2001). Frente a essa situação, em determinados casos, a melhor indicação de tratamento pode ser a realização de cirurgia parendodôntica, como a apicectomia com obturação retrógrada. Além da correta execução do procedimento cirúrgico, outro fator determinante no sucesso da modalidade de obturação retrógrada é a escolha do material retro-obturador a ser empregado no preenchimento da retrocavidade.

Um material retro-obturador ideal deve apresentar adequadas propriedades físicas, químicas, biológicas e ainda, se possível, efeito antimicrobiano. Dentre as propriedades físicas, o tempo de presa não deve ser muito longo mesmo na presença de umidade, apresentar radiopacidade maior que a dentina (SHAH et al., 1996; ISO, 2001), ser dimensionalmente estável, não reabsorvível, com solubilidade menor que 3% (ADA 57, 2000) e com uma excelente capacidade de selamento marginal, propriedade tal que, certamente, é um requisito primário, de modo a prevenir a infiltração de microrganismos e seus produtos para os tecidos perirradiculares (GARTNER; DORN, 1992).

A capacidade de liberar íons cálcio e manter o meio alcalino são importantes propriedades químicas, pois essas condições podem propiciar o reparo por meio da estimulação do processo de mineralização (HOLLAND et al., 2002). Devido ao contato com tecidos perirradiculares é fundamental que o material seja atóxico e biocompatível com os tecidos do hospedeiro (TORABINEJAD; PITT FORD, 1996; BODRUMLU, 2008). O MTA é um cimento que atende a grande parte das referidas propriedades, desenvolvido na década de 1990 foi inicialmente indicado como material selador de perfurações radiculares (LEE; MONSEF; TORABINEJAD, 1993) e cavidades retrógradas (TORABINEJAD; WATSON; PITT FORD, 1993).

Atualmente, também é indicado para outras situações clínicas na prática endodôntica, por apresentar biocompatibilidade (TORABINEJAD et al., 1995; CAMILLERI; PITT FORD, 2006; BERNABÉ et al., 2007; BODRUMLU, 2008; TORABINEJAD; PARIROKH, 2010), que foi comprovada por meio de estudos *in vitro* (TORABINEJAD et al., 1995; ZEFERINO et al., 2010; ALANEZI et al., 2011; BIN

et al.; 2012) e *in vivo* empregando diversos modelos metodológicos, tais como implantação em tecido subcutâneo (HOLLAND et al., 2002; SHAHI et al., 2006; BÓRIO et al., 2014) e ósseo (TORABINEJAD et al., 1995; CINTRA et al., 2006; GOMES-FILHO et al., 2011).

O MTA também possui boas propriedades físico-químicas (TORABINEJAD et al., 1995; PARIROKH; TORABINEJAD, 2010). Apresenta-se como um fino pó de partículas hidrofílicas na coloração cinza ou branca, sendo composto por silicato tricálcio, aluminato tricálcio, óxido tricálcio, óxido de silicato e outros óxidos minerais (TORABINEJAD; WATSON; PITT FORD, 1993), sua radiopacidade é conferida pelo óxido de bismuto (PARIROKH; TORABINEJAD, 2010).

Ao ser hidratado o referido composto se transforma em um gel coloidal solidificando-se em uma rígida estrutura. A expansão desse cimento é um mecanismo dependente da água (GANDOLFI et al., 2009), aliás essa propriedade é associada à sua ótima capacidade seladora (TORABINEJAD; WATSON; PITT FORD, 1993; PARIROKH; TORABINEJAD, 2010). A presa completa do cimento ocorre em torno de 165 minutos (TORABINEJAD et al., 1995) sendo, ainda, capaz de promover um pH alcalino bem como liberar íons cálcio (DUARTE et al., 2003; VIVAN et al., 2010). Apresenta solubilidade abaixo de 3% desde que manipulado com a proporção de 3 partes de pó para uma parte de água destilada (CAVENAGO et al., 2014).

No entanto, o MTA apresenta baixa e limitada ação antimicrobiana (TORABINEJAD et al., 1995; ESTRELA et al., 2000; HOLT et al., 2007; MORGENTAL et al., 2011). Diversos micro-organismos estão presentes na microbiota associada à infecção endodôntica dentre eles, o *Enterococcus faecalis* e a *Cândida albicans* são frequentemente isolados de infecções endodônticas primárias e principalmente, secundárias, por isso são muito empregados para avaliar os efeitos antibacteriano (AL-HEZAIMI et al., 2006; HOLT et al., 2007; TANOMARU-FILHO et al., 2007; MORGENTAL et al., 2011) e antifúngico (AL-HEZAIMI et al., 2005; MOHAMMADI et al., 2006; ALSALLEEH et al., 2014) do MTA.

Porém os diferentes estudos são divergentes a respeito da ação antimicrobiana do MTA desde, nenhum efeito apresentado (MORGENTAL et al., 2011) até resultados promissores (LOVATO; SEDGLEY, 2011; ALSALLEEH et al., 2014). A discrepância pode estar relacionada aos diferentes modelos metodológicos utilizados, fator muito importante para extrapolação clínica dos resultados.

A dentina é um tecido mineralizado, porém, permeável devido à presença de túbulos em sua constituição, essa estrutura encontra-se contaminada em infecções endodônticas (PETERS et al., 2001), assim algumas metodologias *in vitro* buscaram simular essa condição por meio de protocolos de contaminação dentinária (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987; ORSTAVIK; HAAPASALO, 1990; MA et al., 2011). No entanto, até o momento não existem relatos na literatura a respeito da ação antimicrobiana do MTA em nível de túbulos dentinários.

Buscando melhorar ou agregar ação antimicrobiana ao MTA, alguns autores sugeriram a substituição da água destilada ou sua associação com soluções antissépticas. A clorexidina a 2% proporciona ao MTA um aumento significativo na atividade antimicrobiana contra o *Enterococcus faecalis* (HOLT et al., 2007), por outro lado essa associação eleva consideravelmente sua citotoxicidade (HERNANDEZ et al., 2005) além de interferir nas propriedades físicas do MTA (KOGAN et al., 2006).

Uma alternativa seria o emprego de produtos naturais que, por meio de extratos, apresentem propriedade antimicrobiana sem, contudo, serem citotóxicos. Fitoterápicos foram e ainda são muito utilizados pela humanidade para várias aplicações terapêuticas, tanto na Medicina quanto na Odontologia. Diversos estudos foram realizados na busca de plantas medicinais com substâncias que apresentem especialmente propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas.

Vários fitoterápicos apresentam tais propriedades, porém, dois facilmente encontrados no Brasil e já inseridos na cultura popular são a *Arctium lappa* L. e a *Casearia sylvestris* SW. popularmente conhecidos como bardana e guaçatonga, respectivamente. Ambos fitoterápicos apresentam atividades biológicas e farmacológicas reportadas em relação às propriedades antibacteriana e antifúngica (PEREIRA et al., 2005; GENTIL et al., 2006; SCHNEIDER et al., 2006). Porém seus extratos também apresentam atividade anti-inflamatória (ESTEVES et al., 2005; ZHAO et al., 2009; CHAN et al., 2010; ALBANO et al., 2013; DE ALMEIDA et al., 2013).

Outra alternativa natural, já utilizada com bons resultados na endodontia é o extrato da Própolis. A composição química da própolis é muito variada conforme a origem botânica mas, de modo geral, é composta por 50% de resinas e produtos balsâmicos, 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de microelementos (SCAZZOCCHIO et al., 2006). Os flavonóides e os ácidos fenólicos

são substâncias que se destacam, pois, a eles são atribuídos grande parte das atividades biológicas constatadas (MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998). A própolis despertou o interesse da comunidade científica devido às suas propriedades anti-inflamatória (DOBROWOLSKI et al., 1991; BURDOCK 1998), antibacteriana inclusive com inibição do *Enterococcus faecalis* (FERREIRA et al., 2007; AWAWDEH et al., 2009; KANDASWAMY et al., 2010; KAYAOGLU et al., 2011; MADHUBALA et al., 2011) e antifúngica, sendo muito eficaz contra *Cândida albicans* (KUJUMGIEV et al., 1999; KOO et al., 2000; TYAGI et al., 2013).

Entretanto, não há pesquisas que relatem os efeitos da associação de produtos naturais sobre as propriedades do MTA. Portanto, diante da possibilidade de agregar os efeitos antimicrobiano e anti-inflamatório da *Arctium lappa* L., *Casearia silvestris* SW. e da própolis, torna-se oportuno avaliar os extratos dessas substâncias manipulados com o MTA, por meio de uma investigação ampla frente a diversas variáveis.

2 Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MTA: desenvolvimento, composição e aplicações clínicas

Diversos materiais foram empregados com a finalidade de promover o selamento de cavidades retrógradas ou perfurações radiculares, dentre eles destacam-se o amálgama, cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, ionômeros de vidro, guta-percha e resinas. No entanto os referidos materiais não apresentam propriedades químicas, físicas e/ou biológicas plenamente satisfatórias para um material idealmente destinado a tais aplicações clínicas (JOHNSON, 1999).

Em busca de um material alternativo, o agregado trióxido mineral, corriqueiramente reconhecido pela sigla MTA, derivada da abreviação de seu nome na língua inglesa “Mineral Trioxide Aggregate”, foi desenvolvido na década de 90 na Universidade de Loma Linda, Califórnia. Em 1993 Lee, Monsef e Torabinejad (1993) realizaram o primeiro estudo laboratorial, no qual foi avaliada a capacidade seladora do MTA, IRM e amálgama em perfurações realizadas em 45 graus em relação ao longo eixo de raízes mesiais de molares superiores e inferiores. Com a avaliação microscópica dos espécimes após serem pigmentados com azul de metileno por 48 horas, os autores concluíram que o MTA apresentou infiltração significativamente menor que os outros dois materiais testados.

No mesmo ano, Torabinejad, Watson e Pitt Forf (1993) realizaram um estudo para avaliar o selamento de cavidades retrógradas, preparadas em dentes extraídos, as quais foram preenchidas com amálgama, Super EBA e MTA. Os espécimes foram imersos em solução aquosa do corante rodamina B durante 24 horas e após esse período os espécimes foram seccionados longitudinalmente e avaliados por meio de microscopia confocal de varredura laser. De acordo com os resultados os autores concluíram que o MTA proporcionou uma infiltração significativamente menor que o amálgama e o Super EBA.

Em 1995 foi registrada a patente do MTA (US Patent Number: 5769638) em nome de Mahmoud Torabinejad e Dean White, na qual consta que o referido material é composto por 50 a 75% em peso de óxido de cálcio e por 15 a 25% de dióxido de silício, sendo que ambos os componentes correspondem a 70 a 95% do

cimento. Segundo a própria patente o MTA apresenta cimento Portland tipo 1 refinado, além do óxido de bismuto para atuar como agente radiopacificador.

No primeiro estudo realizado a respeito da composição do MTA, por meio da espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX) foi constatado que esse cimento é constituído basicamente em estruturas correspondentes com óxido de cálcio e fosfato de cálcio (TORABINEJAD et al., 1995). Porém estudos posteriores que aplicaram a mesma metodologia, não detectaram a presença de fósforo como constituinte do material (ASGARY et al., 2005; CAMILLERI et al., 2005).

O MTA foi aprovado para uso clínico pela FDA em 1998 (ROBERTS et al., 2008), dessa forma passou a ser inicialmente comercializado como ProRoot MTA (Tulsa Dental Products, Tulsa, OK, Estados Unidos). Inicialmente foi apresentado como um pó cinza e posteriormente foi lançado o MTA branco, devido ao potencial de pigmentação do anterior. A diferença entre os dois tipos de MTA, quando avaliada a composição química de cada material por meio de EDX em diferentes estudos, ocorre nas concentrações de trióxido de alumínio, óxido de magnésio e especialmente óxido de ferro que são menores no MTA branco (ASGARY et al., 2005; CAMILLERI et al., 2005; ASGARY et al., 2006). Outra diferença importante é a constituição física das partículas, pois, no MTA branco são menores, tornando o pó mais refinado (ASGARY et al., 2006). Um fator interessante é que alguns estudos encontraram similaridade da composição química do MTA em relação o cimento Portland (ESTRELA et al., 2000; CAMILLERI et al., 2005; CAMILLERI, 2008).

Em 2001 foi lançado no mercado outro MTA cinza denominado como MTA-Angelus (Angelus, Soluções em Odontologia, Londrina, PR) e posteriormente o MTA branco também passou a ser disponibilizado comercialmente. O MTA Angelus contém uma quantidade muito menor de óxido de bismuto quando comparado com o MTA ProRoot (SONG et al., 2006).

A respeito da composição química, o MTA branco apresenta 44.23% de CaO, 21.20% de SiO₂, 16.13% de Bi₂O₃, 1.92% de Al₂O₃, 1.35% de MgO, 0.53% de SO₃, 0.43% de Cl e 0.40% de FeO. Ao comparar com o MTA cinza o cimento anterior apresenta 54.9% menos de Al₂O₃, 56.5% menos de MgO e 90.8% menos de FeO (ASGARY et al., 2005). Ainda, de acordo com a caracterização química do MTA Angelus branco, esse material exhibe, predominantemente, a presença de silicato tricálcio, óxido de bismuto, silicato dicálcio, óxido de cálcio, aluminato tricálcio, óxido de alumínio e óxido de sílica (CAMILLERI; SORRENTINO; DAMIDOT, 2013).

Inicialmente, o MTA foi preconizado como material retrobturador e para selamento de perfurações radiculares (LEE; MONSEF; TORABINEJAD, 1993; TORABINEJAD; WATSON; PITT FORD, 1993). Porém, após seu lançamento comercial passou a ser utilizado em outras situações clínicas, apresentando bons resultados em capeamento pulpar, pulpotomia, como barreira apical em dentes com rizogênese incompleta, perfurações de furca, reabsorções e até para obturação do canal radicular (ROBERTS et al., 2008; PARIROKH; TORABINEJAD, 2010).

Atualmente, o MTA branco é muito utilizado por ser esteticamente mais compatível, sendo recomendado para o tratamento em perfurações na região cérvico-vestibular de dentes anteriores (BORTOLUZZI et al., 2007).

2.2 Propriedades físicas e químicas

Hidratação do MTA

Ao ser hidratado o MTA transforma-se em um gel coloidal que ao tomar presa, solidifica-se em uma rígida estrutura (TORABINEJAD et al., 1995; ROBERTS et al. 2008; PARIROKH; TORABINEJAD, 2010). Após a hipótese levantada de que o hidróxido de cálcio seria um subproduto da reação do MTA (HOLLAND et al., 1999), o mecanismo dessa reação foi demonstrado, sendo que a hidratação do MTA consiste de duas reações distintas, uma ocorre entre o aluminato tricálcio e a água que juntamente com a presença de gesso (encontrado em pequenas quantidades no MTA), gera a produção de etringita que, posteriormente, resulta em monossulfato, uma vez esgotado o gesso. A outra reação ocorre entre os silicatos tricálcio e dicálcio com a água, que resulta na produção de um gel de silicato de cálcio hidratado (de baixa cristalinidade) e hidróxido de cálcio (CAMILLERI et al., 2005).

Camilleri (2007) avaliou o mecanismo de hidratação do MTA branco utilizando MEV, EDX e pela quantificação de clínquer anidro por meio do cálculo de Bogue. De acordo com os resultados foi possível concluir que o MTA branco foi deficiente em alumina, na hidratação isso afetou a produção de etringite e monossulfato, geralmente formados na hidratação do cimento Portland. Além disso, o bismuto interferiu no mecanismo de hidratação do MTA e também afetou a precipitação do hidróxido de cálcio.

Proporção pó/líquido

Na manipulação do MTA, a quantidade de líquido a ser agregada ao pó deve seguir uma proporção adequada para manter as melhores propriedades do cimento. A proporção recomendada pelo fabricante é de 3 partes de pó para uma parte de líquido. A solubilidade do MTA, normalmente, é aferida seguindo as recomendações da normativa ISO, tendo sido demonstrado que esta variável aumenta significativamente conforme o aumento da proporção de água adicionada ao pó (FRIDLAND; ROSADO, 2003).

Em estudo recente foi avaliada a influência da proporção pó e líquido em algumas propriedades físico-químicas do MTA branco Angelus (CAVENAGO et al., 2014). Para o referido estudo, três grupos foram preparados utilizando as proporções de 4, 3 e 2 partes de pó para uma de água destilada, foram avaliadas a radiopacidade, tempo de presa, pH, liberação de íons cálcio e solubilidade. No teste de solubilidade foi proposta uma nova metodologia, na qual amostras dos cimentos inseridas em retrocavidades de dentes de acrílico foram escaneadas duas vezes cada, por meio de microtomografia computadorizada, sendo uma após a inserção do cimento e outra após 168 horas de imersão em água ultrapura. A solubilidade foi determinada pela diferença entre o volume inicial e final de cada espécime. De acordo com os resultados, a radiopacidade foi maior com a proporção de 4:1. Na proporção de 2:1, o tempo de presa foi mais longo, o pH e a liberação íons cálcio foi maior, além da solubilidade (6.46%), que foi significativamente maior que nos outros grupos. Com base nos resultados foi possível concluir que a proporção pó/líquido interfere significativamente nas propriedades físicas e químicas do MTA branco Angelus.

Manipulação

A manipulação deve ser realizada de modo a se obter a homogeneidade do cimento. Um estudo propôs a manipulação dos cimentos MTA ProRoot branco e cinza e MTA Angelus branco e cinza por meio de vibração ultrassônica, agitação em cápsulas com uso de amalgamador e manipulação manual. Após 4 e 28 dias, os espécimes foram submetidos ao teste de dureza de superfície de Vickers. De acordo com os resultados os autores concluíram que o uso do ultrassom aumentou a dureza de superfície dos cimentos quando comparado com as outras técnicas nos dois períodos avaliados. O uso da manipulação mecânica do cimento por meio de

amalgamador é um método que padroniza e homogeneiza a manipulação do MTA (NEKOO FAR et al., 2010).

Para avaliar os efeitos da manipulação mecânica e manual, bem como, a agitação ultrassônica durante a inserção do MTA, foram utilizados o MTA branco Angelus e ProRoot, manipulados mecanicamente em cápsulas por meio de um amalgamador a 4500 rpm durante 30 segundos e também por meio de um aparato que simulou a manipulação manual com pressão de 3.22 Mpa durante 1 minuto. Dos cimentos foram avaliadas a resistência flexural e a porosidade, por microtomografia computadorizada. Apesar da manipulação mecânica em cápsulas ter sido mais rápida e promover uma mistura mais homogênea, esta técnica, bem como a agitação ultrassônica durante a inserção do material, não melhoraram significativamente as propriedades avaliadas (BASTURK et al., 2014).

Testes físico-químicos

Diversos métodos são utilizados para avaliar as diferentes propriedades físicas e químicas do MTA. O primeiro estudo avaliou a composição química por meio de EDX, tempo de presa (ISO 6876), radiopacidade (ISO 6876), pH, resistência à compressão (ISO 6876) e solubilidade (ADA #30) tanto do MTA quanto do amálgama, Super-EBA e IRM (TORABINEJAD et al., 1995). Os resultados demonstraram que o MTA é composto por silicato tricálcio, aluminato tricálcio, óxido tricálcio e óxido de silicato, também foram detectados íons fósforo. O amálgama apresentou o menor tempo de presa (4 min) e o MTA o maior (2h 45min). O MTA foi mais radiopaco que o Super-EBA e o IRM. O MTA apresentou um pH inicial de 10.2 aumentando para 12.5 após 3 horas da manipulação e após 24 horas apresentou a menor resistência à compressão entre os materiais testados. Com exceção do IRM, nenhum dos outros materiais apresentou solubilidade.

A avaliação do pH e a liberação de íons cálcio foi realizada por meio de uma metodologia muito utilizada (DUARTE et al. 2003). Para isso os cimentos foram inseridos em tubos plásticos com 1.5mm de diâmetro e 1cm de comprimento. Cada espécime foi imerso, individualmente, em frasco de vidro contendo 10mL de água destilada. Após 3, 24, 72 e 168 horas foram mensurados o pH e a liberação de íons cálcio (por meio de um espectrofotômetro de absorção atômica). De acordo com os resultados, o MTA de duas marcas comerciais foram capazes de promover o pH alcalino, bem como liberar íons cálcio. Utilizando metodologia semelhante outros

estudos que avaliaram o pH, liberação de íons cálcio, tempo de presa e solubilidade do MTA branco Angelus encontraram resultados semelhantes (VIVAN et al., 2010; DUARTE et al., 2012).

Ao avaliar o tempo de presa e a expansão do MTA ProRoot quando imerso em diferentes meios como água destilada, PBS, 20% de soro fetal bovino + 80% de PBS e óleo hexadecano, foi constatado que a expansão do cimento é um mecanismo dependente da água, pois, nenhuma expansão ocorreu no cimento imerso em óleo. Além disso, a imersão em associação de PBS e soro fetal bovino reduziu, significativamente, a expansão do MTA, sugerindo que uma contaminação por fluídos (sangue por exemplo) durante um procedimento cirúrgico pode afetar a expansão do referido cimento (GANDOLFI et al., 2009).

Ao avaliar a presa do MTA branco Angelus em presença de umidade DeAngelis et al. (2013) utilizaram raízes de dentes extraídos para simular a condição de ápice aberto. Nos espécimes, o MTA foi inserido a 4mm de profundidade sendo estabelecidos os seguintes grupos: 1 e 2 – com e sem uma mecha de algodão embebida com soro sobre o MTA e impermeabilização das raízes. 3 e 4 - com e sem uma mecha de algodão embebida com soro sobre o MTA porém sem impermeabilização das raízes. Os espécimes foram mantidos por 24 horas em um aparato contendo uma esponja embebida com soro bovino fetal com pressão interna de 13.3 kPa. Após o referido período, a presa foi avaliada utilizando o teste de dureza de Vickers. De acordo com os resultados, os autores não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, concluindo que a colocação de uma mecha de algodão úmida sobre o MTA pode não ser necessária para sua presa quando utilizado em procedimentos de apicificação e perfurações maiores que 1mm.

Veículos associados ao MTA

O MTA foi preconizado para ser manipulado com água destilada esterilizada, no entanto diversos estudos avaliaram a adição ou mesmo a substituição do referido veículo em busca de uma melhora na manipulação ou nas propriedades físicas do MTA. Diferentes aditivos associados ao MTA como a solução anestésica de lidocaína 2%, NaOCl 3% em gel, gluconato de Clorexidina gel, K-Y, cloreto de cálcio (CaCl_2) 3% e 5% e soro fisiológico podem alterar algumas propriedades físicas do material (KOGAN et al., 2006), especialmente o NaOCl 3% em gel, K-Y e CaCl_2 5%

reduzem o tempo de presa para 20 a 25 minutos, além de proporcionar menor resistência à compressão.

Um estudo avaliou a influência da adição de 10% de cloreto de cálcio ao MTA branco e ao Portland branco, sobre o tempo de presa, solubilidade e pH (BORTOLUZZI et al., 2009). A adição de CaCl_2 reduziu em 50% o tempo de presa inicial dos cimentos, já o tempo de presa final do MTA foi reduzido em 35.5% e do cimento Portland em 68.5%. A solubilidade foi reduzida para ambos cimentos, além de promover o aumento do pH nos períodos iniciais.

Outro estudo avaliou o tempo de presa, resistência à compressão e o pH do MTA associado com diferentes aceleradores de hidratação (LEE et al., 2011). Foram avaliados o MTA contendo 10% de cloreto de cálcio manipulado com água destilada, além do MTA manipulado com água destilada, ácido nítrico a 0.1% e com gluconato lactato de cálcio. De acordo com os resultados o tempo de presa do MTA manipulado com os aceleradores de hidratação foi significativamente mais curto, especialmente com o gluconato lactato de cálcio. Porém, o pH do grupo controle foi significativamente maior que o encontrado nos grupos experimentais.

O propilenoglicol (PG) é um veículo que melhora a manipulação do MTA e que foi verificado por meio de um estudo que avaliou a sua influência sobre o escoamento, tempo de presa, pH e liberação de íons cálcio do MTA (DUARTE et al., 2012). Para o estudo, o MTA branco foi manipulado com diferentes proporções de PG, estabelecendo as seguintes proporções de veículos: 100% de água destilada (AD), 80% AD e 20% PG, 50% AD e 50% PG, 20% AD e 80% PG e 100% PG. O autores encontraram que a adição do propilenoglicol ao MTA branco Angelus elevou seu escoamento, tempo de presa, porém, quando utilizado 100% de PG a presa não ocorreu. Um aumento no pH e na liberação de íons cálcio nos períodos iniciais após a manipulação também foi observado com o emprego do propilenoglicol na manipulação do MTA branco. Em função dos resultados, o autores recomendaram a proporção de 80% de água destilada e 20% de propilenoglicol para a manipulação do MTA.

2.3 Propriedades antimicrobianas

Como micro-organismos frequentemente isolados de periapicopatias persistentes, tanto o *Enterococcus faecalis* (ESTRELA et al., 2000; AL-HEZAIMI et al., 2006; HOLT et al., 2007; TANOMARU-FILHO et al., 2007; ESTRELA et al., 2011; MORGENTAL et al., 2011) quanto a *Cândida albicans* (AL-HEZAIMI et al., 2005; MOHAMMADI et al., 2006; ESTRELA et al., 2011; ALSALLEEH et al., 2014) são muito utilizados em pesquisas para avaliar as propriedades antimicrobianas de materiais endodônticos.

O *Enterococcus faecalis* é uma bactéria gram positiva normalmente encontradas na flora do trato gastrointestinal dos humanos. Como bactéria anaeróbia facultativa, pode estar presente em infecções endodônticas primárias, no entanto, é encontrada principalmente em focos infecciosos presentes nos casos de insucesso da terapia endodôntica (SUNDQVIST et al., 1998). Essa bactéria é capaz de penetrar e colonizar os túbulos dentinários, mantendo-se viável e aderida ao colágeno quando fluidos estão presentes (LOVE, 2001).

Outra característica é a resistência dessa bactéria, pois exibe a capacidade de tolerar o pH alcalino, fator que geralmente inibe outras bactérias. Para avaliar essa condição Mchugh et al. (2004) realizaram um estudo *in vitro* para determinar o pH inibitório ao crescimento do *Enterococcus faecalis*. As bactérias foram cultivadas em meios com pH variando de 9.5 a 12. O crescimento bacteriano foi correlacionado com a turvação do meio de cultivo aferido por espectrofotômetro após 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Os resultados sugeriram que os pH's de 10.5 e 11 retardaram o crescimento, enquanto que os pH's de 11.5 e 12 inibiram o crescimento.

Os fungos constituem uma pequena parte da microbiota bucal, sendo a *Cândida albicans* a espécie mais encontrada. Ocasionalmente, tem sido encontrada em infecções primárias do canal radicular, ocorrendo com mais frequência em casos de insucesso do tratamento endodôntico. A *Cândida albicans* é considerada um micro-organismo com afinidade à dentina, apresentando grande adesão e colonização dessa estrutura. Este fungo também apresenta resistência a alguns medicamentos intracanaís, tais como o hidróxido de cálcio (SIQUEIRA; SEN, 2004).

Diversos modelos metodológicos foram utilizados para avaliar os efeitos antimicrobianos de cimentos endodônticos como os testes de difusão em ágar (ESTRELA et al., 2000; TANOMARU-FILHO et al., 2007; ESTRELA et al., 2011;

MORGENTAL et al., 2011), contato direto (COBANKARA et al., 2004; LOVATO; SEDGLEY, 2011; MORGENTAL et al., 2011), descontaminação intratubular (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987; MA et al., 2011) e sobre biofilmes uni-espécie (ALSALLEEH et al., 2014).

Ma et al. (2011) apresentaram um modelo de estudo para avaliar a descontaminação dentinária à nível intratubular utilizando a microscopia confocal de varredura laser. Foram utilizados semi-cilindros de dentina obtidos a partir de raízes de dentes unirradiculados seccionados longitudinalmente. Esses corpos de prova foram colocados em tubos tipo eppendorf e contaminados com uma suspensão de *Enterococcus faecalis* em BHI, com uma concentração de 3×10^6 unidades formadoras de colônia (UFC). Esses tubos foram submetidos a 4 ciclos de centrifugações a 1400, 2000, 3600 e 5600g, realizados em duplicata durante 5 minutos cada. Após cada ciclo, a solução do inócuo foi renovada e ao final, os espécimes foram incubados em BHI esterilizado durante 24 horas. Após esse período, soluções irrigadoras foram testadas sobre os espécimes contaminados. Para avaliação do efeito antibacteriano, os corpos de prova foram marcados com o corante fluorescente LIVE/DEAD para proceder a avaliação no microscópio confocal de varredura laser, a partir do qual foi possível obter dados tridimensionais da contaminação intratubular. Os autores concluíram que essa metodologia empregando a centrifugação obteve uma contaminação volumosa, uniformemente distribuída e com profundidade nos túbulos dentinários.

O selamento adequado é de suma importância para que o cimento retro-obturador não permita o trânsito de microrganismos. Estrela et al. (2011) avaliaram a infiltração microbiana frente aos MTA's branco e cinza, cimento Portland branco e cinza, cimento de óxido de zinco e eugenol associado com Sealapex. Um aparato foi criado de modo a se obter duas câmaras, uma superior na qual foi colocado uma suspensão de micro-organismos composta por *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Cândida albicans* (ATCC 10231), abaixo dessa câmara havia um dente unirradicado com retrocavidade preenchida com os cimentos experimentais e logo abaixo do dente, uma câmara inferior estava acoplada, onde havia BHI esterilizado. A infiltração foi observada por 60 dias. De acordo com os resultados, o grupo com a retrobturação realizada com Sealapex e cimento de óxido de zinco e eugenol não apresentaram infiltração bacteriana

durante todo período o experimental, fato que foi observado nos outros grupos, a partir do décimo quinto dia.

Efeito antibacteriano do MTA

Resultados divergentes são encontrados em estudos que testaram o efeito antibacteriano do MTA. Por meio do teste de difusão em ágar um estudo avaliou o efeito antibacteriano do MTA, cimento Portland, pasta de hidróxido de cálcio, Sealapex e Dycal (ESTRELA et al., 2000). Cepas padrão das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) foram utilizadas isoladamente ou em conjunto. Placas de petri com 20mL de BHI e ágar foram inoculadas com 0.1mL das suspensões experimentais. Em cada placa foram criadas 3 cavidades (4x4mm) que foram preenchidas com os materiais experimentais. As placas foram incubadas por 48 horas, para posterior análise dos halos de inibição. De acordo com os resultados a ação do hidróxido de cálcio foi superior aos outros materiais. O MTA não apresentou halos de inibição, somente de difusão.

Em metodologia semelhante o MTA ProRoot cinza, MTA Angelus branco e cinza, cimentos Portland branco e cinza apresentaram atividade antimicrobiana contra os micro-organismos *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 10538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 10541) (TANOMARU-FILHO et al., 2007).

O tipo do MTA (branco ou cinza), bem como sua concentração, apresentam relação direta no efeito antibacteriano, pois o MTA cinza requer concentrações mais baixas do que o MTA branco para exercer o mesmo efeito antibacteriano sobre *Enterococcus faecalis* e o *Streptococcus sanguis* (AL-HEZAIMI et al., 2006).

O efeito antibacteriano do MTA branco e MTA cinza manipulados com água esterilizada e com solução de clorexidina a 2% foi avaliado por meio do teste de difusão em ágar, no qual os cimentos logo após a manipulação foram colocados sobre placas de ágar contaminadas com *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082), sendo avaliados os halos de inibição após 24 horas de incubação. De acordo com os resultados nos grupos onde foi utilizada a clorexidina houve a formação de halos de inibição significativamente maiores (HOLT et al., 2007).

Utilizando duas metodologias, Morgental et al. (2011) avaliaram a ação antibacteriana do MTA e de outros cimentos, antes da presa (por meio do teste de difusão em ágar) e após a presa (por meio do teste de contato direto). Para os ensaios foram utilizadas cepas padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). De acordo com os resultados o MTA não apresentou atividade antibacteriana nem antes e nem depois da presa. No entanto, o MTA apresenta algum efeito antibacteriano sobre cepas de *Enterococcus faecalis* obtidas de isolados clínicos de canais radiculares (LOVATO; SEDGLEY, 2011).

Efeito antifúngico do MTA

Em alguns estudos o MTA não apresentou efeito sobre a *Cândida albicans*, (ESTRELA et al., 2000), porém, outros demonstraram ação efetiva (AL-NAZHAN; AL-JUDAI, 2003; MOHAMMADI et al., 2006). O tempo de presa do MTA demonstra influência na sua ação antifúngica, fato observado no estudo de AL-NAZHAN e AL-JUDAI (2003) que avaliaram o cimento logo após sua manipulação e após 24 horas da presa por meio do teste de diluição em tubos. No ensaio foi realizado o cultivo da *Cândida albicans* em caldo Sabouraud com e sem os cimentos experimentais, sendo incubados durante 1, 24 e 72 horas. Os resultados demonstraram que o MTA testado logo após a manipulação foi efetivo após 24 horas, já o MTA com presa de 24 horas foi efetivo após 72 horas de incubação. Em estudo empregando metodologia e variáveis similares, os MTA's branco e cinza tanto logo após a manipulação quanto com 24 horas de presa apresentaram crescimento fúngico após 1 hora de incubação, fato que não foi repetido após incubação de 24 e 72 h (MOHAMMADI et al., 2006). A concentração do MTA também é um fator significativo na inibição da *Cândida albicans* (AL-HEZAIMI et al., 2005).

Um estudo avaliou o efeito antifúngico do MTA branco e cinza e do cimento ERRM sobre biofilmes de *Cândida albicans* (ALSALLEEH et al., 2014). Corpos de prova dos cimentos foram subdivididos em 2 grupos de acordo com o tempo de presa, 3 e 24 horas, e em seguida foram expostos a suspensões de *Cândida albicans* incubadas durante 24 e 48 horas. O biofilme formado foi avaliado por meio do ensaio XTT. Paralelamente, as suspensões de *Cândida albicans* foram incubadas em meios com diferentes valores de pH para posteriormente ser avaliada a formação do biofilme. Os autores verificaram que todos os materiais experimentais

apresentaram atividade antifúngica similar, sendo considerado satisfatório. Além disso, a alteração do ambiente e a variação do pH contribuíram para essa atividade.

2.4 Propriedades biológicas

Devido às aplicações clínicas, o MTA permanece em íntimo contato com os tecidos perirradiculares. Dessa forma, é desejável que este material seja atóxico e biocompatível (TORABINEJAD; PARIROKH, 2010). Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* que foram realizados para verificar a biocompatibilidade do MTA (CAMILLERI; PITT FORD, 2006; BODRUMLU, 2008; ROBERTS et al., 2008; TORABINEJAD; PARIROKH, 2010).

Avaliação *in vitro*, por meio da experimentação em cultura celular é um método muito utilizado para determinar a toxicidade do MTA. Estudos realizados com diferentes ensaios e tipos celulares de diversas linhagens, cultivadas sob condições laboratoriais controladas, detectaram que o MTA apresenta um baixo potencial citotóxico, menor que outros materiais empregados para a mesma finalidade, sendo, portanto, considerado biocompatível (TORABINEJAD et al., 1995; OSORIO et al., 1998; ZEFERINO et al., 2010; ALANEZI et al., 2011; BIN et al., 2012). No entanto, ao substituir a água destilada por Clorexidina 0,12% como veículo para o MTA, ocorre a elevação da citotoxicidade do cimento (HERNADEZ et al., 2005).

Testes de genotoxicidade buscam investigar o dano ao material genético de organismos expostos a determinados agentes, para isso pode-se utilizar o ensaio do micronúcleo. O MTA é menos genotóxico que os cimentos MTA Fillapex e AH Plus (BIN et al., 2012). Células tronco da papila apical são reconhecidas por apresentarem propriedades osteoindutoras no processo de reparo, fato importante é que o MTA branco é capaz de induzir em períodos mais curtos a migração e proliferação de uma população mista de células tronco da papila apical (SCHNEIDER et al., 2014).

Os métodos de experimentação *in vitro* geram importantes dados sobre a resposta de tipos celulares específicos, no entanto, não proporcionam uma avaliação geral a respeito de como a reação tecidual ocorreria nas condições de um organismo vivo. Testes *in vivo* geram informações mais completas e são

cl clinicamente mais relevantes quanto à resposta à longo prazo (BODRUMLU, 2008).

Experimentos *in vivo*

Vários modelos experimentais *in vivo* foram utilizados com a implantação do MTA em diferentes sítios em animais. O primeiro estudo utilizando o MTA, simulando a aplicação clínica, ocorreu em 1995 com a realização de obturação retrógrada com MTA e amálgama em pré-molares de cães da raça Beagle (TORABINEJAD et al., 1995). A resposta dos tecidos perirradiculares foi avaliada microscopicamente após 2 a 5 e 10 a 18 semanas. Os resultados demonstraram que houve menos inflamação do tecido perirradicular e maior formação de cápsula fibrosa sobre o MTA, além disso, a presença de cimento sobre o MTA também foi um achado constante. Em modelo experimental similar o MTA apresentou menor resposta inflamatória comparado ao cimento de óxido de zinco e eugenol (BERNABÉ et al., 2007). A resposta do tecido perirradicular de dentes de macacos submetidos a obturação retrógrada com MTA apresentando ausência de resposta inflamatória após 5 meses, conduziu à recomendação do MTA para uso em humanos (TORABINEJAD et al., 1997).

Dentre muitos estudos com diferentes metodologias empregadas, resultados conflitantes podem ser encontrados. Há relatos que o MTA provocou nos tecidos adjacentes, desde a formação de necrose até reação inflamatória de baixa intensidade (PARIROKH; TORABINEJAD, 2010). Também foi associado a este cimento a capacidade osteoindutora (KOH et al., 1997; HOLLAND et al., 1999). Dentre os estudos *in vivo* a avaliação da resposta tecidual foi muito experimentada por meio de implantes de MTA em tecidos subcutâneo e ósseo.

Avaliação em tecido subcutâneo

Guttuso (1963) realizou um estudo histopatológico para verificar a resposta inflamatória provocada por materiais endodônticos em tecido subcutâneo de ratos. O método de implantação de tubos de polietileno no referido tecido foi proposto por Torneck (1966), e, em 1981 Olsson et al., agruparam as duas metodologias citadas anteriormente para avaliar a resposta inflamatória de materiais endodônticos inseridos em tubos implantados no tecido subcutâneo. A Federação Dentária Internacional possui uma normatização para avaliação biológica de materiais dentários por meio de implantação em tecido subcutâneo (FDI 4.11, 1980), dentre as

recomendações estão os períodos experimentais de 7, 15, 30, 60 e 90 dias e quantificação de células inflamatórias por meio de escore.

Diversos estudos realizaram a avaliação microscópica da biocompatibilidade do MTA inserido em tubos de polietileno implantados no tecido subcutâneo de ratos. Nestes, lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) foram confeccionadas para avaliação microscópica descritiva e quantitativa, na qual de acordo com a quantidade de células inflamatórias contabilizadas, foram atribuídos escores para ausência ou presença de infiltrados inflamatórios de leve, moderada ou severa intensidade (MORETTON et al., 2000; SHAHI et al., 2006; VOSOUGHHOSSEINI et al., 2008; MARTÍNEZ et al., 2009; ZMENER et al., 2012). Outro método para avaliar histomorfométricamente a resposta inflamatória é por meio da quantificação da densidade em volume de tecido ocupado (MINOTTI et al., 2014).

A resposta inflamatória gerada pelos MTA's branco e cinza, pode ser controversa de acordo com o método e os diferentes períodos experimentais utilizados. Em estudo realizado em tecido subcutâneo, após 3 dias o MTA branco apresentou um menor infiltrado inflamatório que o MTA cinza. Já aos 7 dias o resultados foram opostos. Após 21 dias não houveram diferenças entre os grupos experimentais (SHAHI et al., 2006). Entretanto outro estudo aponta similaridade na resposta inflamatória entre os dois tipos de MTA (VOSOUGHHOSSEINI et al., 2008). De modo geral, o MTA gera um infiltrado inflamatório crônico de leve a moderada intensidade, que é gradualmente reduzido em função do tempo (HOLLAND et al., 2002; CAMILLERI; PITT FORD, 2006; BÓRIO et al., 2014).

A técnica de Von Kossa foi empregada em alguns estudos para detectar a presença de estruturas mineralizadas no tecido subcutâneo de ratos frente a implantação do MTA (HOLLAND et al., 1999; HOLLAND et al., 2002; BÓRIO et al., 2014), sendo constatada a presença de cristais mineralizados no tecido circunjacente ao material.

Avaliação em tecido ósseo

O primeiro relato da reação do tecido ósseo frente ao MTA foi de Torabinejad et al. (1995), com bons resultados para o MTA implantado em mandíbulas de cobaias. Em experimentação animal é possível utilizar sítios distintos em um mesmo animal, como implantação subcutânea e intraóssea para avaliar a biocompatibilidade

do MTA (MORETTON et al., 2000). No referido estudo as reações teciduais foram avaliadas microscopicamente após 15, 30 e 60 dias. No tecido subcutâneo o MTA causou reações severas com necrose de coagulação e calcificação distrófica no período inicial, porém as reações ficaram moderadas com o avançar do tempo. A osteogênese induzida pelo MTA somente foi observada na implantação intraóssea.

Em busca de uma simulação mais próxima da realidade clínica, outros estudos utilizaram tubos de polietileno preenchidos com MTA implantados em alvéolos de incisivos centrais de ratos para avaliar histomorfológica e histomorfométricamente a resposta inflamatória e a neoformação óssea (CINTRA et al., 2006; COSTA, 2008; GOMES-FILHO et al., 2011).

Gomes-Filho et al. (2011) avaliaram, por meio de análise histológica e por fluorescência a resposta do tecido alveolar de ratos com a implantação do MTA Angelus e de um MTA fotopolimerizável. Tubos de polietileno vazios foram utilizados como controle. Os tubos experimentais e controle foram inseridos nos alvéolos logo após a extração de incisivos centrais superiores. Em alguns animais de cada grupo foram injetados calceína após 7 dias, alizarina após 14 dias e oxitetraciclina após 21 dias. Passados 30 dias os animais foram eutanasiados e as hemimaxilas processadas histologicamente. Metade das amostras foram coradas com hematoxilina e eosina, sendo o restante corados com azul de Stevenel e vermelho alizarina para análise de fluorescência. O MTA fotopolimerizável apresentou resposta similar ao MTA, sendo caracterizada por resposta inflamatória de leve intensidade e completa formação óssea. Por meio da fluorescência, calcificações distróficas foram observadas somente no grupo do MTA Angelus.

Dosagem de citocinas

Citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular, secretadas por diferentes células. Quando liberadas interagem com receptores específicos da superfície celular sendo capazes de alterar sua função. Dessa forma estão associadas a mediação e regulação de importantes processos biológicos, dentre os quais pode-se incluir a proliferação, desenvolvimento, diferenciação, homeostase e reparo. Além disso, apresentam funções especialmente importantes como mediadoras da resposta inflamatória e imune do organismo frente a uma injúria, regulando a amplitude e duração das referidas respostas. Categorizadas como citocinas encontram-se as interleucinas, quimiocinas, fatores estimuladores e

inibidores de colônia e fatores de crescimento (ABBAS LICHTMAN; PILLAI, 2011; VIEIRA 2013).

Um paradigma corrente é que o balanço de citocinas é determinado pelos níveis relativos de citocinas anti e pró-inflamatórias. No entanto as citocinas são proteínas secretadas, e, sua ligação aos receptores específicos proporciona um sinal que faz a mediação de sua função. Os mecanismos rigorosamente controlados de sinalização de citocinas é essencial para assegurar uma resposta adequada (GARLET et al., 2006; GARLET et al., 2007).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias destaca-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), pois apresenta uma função central para estimular e regular as respostas imune e inflamatória. A perda do tecido ósseo decorrente de uma resposta inflamatória ocorre devido ao fato do TNF- α agir, tanto na redução da neoformação, quanto na reabsorção do tecido ósseo, pois o TNF- α atua modulando células precursoras e osteoblastos maduros, além disso eleva a formação e a atividade dos osteoclastos (GRAVES; COCHRAN, 2003).

Em relação às citocinas anti-inflamatórias, a interleucina 10 (IL-10), secretada por linfócitos T e B, apresenta um papel fundamental no controle homeostático das reações da imunidade inata e celular. Esta citocina além de inibir a produção de fatores osteoclastogênicos, ainda estimula a produção de seus respectivos antagonistas. A IL-10 apresenta um efeito inibitório na liberação de TNF- α , dessa forma interfere diretamente na resposta imune mediada pelo TNF- α , favorecendo assim, de forma indireta, a formação óssea (ABBAS LICHTMAN; PILLAI, 2011; VIEIRA, 2013).

O teste imunoenzimático denominado ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é um meio efetivo para detectar e dosar citocinas. Esse teste foi utilizado em experimentos nos quais avaliaram a influência do MTA quanto à expressão de citocinas anti-inflamatórias (HUANG et al., 2005; REYES-CARMONA et al., 2011) e pró-inflamatórias (HUANG et al., 2005; REYES-CARMONA et al., 2011; KRAMER et al., 2014). Em estudo *in vitro* avaliaram-se os efeitos do MTA, Super EBA e um cimento a base de hidróxido de cálcio sobre cultura de células ósseas e observaram-se que todos os materiais testados promoveram a expressão das citocinas IL-2 e IL-4, porém o MTA proporcionou uma maior expressão de IL-10 (HUANG et al., 2005).

O MTA é um material ao qual se credita a capacidade de estimular a dentinogênese e cementogênese. Dessa forma, Reyes-Carmona et al. (2011)

realizaram um estudo para avaliar a sinalização molecular promovida pelo MTA e o Ca(OH)_2 durante a resposta inflamatória e nos processos de reparo e biomineralização. Para o experimento, cilindros de dentina humana foram preenchidos com MTA e Ca(OH)_2 e implantados em tecido subcutâneo de camundongos. Após 12 horas e 1, 3, 7, 15, 30 e 60 dias os animais foram mortos para avaliar a quantificação das citocinas $\text{TNF-}\alpha$, IL-10 e IL-1 β , além da análise histológica e imunohistoquímica. De acordo com os resultados tanto o MTA quanto o Ca(OH)_2 modularam a expressão de citocinas pró-inflamatórias e ainda promoveram o aumento de IL-10 no tecido em contato com os materiais durante a fase aguda da resposta inflamatória. De acordo com os autores, ambos os materiais parecem ter um mecanismo de ação semelhante, porém o MTA proporcionou um ambiente mais favorável ao reparo nos períodos iniciais.

As citocinas $\text{TNF-}\alpha$ e IL-10 interferem no reparo ósseo alveolar por meio de mecanismos que controlam a migração de leucócitos, modulação de quimiocinas e expressão de marcadores osteogênicos, tanto em condições homeostáticas quanto infecciosas (VIEIRA, 2013).

2.5 Extratos de produtos naturais

Tradicionalmente produtos naturais foram e ainda são muito utilizados pela humanidade para o tratamento de diferentes patologias, seja de forma empírica ou embasado pela ciência.

Fitoterápicos são compostos terapêuticos obtidos exclusivamente de matérias primas ativas vegetais que apresentam eficácia e riscos conhecidos. A efetividade e segurança dos fitoterápicos são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações técnico-científicas em publicações ou ensaios clínicos fase 3 (ANVISA, RDC nº 48, de 16 de março de 2004).

Uma forma efetiva para utilização de fitoterápicos é por meio dos extratos, que devem ser preparados por um método de extração validado, utilizando um solvente adequado de modo a se obter uma concentração desejada da matéria prima. Extratos de produtos naturais como a própolis e fitoterápicos, dentre eles a *Arctium lappa* L. e a *Casearia sylvestris* SW., são utilizados em função de suas distintas propriedades farmacológicas.

Articum lappa L.

A *Arctium lappa* Linne, popularmente conhecida como bardana, é uma planta herbácea originária da Europa, com relatos de utilização desde à Grécia Antiga, sendo também muito utilizada em alguns países asiáticos, sendo consumida *in natura* e em extratos. No Brasil pode ser encontrada e cultivada em todo o território.

A planta apresenta um caule robusto e canelado podendo atingir até 2 metros de altura, suas folhas grandes são verdes na página superior e acinzentada na inferior. As flores de cor rósea a roxa são agrupadas em inflorescências, os frutos são acastanhados e a raiz é comprida e volumosa (TESKE; TRENTINI, 2001).

Com muitos princípios ativos, isolados a partir de diferentes partes da planta (raiz, folha e semente), a *Arctium lappa* L. é utilizada na medicina popular como fitoterápico por apresentar atividades biológicas e farmacológicas reportadas em relação às propriedades antibacteriana e antifúngica (PEREIRA *et al.*, 2005; GENTIL *et al.*, 2006), anti-inflamatória (ZHAO *et al.*, 2009), anti-alérgica, (KNIPPING *et al.*, 2008), diurética, antioxidativa, antiviral, antitumoral e por inibir a agregação plaquetária (TESKE; TRENTINI, 2001).

A atividade antimicrobiana do extrato bruto de folhas de *Arctium lappa* L., bem como de suas fases, foi avaliada por Pereira *et al.* (2005). O método de difusão em ágar permitiu a detecção da fase hexânica como inibitória do crescimento do *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Cândida albicans*. Ensaio de bioautografia identificaram substâncias antimicrobianas presentes no extrato. Os resultados demonstraram na fase hexânica bruta e em suas sub-frações, a presença de fatores de retenção em três zonas distintas, sugerindo a presença de ativos com estruturas químicas de diferentes polaridades, que exibiram especificidade contra os microrganismos alvos. Os autores concluíram que os constituintes de *Arctium lappa* L. apresentam um grande potencial de inibição contra os microrganismos avaliados.

Gentil *et al.* (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana da fração acetato de etila extraído da *Arctium lappa* em relação ao hidróxido de cálcio, utilizados como medicamentos intra-canais. Para o estudo, 27 dentes unirradiculados foram instrumentados, esterilizados e contaminados com uma suspensão de microrganismos em BHI composta por *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC10536), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4556),

Streptococcus mutans (ATCC 27175) e *Cândida albicans* (CBS – ICB/USP 562), ajustados para obter uma concentração aproximada de 6×10^8 unidade/mL. Após 5 dias de incubação, os canais foram preenchidos com os materiais experimentais e mantidos por 7, 14 e 30 dias. Amostras dos espécimes foram coletadas e o crescimento microbiano em placas com BHI, foi classificada com ausente, leve, moderado e severo. Após 7 dias os espécimes do grupo do extrato da *Arctium lappa* L. apresentaram crescimento severo, porém foi ausente nos períodos de 14 e 30 dias.

Os mecanismos essenciais da ação anti-inflamatória da *Arctium lappa* L. estão relacionados com a inibição da sintase induzida do óxido nítrico (iNOS) e da produção do óxido nítrico (NO), a supressão da expressão de citocinas pró-inflamatórias, a inibição do fator nuclear kappa B (NF-kB), a ativação de enzimas antioxidantes e a eliminação de radicais livres (Chan et al., 2010).

***Casearia sylvestris* SW**

A *Casearia sylvestris* SW é uma planta arbórea com altura entre quatro e seis metros, podendo chegar até 20 metros. Originária da América Latina, encontra-se desde o México até a Argentina, inclusive em todo território brasileiro. Popularmente é denominada como guaçatonga (TESKE; TRENTINI, 2001).

Em relação à sua composição química, apresenta como principais constituintes, óleos essenciais (terpenos e triterpenos), saponinas, ácidos graxos, taninos, resinas e flavonóides. Associa-se à *Casearia sylvestris* SW as propriedades anti-inflamatória, antibacteriana, fungicida, cicatrizante e diurética (TESKE; TRENTINI, 2001). A atividade antimicrobiana do extrato oleoso da *Casearia sylvestris* foi avaliada por Schneider et al. (2006) frente aos micro-organismos *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus* sp., *Shigella flexnerii*, *Enterobacter* sp., *Staphylococcus epidermitis*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp. O extrato inibiu todos os microrganismos testados, porém, foi mais eficaz contra bactérias Gram-positivas. Já Godoi (2013) avaliou o óleo essencial da *Casearia sylvestris* SW, que apresentou atividade antimicrobiana significativa frente às espécies de *Streptococcus* (*mutans*, *mitis*, *sanguinis* e *salivarius*), porém não foi eficaz contra *Enterococcus faecalis*.

A ação anti-inflamatória desse fitoterápico foi constatada em testes de edema de pata, tecido granulomatoso, permeabilidade vascular, teste de contorção, úlcera

gástrica induzida pelo estresse e avaliação da secreção gástrica (ESTEVEES et al., 2005). Este fitoterápico também apresenta ação antioxidante (ALBANO et al., 2013). O extrato em propilenoglicol da *Casearia sylvestris* SW quando associado ao hidróxido de cálcio, não interfere no pH e na liberação de íons cálcio da pasta (DUARTE et al., 2009).

Própolis

Própolis é nomenclatura aplicada para um composto de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, coletadas de flores, brotos e exsudatos de plantas pelas abelhas, as quais acrescentam enzimas contidas nas secreções salivares. O referido composto juntamente com cera, pólen e outras matérias orgânicas formam o produto final (MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998). A própolis quando em baixas temperaturas apresenta-se com um material lipofílico, duro e quebradiço, por outro lado, quando aquecida, torna-se macia, maleável e muito pegajosa. Possui um agradável e característico cheiro aromático. Já sua coloração é variável, sendo amarela, verde, marrom ou vermelha, dependendo da sua fonte e idade (MARCUCCI, 1995).

Basicamente, os compostos identificados nas própolis são oriundos de 3 fontes, sendo o exsudato da planta coletado pelas abelhas, substâncias metabólicas secretadas pelas abelhas e materiais que são introduzidos durante a elaboração da própolis (MARCUCCI, 1995). Dessa forma a composição química da própolis é muito variada, o que caracterizou que mais de 200 substâncias já foram identificadas em própolis de diferentes localidades. Dentre os principais componentes estão os flavonóides, ácidos fenólicos, ésteres e ácidos aromáticos, aldeídos, cetonas, alcoóis, ácidos graxos, terpenos, esteróides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, açúcares, vitaminas, minerais e vários outros compostos em quantidades menores (MARCUCCI 1995). Das referidas substâncias, os flavonóides e os ácidos fenólicos destacam-se, pois a estes são atribuídos grande parte das atividades biológicas constatadas para a própolis.

Devido à grande variabilidade é fundamental realizar a tipificação, processo que emprega marcadores químicos para caracterizar amostras de própolis provenientes de regiões geográficas distintas, sendo desta forma, possível padronizar as amostras. A própolis brasileira é caracterizada por apresentar baixas concentrações de flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos, que são típicos

compostos encontrados em própolis de regiões temperadas, porém, tem uma alta concentração de ácido di-hidroxicinâmico, acetofenonas prenilados e terpenóides específicos, todos possuindo atividade antimicrobiana (BANKOVA et al., 1995). Estudos foram realizados para comparar amostras de própolis provenientes de diferentes origens (KUJUMGIEV et al., 1999). Em relação ao potencial antimicrobiano, o efeito da própolis varia de acordo com a região geográfica e climática da coleta, sendo maior nas amostras oriundas de regiões com clima de florestas tropicais úmidas (SEIDEL et al., 2008).

Dentro da colmeia, a própolis é utilizada para funções fundamentais, como proteção física, térmica e antimicrobiana, de modo a manter um ambiente asséptico. A própolis é conhecida como um potente agente antibacteriano, antifúngico, antioxidante e anti-inflamatório (BURDOCK, 1998). Ainda associa-se a própolis as propriedades antivirótica, antiprotzoário, anestésica, cicatrizante, hepatoprotetora, imunoprotetora e antitumoral (MARCUCCI, 1995; SFORCIN, 2007). O extrato da própolis é uma substância com baixo potencial irritativo conforme demonstrado em estudos *in vitro* (AL-SHAHER et al., 2004) e *in vivo* (SILVA et al., 2004).

A própolis inibe o crescimento bacteriano por impedir a divisão celular, além disso, desorganiza o citoplasma, a membrana citoplasmática e a parede celular, gerando uma bacteriólise parcial com inibição da síntese de proteínas (TAKAISIKIKUNI; SCHILCHER, 1994). O extrato etanólico da própolis mostrou-se eficaz contra bactérias isoladas como *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces israelii*, *Clostridium perfringens* e *Enterococcus faecalis* (FERREIRA et al., 2007). O referido extrato também foi efetivo no controle de infecções polimicrobianas *in vitro*, quando associado com hidróxido de cálcio (DE REZENDE et al., 2008).

A atividade antibacteriana do extrato da própolis foi testada em dentina contaminada com *Enterococcus faecalis* em diversos estudos comparativos com outras substâncias antissépticas utilizadas na Endodontia. A própolis foi significativamente mais efetiva que o hidróxido de cálcio em períodos experimentais de 1 e 2 dias (AWAWDEH et al., 2009). O hidróxido de cálcio também foi menos efetivo quando avaliado com a metodologia de contaminação intratubular, durante 21 dias, pois a própolis inibiu o *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) em diferentes níveis de profundidade da dentina, sendo porém menos efetivo que as soluções de PVP-I 2% e clorexinida 2% em gel (KANDASWAMY et al., 2010).

O tempo de permanência da substância também é um fator influente no efeito antibacteriano. Madhubala et al. (2011) avaliaram a pasta de hidróxido de cálcio, pasta triantibiótica e do extrato etanólico da própolis utilizados como medicamentos em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*. A quantificação de unidades formadoras de colônia foram determinadas após 1, 2 e 7 dias. Os autores encontraram que a própolis foi significativamente mais efetiva que as duas pastas testadas após 1 e 2 dias. Após 7 dias seu efeito foi similar à pasta triantibiótica, sendo significativamente mais efetiva que a pasta de hidróxido de cálcio.

Em relação ao efeito antifúngico, Koo et al. (2000) encontraram, por meio do teste de difusão em ágar que o extrato alcoólico da própolis a 11% foi efetivo frente a *Cândida albicans* (NTCC 3736). Já Tyagi et al. (2013) realizaram a indução para formação de biofilme de *Cândida albicans* sobre dentina do canal radicular de pré-molares seccionados. Após a incubação por 2 dias foi colocado sobre o espécime 3mL de diferentes soluções durante 10 minutos. Foram criados 5 grupos experimentais sendo utilizado o extrato alcoólico da própolis a 11%, hipoclorito de sódio a 5%, soro e mais dois extratos alcoólicos de fitoterápicos. Após o tempo experimental, amostras foram semeadas em placas com ágar e Sabouraud, que foram incubadas para a contagem das unidades formadoras de colônias. De acordo com os resultados, os autores concluíram que o extrato da própolis foi um efetivo antifúngico.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da associação dos extratos da *Arctium lappa* L., *Casearia sylvestris* SW. e da própolis verde a 10% com o MTA branco em relação as seguintes propriedades:

- Físico-químicas, por meio dos testes de tempo de presa, escoamento, pH, liberação de íons cálcio e alteração volumétrica.
- Antimicrobiana, através dos testes de contato direto (*Enterococcus faecalis* e *Cândida albicans*) e descontaminação dentinária (*Enterococcus faecalis*).
- Biocompatibilidade, mediante a avaliação histológica descritiva e histomorfométrica em tecidos subcutâneo e alveolar de ratos. Além da análise microtomográfica e dosagem das citocinas TNF- α e IL-10 no tecido alveolar.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente o projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, resultando no processo número 028/2011 (anexo 1). O estudo foi dividido em três partes, compostas por testes físico-químicos, antimicrobianos e biológicos.

4.1 MATERIAIS UTILIZADOS

O MTA branco (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) foi manipulado associando-a à *Arctium lappa* L. (Bardana) em extrato aquoso e em propilenoglicol, à *Casearia sylvestris* Sw. (Guaçatonga) em extrato aquoso e em propilenoglicol e a própolis em extrato em propilenoglicol. Adicionalmente, o MTA manipulado com água destilada, foi utilizado como grupo de referência. Foram configurados os seguintes grupos (tabela 1):

Tabela 1 - Grupos experimentais

Grupo	Cimento	Veículo	Sigla
1	MTA branco	Extrato aquoso da <i>Arctium lappa</i> L.	BDA
2	MTA branco	80% água destilada + 20% extrato em propilenoglicol da <i>Arctium lappa</i> L.	BDP
3	MTA branco	Extrato aquoso da <i>Casearia sylvestris</i> Sw.	GTA
4	MTA branco	80% água destilada + 20% extrato em propilenoglicol da <i>Casearia sylvestris</i> Sw.	GTP
5	MTA branco	80% água destilada + 20% extrato em propilenoglicol da Própolis verde a 10%	P10%
6	MTA branco	Água destilada	H ₂ O

4.1.1 Preparo dos extratos da *Arctium lappa* L.:

As folhas de *Arctium lappa* L. foram coletadas na Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), localizada na Av. Rodrigues Alves, s/n – Bauru-SP, as quais foram identificadas no herbário da Universidade do Sagrado Coração de Bauru (USC).

Em seguida, foram submetidas ao processo de dessecação anatômica, secas até peso constante em estufa de ar circulante com temperatura controlada. Na sequência foram trituradas em moinho de facas. A partir do material obtido foram gerados os extratos. O extrato aquoso foi obtido com 180 mL de água destilada em 25 gramas do pó da planta, com temperatura controlada de até 50°C, para não se perder nenhum princípio ativo.

A outra forma de extrato foi preparada pelo método da maceração com utilização de propilenoglicol como solução extratora. Para isso a proporção de pó da planta foi de 25 gramas para cada 200 mL de solução extratora. Essa solução extratora permaneceu em contato com o pó durante 8 dias, onde sofreu agitação esporádica, sendo mantida em frasco de vidro âmbar, com temperatura ambiente de aproximadamente 25°C.

4.1.2 Preparo dos extratos da *Casearia sylvestris* Sw.:

Os extratos de *Casearia sylvestris* Sw. foram produzidos pelo laboratório farmacêutico Max Pharma (Com. e MP de insumos Farmac. LTDA, São Paulo), de acordo com as orientações da farmacopéia brasileira. As folhas de *Casearia sylvestris* Sw. foram submetidas ao processo de dessecação anatômica, até peso constante, em estufa de ar circulante, com temperatura controlada e trituradas em moinho de facas antes de serem usadas no preparo do extrato.

Os extratos aquoso e em propilenoglicol foram obtidos da mesma forma como referido no fitoterápico anterior.

4.1.3 Análises e preparo do extrato da própolis

Os procedimentos para análise química da própolis utilizada e a produção de seu extrato em propilenoglicol foram realizados no laboratório de Farmácia da Universidade Anhanguera de São Paulo, sob orientação da Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro.

Cinquenta gramas de própolis verde bruta, foram utilizadas para o preparo do extrato etanólico por meio de um extrator Soxhlet. Para realizar o procedimento, cada Soxhlet recebeu um cartucho de celulose com 8 gramas da própolis bruta pulverizada, juntamente com 150 mL de etanol em ebulição, permanecendo conectado ao sistema do extrator durante 24 horas. Em seguida o extrato foi resfriado e a cera foi removida com etanol gelado e dupla filtragem em filtro vegetal. O filtrado foi concentrado em um evaporador rotativo até se obter o extrato mole, também denominado como extrato etanólico de própolis (EEP).

O extrato propilenoglicólico da própolis a 10% foi obtido a partir do extrato mole diluído em propilenoglicol, utilizando um balão volumétrico para atingir a concentração desejada.

A própolis utilizada no estudo foi analisada quimicamente quanto ao seu teor de substâncias fenólicas (fenóis e flavonoides) através da cromatografia líquida de alta eficiência. Também foi avaliada a quantidade de sólidos solúveis, umidade, cinzas e cera. Sua atividade antioxidante foi constatada por meio do ensaio do DPPH, método que consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila.

4.1.3.1 Qualidade do extrato da própolis

Após a análise da composição, a própolis utilizada no estudo pode ser considerada dentro dos padrões recomendados pelo Ministério da Agricultura (anexo 2). Com uma concentração adequada de substâncias fenólicas (fenóis e flavonóides), assim como uma satisfatória atividade antioxidante constatada com o ensaio do DPPH (anexo 2).

4.2 TESTES FÍSICO-QUÍMICOS

Para a realização dos testes físico-químicos, a manipulação do MTA foi realizada seguindo a proporção de 1g de pó para 0,3 mL de líquido. Quando foi necessário fracionar a quantidade de pó, este foi pesado em balança analítica eletrônica (Ohaus Adventurer, Parsippany, Estados Unidos) e o líquido

proporcionado com auxílio de uma micropipeta, sempre mantendo a referida proporção.

4.2.1 Tempo de presa

Para determinar o tempo de presa, foram seguidas as normas ASTM C266/08 para os pesos das agulhas e a ISO 6876/2001 (ISO, 2001) para a confecção dos corpos de prova. Os cimentos de cada grupo, logo após serem manipulados, foram acondicionados em anéis metálicos com 10mm de diâmetro interno e 2mm de espessura. Foram confeccionados cinco corpos de prova para cada grupo, mantidos a uma temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade a $95\% \pm 5\%$.

A primeira mensuração foi realizada a partir de 180 segundos após a manipulação, utilizando a agulha de Gilmore de 113,4g, exercendo pressões verticais nos corpos de prova. O tempo de presa inicial foi determinado a partir do momento em que essa agulha não produziu mais marcações no corpo de prova. Em seguida, do mesmo modo, foi aplicada a agulha de Gilmore de 453,6g para se determinar o tempo de presa final. Os valores do tempo de presa inicial e final foram computados em minutos para análise estatística. Na figura 1 encontra-se as agulhas utilizadas e a forma de mensuração com as mesmas.

4.2.2 Escoamento

Para realizar o teste de escoamento foram seguidas as recomendações da norma ISO 6876/2001 (ISO, 2001), para isso os cimentos de cada grupo, após a manipulação, foram levados sobre uma placa de vidro, por meio de seringa, em um volume total de 0,5 mL. Decorridos três minutos após o início da manipulação do cimento, outra placa de vidro com peso de $20 \pm 2\text{g}$ foi colocada sobre o cimento, ficando este, entre duas placas. Adicionalmente um peso de 100g foi colocado sobre esse conjunto. O peso e a placa sobre o cimento foram removidos após 10 minutos, contados a partir do início da manipulação dos materiais.

O disco formado pelo cimento foi fotografado juntamente com uma régua (figura 2). As imagens foram avaliadas utilizando o software Image J (NIH, Bethesda, Estados Unidos), calibrado com a escala fornecida em mm pela régua, no qual foi mensurado o perímetro do corpo de prova. Foram utilizadas três amostras para cada grupo estudado.

Figura 1 – (A) Agulhas de Gilmore utilizadas no teste de tempo de presa. (B) Uso da agulha de 113,4g. (C) Uso da agulha de 453,6g.

Figura 2 – Interface do programa Image J utilizado para avaliar o perímetro dos corpos de prova.

4.2.3 pH e liberação de íons cálcio

Para aferição do pH e liberação íons cálcio, 60 dentes de acrílico foram empregados, neles foram confeccionadas cavidades retrógradas com 3mm de profundidade utilizando uma ponta esférica diamantada 1012 (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) em baixa rotação. As retro-cavidades foram preenchidas com cimento de cada grupo (figura 3) com o emprego de um aplicador de MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil). Para cada grupo, foram utilizadas 10 amostras, imersas

individualmente em um frasco de vidro com tampa contendo 10 mL de água ultra pura. Como ato preventivo, toda a vidraria empregada no teste foi previamente tratada com ácido nítrico, para evitar possíveis interferências. Os frascos contendo as amostras foram levados à estufa a 37°C, sendo mantidos durante o período experimental determinado em 3 horas, 1, 3, 7 e 15 dias.

Decorrido cada período a amostra foi transferida para um novo frasco contendo 10 mL de água ultrapura. Da água onde o espécime estava imerso, foi aferida quanto ao pH e o cálcio liberado.

Leitura do pH

Para calibragem do peagômetro, soluções de pH conhecido (4, 7 e 14) foram aferidas. O frasco onde estava a amostra foi levado a um agitador durante 5 segundos, e em seguida foi inserido o eletrodo do peagômetro para ser realizado a mensuração do pH. Como controle foi utilizado água deionizada, sendo medido seu pH em todos os períodos experimentais. O procedimento foi realizado em um ambiente com temperatura controlada, à 25°C.

Liberação de íons cálcio

A liberação de íons cálcio foi mensurada por meio de um espectrofotômetro de absorção atômica equipado com uma lâmpada de cátodo oco específica para o cálcio. As condições para o uso do aparelho foram determinadas seguindo as instruções do fabricante, usando um comprimento de onda de 422.70 nm, intervalo de 2.0 L por minuto, suportada pelo ar. Os períodos avaliados foram os mesmos empregados na análise do pH.

Para prevenir possíveis interferências de metais alcalinos, uma solução de lantânio (na qual foram diluídos 9,8g de cloreto de lantânio em 250 mL de solução ácida) foi preparada. Uma solução estoque de cálcio foi preparada diluindo-se 2,4972g de carbonato de cálcio em 50 mL de água deionizada. A essa solução foi adicionada, gota a gota, 10 mL de ácido clorídrico concentrado que, posteriormente foram diluídos em 1000 mL de água MiliQ. Desta forma 1 mL desta solução correspondeu a 1mg de cálcio. Com esta solução, foram preparadas as soluções padrões de cálcio, sendo: 20mg/L, 10mg/L, 5mg/L, 2,5mg/L e 1,25mg/L.

Durante a leitura, 8 mL das soluções padrões ou da água das amostras foram associados a 2 mL da solução de cloreto de lantânio. Para o branco, 6 mL de água ultra pura foram associados à mesma quantidade (2 mL) da solução de cloreto de

lantânio. Com os padrões, o branco e as amostras preparadas, a leitura no espectrofotômetro de absorção atômica foi efetuada.

Para levar o aparelho a zero de absorbância, a solução de ácido nítrico foi empregada. Os cálculos da liberação de íons cálcio foram efetuados por meio da equação da reta da curva padrão, e os valores obtidos foram submetidos à análise estatística.

4.2.4 Alteração volumétrica

A alteração volumétrica foi proposta como uma nova metodologia para avaliar a solubilidade do cimento. Esta propriedade foi avaliada com imagens tridimensionais obtidas por micro-tomografia computadorizada, a qual foi validada por meio de um estudo piloto anterior (CAVENAGO et al., 2014). Para isso 60 dentes de acrílico foram utilizados (n=10), nos quais foram confeccionados retro-cavidades que foram preenchidas com os cimentos, da mesma forma como realizado no teste de pH e liberação de íons cálcio. Após a inserção do cimento, os espécimes foram escaneados utilizando o micro-tomógrafo SkyScan 1174 (SkyScan, Kontich, Bélgica). Foram adotados como parâmetros de escaneamento 50 kV, 800 μ A, tamanho de voxel de 9.47 μ m com intervalo de rotação de 1.0 grau e 360 graus de rotação. Foi possível escanear 4 espécimes simultaneamente.

Cada escaneamento resultou em 360 imagens com extensão TIF, as quais foram reconstruídas por meio do programa NReconv1.6.4.8 (SkyScan) e analisadas pelo programa CTan v1.11.10.0 (SkyScan). Neste, as quatro amostras presentes na imagem foram individualmente delimitadas e exportadas para uma nova pasta. Cada amostra foi binarizada, mantendo as devidas proporções com a imagem radiográfica (figura 4) para, em seguida, calcular-se o volume (mm^3) do material.

Após o escaneamento, cada espécime foi individualmente imerso em um frasco com 15 mL de água ultra pura e mantido a 37°C durante 7 dias. Passado esse período, as amostras foram removidas dos frascos e escaneadas novamente. Foram seguidos os mesmos parâmetros inicialmente adotados para o escaneamento, reconstrução e análise das imagens. Assim, a alteração volumétrica foi calculada subtraindo-se do valor do volume inicial o valor do volume final. O dados foram convertidos em porcentagem para análise estatística do material solubilizado, dividindo-se o valor das diferenças entre os volumes pelo valor do volume inicial e multiplicando este resultado por 100.

Figura 3 – Dente de acrílico e retrocavidades preenchidas com cimento, conforme corpos de prova utilizados para os testes de pH, liberação de íons cálcio e alteração volumétrica.

Figura 4 – Imagens tridimensionais de amostras de MTA manipuladas com *Arctium lappa* L. em extrato aquoso (A) e em propilenoglicol (B), *Casearia sylvestris* Sw. em extrato aquoso (C) e em propilenoglicol (D), própolis (E) e água destilada (F), tanto inicial (fileira superior) quanto após 7 dias de imersão em água (fileira inferior).

4.3 TESTES ANTIMICROBIANOS

Cepas padrão American Type Culture Collection (ATCC) foram utilizadas, empregando duas espécies de micro-organismos, o *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Cândida albicans* (ATCC 10231). Para o crescimento bacteriano foi utilizado o meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI, Difco, BD, Sparks, MD, EUA),

já para a levedura foi utilizado o meio Sabouraud – 2% Dextrose (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Os meios de cultura foram proporcionados de acordo com as instruções dos fabricantes. A pureza das culturas foram confirmadas pelo método de coloração de Gram e pela morfologia das colônias cultivadas em placas de Petri com BHI e ágar ou Sabouraud e ágar.

4.3.1 Método do contato direto

Este método foi empregado para promover o contato direto dos cimentos avaliados com o *Enterococcus faecalis* e a *Cândida albicans*, por meio de cultura em caldo, de modo a verificar o potencial inibitório.

Enterococcus faecalis

Inicialmente, os meios de cultura em caldo (BHI) e os meios sólidos (BHI e ágar) foram preparados conforme as instruções do fabricante e esterilizados em autoclave. Tubos de ensaio foram preenchidos com 3 mL de caldo BHI esterilizado e placas de Petri de 15 x 150 mm foram preenchidas com 20 mL de uma solução contendo BHI e 15% de ágar, sendo armazenadas em geladeira a 2°C, até o momento do seu uso.

Cepas de *Enterococcus faecalis* foram cultivadas em caldo BHI e mantidas em estufa de cultura (Orion 502, FANEM Ltda., São Paulo, SP, Brasil) a 37°C, durante 24 horas. Após o referido período, por meio de um espectrofotômetro (1105, Bel Photonics do Brasil Ltda., Osasco, SP, Brasil) ajustado em comprimento de onda de 540nm, a concentração do inóculo foi calculada, com base na escala de MacFarland, de modo a conter uma suspensão microbiana equivalente à 5×10^4 UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mL).

Todos os procedimentos experimentais foram realizados dentro de uma câmara de fluxo laminar (Filterflux, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Após a manipulação do MTA com seu respectivo veículo, o cimento foi inserido em um mini tubo de vidro esterilizado. Tubos de ensaio com BHI esterilizado receberam uma amostra de cimento juntamente com o inóculo padronizado. Foram preparados 5 tubos para cada grupo, sendo um controle negativo, onde não foi utilizado o inóculo, apenas o cimento em teste. Como controle positivo, três tubos receberam somente o inóculo. Os tubos foram armazenados em estufa de cultura a 37°C para permitir o crescimento microbiano. Foram estabelecidos 5 períodos experimentais, sendo os

meios de cultura checados quanto à turbidez em espectrofotômetro e plaqueados em meio sólido após 7, 12, 24, 48 e 168 horas da realização do experimento.

De acordo com o estudo piloto, foi determinado a necessidade da diluição do meio de cultura para se obter um número de unidades formadoras de colônia (UFC) passíveis de contagem. Para isso, amostras do meio foram diluídas a 10^{-5} em caldo BHI. Para a diluição, cada tubo contendo o meio de cultura e a amostra de cimento foi agitado em um vórtex (Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil), em seguida foram retirados 100µL do seu conteúdo e colocados em um microtubo contendo 900µL de BHI esterilizado. Esse microtubo foi agitado no vórtex, e dele retirados 100µL, que foram inseridos em um novo microtubo contendo 900µL de BHI esterilizado. Esse procedimento foi repetido mais três vezes para se obter uma diluição de 10^{-5} , desse último microtubo foi retirado 20 µL que foram semeados, com o uso de uma alça de Drigalski, em uma placa de Petri contendo meio sólido, previamente identificada.

As placas foram armazenadas em estufa de cultura bacteriológica a 37°C, sendo avaliadas após 24 horas e realizada a contagem das unidades formadoras de colônias presentes em cada placa após 48 horas.

Cândida albicans

O teste de contato direto empregando a *Cândida albicans* foi realizado da mesma forma que anteriormente descrito, porém, com algumas variações para adequar-se às condições da levedura. O meio de cultura utilizado foi o Saboraud em caldo, já a concentração do inóculo utilizada foi de 3×10^8 UFC/mL. Foram adotados 4 períodos experimentais (10, 24, 48 e 168 horas). Também foi necessária uma diluição do meio de cultura das amostras antes do plaqueamento das mesmas. Neste caso, foram diluídas a 10^{-3} em caldo Sabouraud.

A contagem das unidades formadoras de colônias presentes em cada placa foi realizada após 48 horas de armazenagem em estufa. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística.

4.3.2 Método de descontaminação dentinária

Essa metodologia foi aplicada para avaliar a capacidade antibacteriana dos cimentos estudados em dentina contaminada com *Enterococcus faecalis*.

Preparo dos cilindros de dentina

Para realizar o teste foram utilizados 70 incisivos bovinos recém-extraídos. De cada dente foi removido um segmento radicular de 3 mm (figura 5). Para isso, foi utilizado um disco diamantado montado em máquina metalográfica de corte (ISOMET1000, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA) para seccionar e descartar os 3 mm finais da raiz. A partir desse ponto foi realizado outro corte com 3 mm em sentido coronal.

Os canais radiculares foram padronizados com a instrumentação até a lima manual tipo K nº 120 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). Para promover a remoção das raspas dentinárias oriundas do processo de instrumentação, os espécimes foram imersos em solução de EDTA a 17% (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Ibiporã, PR, Brasil) durante 5 minutos. Em seguida foram abundantemente lavados com água destilada e mantidos sobre papel filtro para secagem.

Com o objetivo de promover uma contaminação dos túbulos dentinários somente via canal, a superfície externa dos cilindros de dentina foi impermeabilizada com duas camadas de esmalte para unha (Colorama, São Paulo, Brasil) (figura 5), sendo estabelecido um tempo de secagem de 24 horas. Após o preparo, os cilindros de dentina foram acondicionados em microtubos tipo eppendorf de 1,5 mL (Axygen® Scientific, Union City, CA, EUA) e esterilizados em autoclave a 121°C.

Contaminação dos cilindros de dentina

Cepas de *Enterococcus faecalis* foram cultivadas em 5 mL de caldo BHI esterilizado e mantidas em estufa de cultura a 37°C durante 24 horas. Para realizar o processo de contaminação foi seguido o protocolo proposto por Ma et al. (2011), realizando-se algumas modificações conforme sugerido por Arias (2013), Maliza (2013) e Andrade et al. (2015).

No primeiro dia do protocolo de contaminação foi realizado o preparo do inóculo. Para isso, a absorbância dos tubos com cultura em crescimento foi medida, utilizando um espectrofotômetro (1105 BEL Photonics do Brasil, Osasco, SP, Brasil) ajustado com comprimento de onda de 540nm. Os resultados obtidos foram comparados à escala de MacFarland para verificar sua concentração. Em um frasco contendo BHI esterilizado foi adicionado um volume calculado do caldo com *Enterococcus faecalis* para ajustar o inóculo a uma concentração de 3×10^8 UFC/mL.

Este inóculo foi armazenado em estufa de cultura a 37°C durante 7 horas, para que ocorresse o crescimento exponencial dos microrganismos. Após o referido período, utilizando uma câmara de fluxo laminar, 800µL de BHI esterilizado foram adicionados em cada microtubo contendo um espécime, e, em seguida, estes foram levados a uma cuba ultrassônica (Odontobras, Ribeirão Preto, SP, Brasil) durante 15 minutos com o intuito de promover uma reidratação dos espécimes, bem como possibilitar uma adequada penetração do meio de cultura nos túbulos dentinários.

Em seguida, o BHI utilizado em cada microtubo foi removido e 800µL do inóculo foram adicionados. Os microtubos foram levados a uma centrífuga (Eppendorf 5417R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) para a realização de uma sequência de centrifugações, realizadas em duplicata, nas velocidades 1400g, 2000g, 3600g e 5600g, durante 5 minutos a 25°C. O inóculo foi renovado após cada centrifugação. Ao final das 8 centrifugações, o inóculo foi removido e 800µL de BHI esterilizado foram adicionados. Em seguida, uma única centrifugação a 3600g foi realizada durante 5 minutos à temperatura de 25°C. Os microtubos foram armazenados em estufa a 37°C durante 24 horas.

No segundo dia do protocolo de contaminação, o meio de cultura foi removido dos microtubos e 800µL de BHI esterilizado foram adicionados sendo, em seguida, realizada uma centrifugação a 3600g durante 5 minutos a 25°C. Os microtubos foram novamente armazenados em estufa a 37°C durante 24 horas.

No terceiro dia, o inóculo e todos os ciclos de centrifugação foram realizados da mesma forma como no primeiro dia. Já no quarto dia o procedimento foi o mesmo que o realizado no segundo dia. No quinto dia, os cilindros de dentina encontravam-se aptos para receber as amostras dos cimentos experimentais. A figura 6 representa o protocolo de contaminação.

Preparo dos espécimes

Em uma câmara de fluxo laminar, os cilindros de dentina contaminados foram removidos do meio de cultura e colocados sobre um papel filtro esterilizado.

Sobre uma placa de vidro esterilizada, o MTA foi proporcionado e manipulado com seu respectivo veículo. O cilindro de dentina foi posicionado sobre outra placa de vidro e o cimento foi inserido em toda a extensão do canal com o auxílio de um porta MTA (Angelus, Londrina, Brasil), totalizando 10 espécimes para cada grupo experimental. Adicionalmente 10 espécimes não receberam cimento, permanecendo

como grupo controle. Em seguida, os espécimes foram colocados em microtubos de 1,5 mL esterilizados e devidamente identificados, sendo armazenados em estufa de cultura a 37°C. Foram estabelecidos os períodos experimentais de 24 e 168 horas.

Análise microscópica

Após cada período experimental os respectivos espécimes foram seccionados longitudinalmente utilizando uma máquina de corte com disco diamantado refrigerado com solução fisiológica esterilizada. Para a remoção das raspas dentinárias geradas pelo corte os espécimes foram imersos em EDTA a 17% durante 5 minutos, logo após foram imersos em soro fisiológico.

Uma hemi-parte de cada espécime foi selecionada e corada com 30µL de LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) durante 10 minutos. O referido kit contém o corante verde SYTO®9, que marca bactérias vivas e o corante vermelho iodeto de propídio, que marca as bactérias mortas. Após o tempo de contato com o corante, os espécimes foram colocados sobre uma lâmina de vidro com óleo de imersão e levados para o microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS-SPE, Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha). O escaneamento de cada espécime foi realizado com a objetiva de 40X, com intervalo de 1µm de profundidade e resolução de imagem de 1024 x 1024 pixels. Foram obtidas imagens de seis campos (Figura 7), adquiridas com o programa Leica Application Suite-Advanced Fluorescence (LAS AF, Leica Mannheim, Alemanha).

As imagens foram analisadas por meio do programa bioImageL v2-1 (CHÁVEZ DE PAZ, 2009) que gerou como resultados as porcentagens e o biovolume de bactérias vivas e mortas, baseado na fluorescência verde e vermelha respectivamente. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente.

Figura 5 - Cilindros de dentina radicular bovina, preparados para o experimento.

Figura 6 - Representação do protocolo de contaminação, troca do inóculo e centrifugação.

Figura 7 - Espécime preparado para avaliação no microscópio confocal de varredura laser. Os quadros amarelos representam os campos nos quais foram obtidas as imagens.

4.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA BIOLÓGICA

4.4.1 Animais de experimentação

Para avaliar a biocompatibilidade dos cimentos em estudo, 162 ratos da linhagem Wistar (*Rathus norvegicus*), machos, adultos, com peso entre 250 e 300 gramas, oriundos do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP foram utilizados. Somente animais que apresentavam funções vitais normais foram utilizados, estes foram mantidos em gaiolas plásticas coletivas, com cinco animais cada, receberam água e ração comercial balanceada *ad libitum*. Essas gaiolas foram mantidas em uma sala do Biotério com temperatura controlada ($23\pm1^{\circ}\text{C}$) e em regime de fotoperíodo 12/12 horas (período claro começando às 07:00h). O protocolo para experimentação em animais foi realizado segundo os princípios éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Anestesia

Os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de xilazina (Anasedan[®], Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil) e cloridrato de ketamina (Dopalen[®], Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil) por meio de injeção intramuscular. Essas substâncias foram empregadas na proporção de um para um, na concentração de 0,1mL de solução para cada 100g de peso do animal.

Delineamento do experimento

Para avaliar a resposta biológica, o MTA e suas associações foram implantados em dois sítios distintos, tecido subcutâneo e ósseo, conforme realizado por Moretton et al. (2000), porém neste estudo cada animal recebeu dois implantes subcutâneos e um alveolar. Adicionalmente, amostras do tecido alveolar foram processadas para análise da liberação de citocinas pelo teste ELISA.

4.4.2 Avaliação em tecido subcutâneo

Tubos de polietileno

Foram utilizados 324 tubos de polietileno (Embramed Ind. Com. Ltda. – São Paulo – SP – Brasil) com 1,5mm de diâmetro interno, 2mm de diâmetro externo e 10mm de comprimento, os quais foram esterilizados com óxido de etileno (ACESSIL. Central de Esterilização Com. Ind. Ltda – Campinas – SP – Brasil).

Preparo dos implantes

Os cimentos manipulados sobre uma placa de vidro estéril, de acordo com o grupo experimental, foram colocados nos tubos de polietileno com auxílio de uma espátula de inserção e condensadores endodônticos (Maillefer, Ballaigues, Suíça), de modo a preencher toda a extensão do tubo com o total selamento de suas extremidades.

Grupos experimentais

Os 162 ratos foram divididos em 6 grupos, com 9 animais para cada período experimental (15, 30 e 60 dias). Cada animal recebeu dois implantes (implantes A e B), contendo cimento de grupos distintos.

Procedimentos cirúrgicos

Após a anestesia foi realizada a tricotomia do dorso dos animais e antissepsia desta região com solução de iodopovidona (Rioquímica Indústria Farmacêutica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil).

Em seguida foi realizada uma incisão longitudinal com uma extensão de aproximadamente 15mm na região mediana do dorso de cada animal com lâmina de bisturi nº15 (Embramac – Empresa Brasileira de Materiais Cirúrgicos Ltda., Itajaí, SC, Brasil). Os tubos de polietileno preenchidos com os cimentos foram posicionados dentro da cânula de um Trocarte (Figura 8) e esse foi introduzido com movimentos de cateterismo com leve pressão, divulsionando os tecidos até atingir uma profundidade de 18 mm, onde o tubo foi depositado.

Os implantes foram cuidadosamente depositados perpendiculares à linha de incisão, sendo um para o lado esquerdo e outro para o lado direito do dorso do animal. As bordas das incisões foram suturadas com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Produtos Profissionais Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil). Em seguida uma nova antissepsia desta região com solução de iodopovidona foi realizada.

Para a identificação dos animais foram realizadas marcações por meio de perfurações na orelha de acordo com um método universal utilizando um perfurador Ainsworth (Duflex – SSWhite – Rio de Janeiro – Brasil).

Obtenção das amostras e procedimentos histotécnicos

Decorridos os períodos experimentais os animais foram eutanasiados com dióxido de carbono (CO₂). Para esse método foi utilizada uma câmara de acrílico previamente saturada com CO₂. Os animais foram colocados na caixa e mantidos sob inalação de CO₂ até constatação da morte.

Na sequência foi realizada a tricotomia da região dorsal e os tubos implantados foram localizados por palpação. A área do local do implante foi dissecada com lâmina de bisturi nº 15 (figura 9) juntamente com uma margem de tecido ao redor do implante. A peça contendo tecido cutâneo, corpo de prova e tecido subcutâneo, foi distendida em papel cartão e fixada em solução de formol tamponado a 10% (Merck KGaA – Germany) em frascos unitários com identificação do animal, grupo e período experimental correspondente.

Após sete dias de fixação, as peças foram recortadas com navalha para a remoção do excesso de tecido e lavadas em água corrente por 24 horas. Os tubos de polietileno foram cuidadosamente removidos realizando-se uma incisão firme e única com lâmina de bisturi nº 11 em uma das laterais do tubo. Com o auxílio de uma pinça clínica foi desprendido o tecido ao redor do tubo com especial atenção às extremidades. Para a desidratação, as peças foram armazenadas em álcool 70% por um período de 2 dias, em seguida foram submetidas a 3 banhos com álcool absoluto. Para a diafanização dos tecidos as peças foram armazenadas em xilol. Em seguida as amostras foram banhadas e incluídas em Histosec (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) que é composto por parafina e resina plástica.

As peças incluídas foram cortadas em micrótomato rotativo automático Leica RM2265 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), obtendo cortes semi-seriados com 5 micrometros de espessura, estendidos em banho Maria (40 a 50°C) e fixados em lâminas de vidro. De cada peça foram obtidas três lâminas, com quatro cortes cada uma. Os cortes foram feitos no sentido longitudinal do tubo, para se obter as duas extremidades do mesmo. As lâminas foram coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina (figura 10).

Para analisar a reação provocada no tecido subcutâneo foram realizadas avaliações das lâminas por meio de um microscópio óptico (LeitzAristoplan – Germany), utilizando as extremidades do tubo implantado, na interface de contato do cimento com os tecidos. Uma face lateral do tubo foi utilizada como controle. Foram realizadas análises histológica descritiva e histomorfométrica.

4.4.2.1 Análise histológica descritiva

A análise histológica descritiva foi realizada por meio de uma descrição corrente dos fenômenos microscópicos vinculados à reação tecidual frente ao material testado, considerando o infiltrado inflamatório e os fenômenos correlatos, reparo e as características dos materiais remanescentes. As lâminas foram avaliadas por meio do microscópio óptico com objetivas de aumentos de 4x e 40x.

4.4.2.2 Análise histomorfométrica

Dois cortes foram eleitos em cada lâmina para realizar a histomorfometria em 6 campos microscópicos distintos da região capsular em contato com os materiais testados. Para execução da análise histomorfométrica foram considerados como parâmetros histológicos o tecido conjuntivo (fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos), infiltrado inflamatório (células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares) e outras estruturas (substância fundamental amorfa e corpos estranhos) presentes no tecido conjuntivo capsular reacional. As estruturas constituintes do tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório foram analisadas individualmente e em conjunto.

Para a análise microscópica foi utilizada uma objetiva de imersão com o aumento de 100x e uma lente ocular de compensação ZEISS kpl 8x (Carl-Zeiss Micro Imaging Inc.) contendo um retículo de integração II ZEISS (Carl-Zeiss). O referido retículo é constituído por 10 linhas paralelas sucessivas, divididas igualmente por 10 pontos, formando um sistema de 100 pontos em uma área quadrangular.

A imagem do retículo foi sobreposta, sucessivamente, em todos os campos histológicos avaliados, dessa forma foram contabilizadas as estruturas que coincidiram com os pontos do retículo.

Para cada parâmetro histológico avaliado foi calculada a densidade de área, (D_a) empregando a fórmula $D_a = 100 \times (\Sigma P_i / \Sigma P)$. Na referida fórmula P_i foi a quantidade dos pontos coincidentes sobre as estruturas consideradas e P foi o número total de pontos existentes no retículo.

Figura 8 – Incisão (A) e inserção do tubo por meio de trocarte (B).

Figura 9 – Implante no tecido subcutâneo.

Figura 10 – Corte histológico de um implante no tecido subcutâneo corado com H&E.

4.4.3 Avaliação em tecido ósseo

Tubos de polietileno

Foram utilizados 162 tubos de polietileno (Laboratório Abbott do Brasil – São Paulo – SP – Brasil) com 1,0mm de diâmetro interno, 1,6mm de diâmetro externo e 3,0mm de comprimento. Uma das extremidades do tubo foi preenchida com gutapercha na extensão de 1mm, com o propósito de evitar o deslocamento dos materiais durante a introdução do tubo.

Preparo dos implantes

Os cimentos foram preparados da mesma forma que realizado para os implantes de subcutâneo, sendo introduzidos na extremidade livre do tubo preenchendo os 2mm restantes.

Grupos experimentais

Os 162 animais foram divididos em 7 grupos, com 144 animais para os 6 grupos experimentais divididos entre os períodos de 15, 30 e 60 dias (n=8). Como controle 18 animais receberam tubos de polietileno vazios. Cada animal recebeu um implante no alvéolo superior direito.

Procedimentos cirúrgicos

Após o procedimento para a implantação subcutânea, com os animais ainda profundamente anestesiados foi realizada antissepsia da área cirúrgica com solução de iodo tópico, para realizar a extração do incisivo superior esquerdo. Um instrumento adaptado (esculpidor Hollemback 3S, Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi utilizado para desinserção dos tecidos moles e luxação do dente, atentando-se para preservar a margem gengival permitindo, posteriormente, uma sutura adequada. Com uma pinça adaptada foi realizada a apreensão e extração do dente.

O tubo de polietileno foi inserido com a extremidade contendo o cimento, voltada para o fundo do alvéolo, esse procedimento foi inicialmente realizado com uma pinça reta, para a inserção do tubo no terço cervical. Já para inserção no terço médio e apical foi utilizado um instrumento adaptado à curvatura e diâmetro do alvéolo. Após a implantação dos tubos foi realizada a sutura utilizando fio de seda 4.0 (Figura 11).

Obtenção das amostras e processamento histotécnico

Após a eutanásia, as maxilas dos animais foram removidas com o auxílio de uma serra. Cada peça foi dissecada removendo-se os tecidos em excesso com o uso de uma lâmina de bisturi número 15. Do total de animais por grupo em cada período experimental, três foram reservados para o teste ELISA sendo radiografadas as maxilas para confirmar a presença do tubo no alvéolo. Em seguida, as maxilas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido (figura 12), e então mantidas em um freezer a -80°C até o momento do experimento. O restante das amostras foram imersas em formol tamponado a 10%, pH 7,2, mantendo-as por uma semana.

As peças, após serem imersas em formol foram escaneadas por microtomografia computadorizada, para posterior análise descritiva. Ao término do procedimento anterior as amostras foram submetidas ao processamento histotécnico de rotina, sendo lavadas em água corrente durante vinte e quatro horas para a remoção do excesso de fixador, prosseguindo-se com a desmineralização em solução de EDTA 4,13% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) renovada semanalmente, pelo período de 50 dias. Para avaliar o grau de desmineralização das peças, tomadas radiográficas convencionais no sentido longitudinal dos alvéolos foram realizadas, a uma distância de 30 cm, com tempo de exposição de 0,3 segundos, com filmes radiográficos oclusais (Eastman Kodak Company, Rochester, Estados Unidos), os quais foram processados conforme o tempo e temperatura recomendados, para verificar a presença de alguma radiopacidade indicativa de mineralização. Um teste de dureza da peça também foi realizado, introduzindo uma pequena agulha.

Após a desmineralização das peças, os tubos de polietileno foram cuidadosamente removidos e, em seguida foram submetidos aos procedimentos histotécnicos de desidratação com álcool 70° e álcool absoluto, diafanização com xilol, para serem banhadas e incluídas em Histosec (parafina + resina plástica [Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha]) para a obtenção dos blocos. A orientação no momento da inclusão permitiu a realização de cortes teciduais do alvéolo em sentido longitudinal. Os blocos foram cortados em micrótomo rotativo automático, obtendo-se cortes semi-seriados, com 5 micrometros de espessura, que foram estendidos em banho Maria (30 a 40°C) e fixados em lâminas. De cada peça foram preparadas três lâminas, com três cortes cada. As lâminas foram coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina (figura 13).

Figura 11 – Sequência operatória: álveolo após exodontia (A); inserção do tubo (B); sutura (C).

Figura 12 – Maxila dissecada (A e B) e congelada em nitrogênio líquido (C e D).

Figura 13 – Composição de imagens microscópicas (1,6x) evidenciando o corte realizado e a coloração HE. Observa-se a área ocupada pelo tubo e toda a extensão do alvéolo.

4.4.3.1 Análise microtomográfica descritiva

Previamente ao processamento histotécnico, as maxilas foram avaliadas por meio de microtomografia computadorizada, um método não destrutivo da amostra.

Para realizar o procedimento de escaneamento, as maxilas coletadas que haviam sido fixadas em solução de formol foram individualmente envolvidas com filtro de papel embebido com a solução e acondicionadas em tubos plásticos com tampa. Cada tubo foi fixado com cera na plataforma de escaneamento do micro-tomógrafo SkyScan 1174 (SkyScan, Kontich, Bélgica). Como parâmetros de escaneamento foram utilizados 50 kV, 800 μ A, filtro de alumínio com espessura de 0.5 mm, resolução de câmera com 1304 x 1024 pixels, tamanho de voxel de 14.12 μ m, intervalo de rotação de 0.5 grau e 180 graus de rotação. Cada escaneamento resultou em 360 imagens, que foram reconstruídas por meio do programa NRecon 1.6.4.8 (SkyScan). Todos os parâmetros de escaneamento e reconstrução encontram-se no anexos 5 e 6.

Com os arquivos reconstruídos, cada espécime foi avaliado por meio do programa Data Viewer 1.4.4.0 (SkyScan) onde foram visualizados cortes tomográficos nos planos axial, coronal e sagital. Adicionalmente imagens tridimensionais foram elaboradas com o programa CTVox 2.3 (SkyScan).

A partir das observações bidimensionais e tridimensionais, proporcionadas pela microtomografia computadorizada, foi realizada de forma descritiva a pontuação dos fenômenos associados ao reparo ósseo alveolar frente aos implantes.

4.4.3.2 Análise histológica descritiva

A análise histológica qualitativa foi realizada para descrever os fenômenos microscópicos vinculados à reação do tecido alveolar frente ao implante dos materiais testados. Com emprego de um microscópio óptico binocular foi avaliado um corte histológico em cada lâmina, utilizando para essa finalidade as objetivas de aumentos de 4x e 40x. Do referido corte foi avaliada a região do alvéolo adjacente à extremidade do tubo contendo os cimentos nos diferentes períodos experimentais (15, 30 e 60 dias).

Os eventos microscópicos considerados foram a presença de infiltrado inflamatório e o processo de reparo, configurado pela presença e organização dos tecidos conjuntivo, angioblástico e ósseo.

4.4.3.3 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada com a quantificação das estruturas presentes no tecido alveolar durante o processo de reparo frente ao modelo experimental realizado, com resultados expressos em densidade de área para cada parâmetro histológico avaliado. A análise microscópica, utilizando uma objetiva de imersão com o aumento de 100x, juntamente com um retículo de integração para contabilização dos parâmetros histológicos avaliados, bem como a determinação da densidade de área dos mesmos, foi realizada da mesma maneira, conforme descrito para análise histomorfométrica dos implantes em tecido subcutâneo. Porém para o tecido alveolar foram avaliados 6 campos microscópicos, sendo 3 localizados na interface do cimento implantado e o restante, logo acima dos mesmos, em direção apical do alvéolo.

Os parâmetros histológicos considerados foram a presença de tecido conjuntivo (fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos), infiltrado inflamatório (células gigantes, células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares), tecido ósseo (matriz óssea, osteoblastos e osteoclastos) e outras estruturas (espaço preenchido por líquido intersticial ou corpos estranhos).

As estruturas constituintes do tecido conjuntivo, infiltrado inflamatório e tecido ósseo foram analisadas individualmente e em conjunto. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente realizando-se a comparação entre os grupos e em função dos períodos experimentais.

Figura 14 – Representação da análise histomorfométrica. Graticulo de integração sobre a imagem de um corte histológico formando um campo contendo 100 pontos equidistantes (10x10).

4.4.3.4 Dosagem de citocinas

As dosagens das citocinas TNF- α e IL-10 presentes no tecido alveolar foram realizadas por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA). Inicialmente as amostras de maxilas que encontravam-se armazenadas a - 80°C foram cortadas com navalha de micrótomo de modo a restringir a área do alvéolo com o tubo implantado. Em seguida as amostras foram processadas por meio de um pulverizador criogênico (6770 Freezer/Mill, SPEX SamplePrep, NJ, Estados Unidos). As amostras pulverizadas foram armazenadas em tubos eppendorf identificados. Na etapa seguinte as referidas amostras foram pesadas e homogenizadas com um homogenizador de tecidos (Ultra Turrax – IKA, Alemanha) em solução de PBS 1X contendo inibidor enzimático (SigmaFAST Protease Inhibitor, Sigma, Saint Louis, Estados Unidos).

O homogenizado foi centrifugado a 2500g por 10 minutos a 4°C, sendo então o sobrenadante coletado para a realização dos ensaios de ELISA.

As citocinas foram dosadas por meio dos kits Quantikine ELISA Rat TNF- α e Rat IL-10 (R&D Systems, Minneapolis, Estados Unidos), seguindo o protocolo especificado pelo fabricante. Nas placas de 96 poços disponíveis nos kits foram colocadas as diluições seriadas da curva padrão e as amostras dos períodos de 15 e 30 dias, em duplicata. A leitura foi realizada em leitor de placas de ELISA a 450nm.

A concentração das diferentes citocinas nos sobrenadantes dos tecidos foram determinadas a partir dos valores obtidos baseados com as respectivas curvas padrão. Paralelamente, a quantidade total de proteínas presentes nas amostras também foi dosada. Os resultados foram expressos como valores da média de picogramas de citocina por miligrama de tecido.

4.5 Análise estatística

Os dados obtidos pelas diferentes avaliações foram submetidos aos testes de D'Agostino e Pearson para verificação de distribuição normal. Em caso de normalidade entre três ou mais variáveis foi empregado o teste paramétrico de análise de variância one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. O teste Mann-Whitney foi utilizado quando comparadas duas variáveis.

Em caso de ausência de normalidade, foi empregado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e de Dunns para análises individualizadas.

Em cada teste realizado foi considerado o nível de significância de 5%. Para a realização dos testes estatísticos foi utilizado o programa GraphPad Prisma 5 (GraphPad Software, San Diego, Estados Unidos).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 TESTES FÍSICO-QUÍMICOS

5.1.1 Tempo de presa

Os diferentes veículos empregados promoveram alterações no tempo de presa do MTA branco, especialmente quando associado aos extratos em propilenoglicol. Foi constatado tempo de presa inicial mais prolongado para os extratos em propilenoglicol, significativamente maior para a própolis e bardana no referido veículo. Quanto ao tempo de presa final, todos os grupos experimentais foram maiores ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (água destilada), com destaque para os extratos em propilenoglicol da guaçatonga e da própolis que apresentaram um tempo de presa final três vezes maior que o grupo controle. Os resultados dos tempos de presa inicial e final, computados em minutos, encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 – Média (valor máximo e mínimo) e desvio padrão dos tempos de presa inicial e final em minutos para os grupos avaliados. Diferentes letras em cada coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Grupo	Inicial	Desvio padrão	Final	Desvio padrão
1 - BDA	31.80 (29-35) ^a	2.28	79.00 (75-82) ^a	2.65
2 - BDP	72.80 (71-74) ^b	1.30	176.80 (173-180) ^b	2.59
3 - GTA	46.40 (43-52) ^c	4.28	105.60 (101-109) ^c	4.22
4 - GTP	60.40 (55-66) ^d	4.51	185.40 (180-189) ^d	4.16
5 - P10%	77.60 (73-84) ^b	4.72	180.20 (177-184) ^{bd}	3.49
6 - H ₂ O	30.60 (27-36) ^a	4.51	60.20 (55-68) ^e	6.69

5.1.2 Escoamento

Os grupos onde o MTA foi preparado com veículos em propilenoglicol apresentaram um escoamento significativamente maior quando comparados com os grupos com veículos aquosos ($P < 0,05$), conforme apresentado no gráfico 1.

Gráfico 1 – Representação gráfica das médias e desvios padrão do perímetro, em milímetros, do escoamento dos cimentos nos grupos avaliados. Diferentes letras indicam diferença significativa.

5.1.3 Leitura do pH

Os resultados do pH encontram-se dispostos na tabela 3. Pode se observar que todas as amostras, em todos os períodos, promoveram um pH alcalino. No período de 3 horas os extratos em propilenoglicol proporcionaram um maior pH ($P < 0,05$), com exceção da própolis comparada com a água destilada. Porém a partir de 7 dias não constatou-se mais diferença significativa entre os grupos onde foram utilizados os extratos comparados com a água destilada.

Tabela 3 – Média e desvio padrão dos valores de pH encontrados nos diferentes períodos para os grupos avaliados. Diferentes letras em cada coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Grupo	3 horas	24 horas	3 dias	7 dias	15 dias
1 - BDA	7.94 (0.42) ^a	7.57 (0.44) ^a	7.03 (0.21) ^{ab}	7.33 (0.09) ^a	7.25 (0.11) ^a
2 - BDP	8.99 (0.41) ^b	7.98 (0.27) ^{ab}	6.99 (0.09) ^{ab}	7.28 (0.06) ^a	7.29 (0.24) ^a
3 - GTA	7.94 (0.17) ^a	8.03 (0.45) ^{ab}	6.87 (0.07) ^a	7.25 (0.06) ^a	7.30 (0.26) ^a
4 - GTP	9.26 (0.40) ^b	8.26 (0.18) ^b	6.86 (0.08) ^a	7.32 (0.05) ^a	7.46 (0.20) ^a
5 - P10%	8.85 (0.51) ^{bc}	7.73 (0.41) ^a	7.21 (0.17) ^b	7.30 (0.05) ^a	7.30 (0.27) ^a
6 - H ₂ O	8.29 (0.64) ^{ac}	8.08 (0.13) ^{ab}	7.00 (0.08) ^{ab}	7.27 (0.08) ^a	7.31 (0.24) ^a
Controle	6.89	6.79	6.42	6.77	7.02

5.1.4 Liberação de íons cálcio

No período de 3 horas, somente o grupo com o extrato da *Casearia sylvestris* Sw. em propilenoglicol, apresentou maior liberação de íons cálcio quando comparado com a água destilada ($P < 0,05$). Para o período de 24 horas somente verificou-se diferença estatisticamente significativa com o grupo da *Arctium lappa* L. em propilenoglicol frente à *Casearia sylvestris* Sw. em extrato aquoso.

Já no período de 7 dias, somente o extrato da própolis foi estatisticamente superior à água destilada ($P < 0,05$). Nos demais períodos os resultados foram similares ($P > 0,05$). Os resultados da análise da liberação de cálcio (mg/L) encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 – Média e desvio padrão da liberação de íons cálcio (mg/L) nos diferentes períodos para os grupos avaliados. Diferentes letras em cada coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Grupo	3 horas	24 horas	3 dias	7 dias	15 dias
1 - BDA	3.74 (0.79) ^{ab}	3.69 (1.11) ^{ab}	4.12 (1.21) ^a	7.84 (1.76) ^{ab}	4.44 (0.70) ^a
2 - BDP	4.43 (0.98) ^{ab}	3.44 (0.64) ^a	4.58 (0.91) ^a	9.18 (0.87) ^{ab}	4.92 (0.46) ^a
3 - GTA	4.86 (0.97) ^{ab}	4.64 (0.45) ^b	4.61 (0.83) ^a	8.99 (0.97) ^{ab}	4.89 (0.39) ^a
4 - GTP	5.08 (0.86) ^a	3.83 (0.96) ^{ab}	5.38 (1.02) ^a	9.22 (1.23) ^{ab}	4.86 (0.65) ^a
5 - P10%	4.93 (2.68) ^{ab}	4.01 (1.36) ^{ab}	4.46 (0.68) ^a	9.53 (0.90) ^a	5.07 (0.59) ^a
6 - H ₂ O	3.45 (1.09) ^b	4.22 (1.40) ^{ab}	4.38 (1.14) ^a	7.58 (1.33) ^b	5.29 (0.97) ^a
Controle	0	0	0	0	0

5.1.5 Alteração volumétrica

No quesito alteração volumétrica todos os grupos avaliados apresentaram perda de volume inferior a 3%. Nesta variável não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Na tabela 5 pode se observar os valores da média e desvio-padrão, em porcentagem, da solubilidade dos diferentes grupos avaliados.

Tabela 5 - Média e desvio padrão da alteração volumétrica (%) para os grupos avaliados. Diferentes letras em cada coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Grupo	% de solubilidade
Ext. aq. Bardana	1,69 (1,16) ^a
Ext. prop. Bardana	2,60 (1,79) ^a
Ext. aq. Guaçatonga	1,84 (0,89) ^a
Ext. prop. Guaçatonga	2,01 (0,79) ^a
Ext. prop. Própolis	2,16 (0,81) ^a
Água destilada	1,17 (0,71) ^a

5.2 TESTES ANTIMICROBIANOS

5.2.1 Método do contato direto

5.2.1.1 *Enterococcus faecalis*

Na análise dos valores da quantidade (tabela 6) de unidades formadoras de colônia presentes nas placas de cultura microbiológica foi possível constatar que todos os grupos com MTA apresentaram efeito antibacteriano contra o *Enterococcus faecalis*, com menor número de unidades formadoras de colônias quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$), em todos os períodos avaliados. No entanto nenhum dos extratos associados ao MTA foi capaz de adicionar um efeito antibacteriano maior ao material nos períodos de 7, 12, 24 e 168 horas, pois não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais. No período de 48 horas o grupo do extrato da própolis a 10% favoreceu ação significativamente ($P < 0,05$) maior do que o grupo da água e do extrato aquoso da bardana. As figuras de 15 a 19 mostram as placas de ágar representativas de cada grupo nos períodos experimentais analisados.

Tabela 6 – Média e desvio padrão da quantidade de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) encontradas nos diferentes períodos para os grupos avaliados. Diferentes letras em cada coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Grupo	7 horas	12 horas	24 horas	48 horas	168 horas
1 - BDA	47.30 (12.06) ^a	58.10 (22.61) ^a	82.09 (19.89) ^a	66.80 (16.75) ^a	23.40 (12.70) ^a
2 - BDP	37.20 (16.19) ^a	54.75 (32.31) ^a	77.40 (18.26) ^a	59.00 (23.29) ^{ab}	15.00 (8.58) ^a
3 - GTA	46.00 (9.25) ^a	58.90 (18.98) ^a	80.20 (10.16) ^a	63.10 (23.26) ^{ab}	27.70 (11.21) ^a
4 - GTP	43.30 (22.67) ^a	56.90 (17.97) ^a	73.60 (17.98) ^a	61.80 (22.29) ^{ab}	21.00 (10.25) ^a
5 - P10%	28.10 (10.33) ^a	44.50 (13.46) ^a	59.80 (18.43) ^a	42.30 (10.07) ^b	13.80 (8.87) ^a
6 - H ₂ O	55.20 (17.30) ^a	71.25 (23.90) ^a	81.00 (22.56) ^a	67.30 (22.80) ^a	21.80 (13.63) ^a
Controle	247.50 (42.04) ^b	204.90 (46.98) ^b	168.00 (21.93) ^b	151.10 (17.65) ^c	68.30 (18.66) ^b

Figura 15 – Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H₂O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 7 horas.

Figura 16 – Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H₂O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 12 horas.

Figura 17 – Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H₂O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 24 horas.

Figura 18 – Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H₂O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 48 horas.

Figura 19 – Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H₂O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 168 horas.

5.2.1.2 *Cândida albicans*

Todos os grupos experimentais apresentaram menor número de unidades formadoras de colônias quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$) em todos os períodos avaliados (Tabela 7). O uso do extrato da própolis proporcionou um maior efeito antifúngico no período de 10 horas quando comparado ao MTA manipulado com água destilada ($P < 0,05$). No entanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais nos demais períodos avaliados. As figuras 20 a 23 mostram as placas de ágar representativas de cada grupo nos períodos experimentais analisados.

Tabela 7 – Média e desvio padrão da quantidade de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) encontradas nos diferentes períodos para os grupos avaliados. Diferentes letras em cada coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Grupo	10 horas	24 horas	48 horas	168 horas
1 - BDA	29.40 (10.96) ^{ab}	81.10 (16.95) ^a	80.10 (19.08) ^a	7.50 (8.19) ^a
2 - BDP	27.60 (20.90) ^{ab}	67.10 (29.95) ^a	88.60 (34.29) ^a	11.30 (5.57) ^a
3 - GTA	37.50 (17.07) ^{ab}	76.80 (25.42) ^a	93.10 (31.49) ^a	7.80 (4.49) ^a
4 - GTP	41.40 (15.36) ^a	80.30 (25.62) ^a	83.90 (48.74) ^a	8.80 (4.10) ^a
5 - P10%	13.00 (9.12) ^b	47.80 (25.98) ^a	73.80 (26.63) ^a	4.40 (2.01) ^a
6 - H ₂ O	49.50 (8.51) ^a	86.20 (23.58) ^a	87.00 (38.95) ^a	6.10 (4.35) ^a
Controle	154.2 (33.78) ^c	208.10 (43.10) ^b	281.20 (21.40) ^b	53.10 (17.93) ^b

Figura 20 – Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H₂O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 10 horas.

Figura 21 – Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H₂O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 24 horas.

Figura 22 – Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H₂O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 48 horas.

Figura 23 – Placas representativas dos grupos 1-BDA (A), 2-BDP (B), 3-GTA (C), 4-GTP (D), 5-P10% (E), 6-H₂O (F), controle positivo (G) e controle negativo (H). Período experimental de 168 horas.

5.2.2 Método de descontaminação dentinária

Por meio da análise das imagens obtidas com a microscopia confocal de varredura a laser, foi possível constatar que após o período experimental de 24 horas, somente o grupo no qual o cimento foi manipulado com água destilada não apresentou redução significativa ($P>0,05$) na viabilidade bacteriana em relação ao grupo controle. A associação do extrato da própolis proporcionou ao MTA uma maior ($P<0,05$) ação de desinfecção nos túbulos dentinários quando se comparou com o cimento manipulado com água destilada. Os grupos onde os extratos de fitoterápicos foram associados mostraram-se similares aos grupos experimentais ($P>0,05$). A porcentagem de bactérias viáveis em cada grupo encontra-se ilustrada no gráfico 2. Na figura 24, a viabilidade bacteriana pode ser observada com imagens de espécimes representativos. Em relação ao biovolume total de bactérias presentes nos espécimes, foi observada homogeneidade na contaminação dentinária, pois diferença estatisticamente significativa entre todos grupos não foi verificada (gráfico 3).

Gráfico 2 – Representação gráfica da mediana da porcentagem de bactérias viáveis após o período de 24 horas. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Gráfico 3 - Representação gráfica da mediana do biovolume (μm^3) bacteriano após o período de 24 horas. Houve similaridade ($P > 0,05$) entre os grupos.

Figura 24 – Imagens de microscopia confocal de varredura laser após o período de 24 horas, onde podem-se visualizar bactérias viáveis (verde) e mortas (vermelho).

Ao avaliar as imagens referentes ao período de 168 horas, nenhum extrato associado ao MTA favoreceu uma maior redução na viabilidade bacteriana comparado com o cimento manipulado com água destilada ($P>0,05$). Em comparação com o grupo controle, somente os grupos 3 (GTA), 4 (GTP) e 5 (própolis 10%) apresentaram menos bactérias viáveis ($P<0,05$). Em relação ao biovolume total foi encontrado diferença ($P<0,05$) entre os grupos (gráfico 05). Na figura 25, a viabilidade bacteriana pode ser observada com imagens de espécimes representativos.

Gráfico 4 - Representação gráfica da mediana da porcentagem de bactérias viáveis após o período de 168 horas. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P<0,05$).

Gráfico 5 - Representação gráfica da mediana do biovolume (μm^3) bacteriano após o período de 24 horas. Diferentes letras indicam diferença estatística ($P<0,05$).

Figura 25 – Imagens de microscopia confocal de varredura laser após o período de 169 horas, onde podem-se visualizar bactérias vivas (verde) e mortas (vermelho).

5.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA BIOLÓGICA

5.3.1 Análise em tecido subcutâneo

5.3.1.1 Análise histológica descritiva dos implantes em tecido subcutâneo

A descrição histológica foi realizada para caracterizar a dinâmica de resposta do tecido subcutâneo frente aos materiais testados. Foram avaliados os tecidos presentes na embocadura do tubo de polietileno, em contato direto com os materiais testados. Para o grupo controle foram avaliados campos microscópicos situados na lateral da estrutura tubular.

De modo geral os espécimes examinados apresentaram a formação de uma estrutura fibrocelular envolvendo o tubo implantado, tanto lateralmente, como na embocadura do tubo em contato com os materiais testados. Outro fator observado em todos os grupos foi a evolução do reparo em função do tempo. A descrição microscópica morfológica dos grupos avaliados encontra-se dividida de acordo com os tempos experimentais.

Período de 15 dias

Neste período, os campos microscópicos que caracterizaram o grupo controle, apresentaram uma fina cápsula de tecido conjuntivo fibroso organizado com a presença de poucas células inflamatórias predominantemente mononucleares, diferentemente dos grupos experimentais.

No grupo de referência, no qual o MTA foi manipulado com água destilada (G6), observou-se uma delgada cápsula de tecido conjuntivo frouxo permeado por infiltrado inflamatório caracterizado por células mononucleares. A formação de alguns vasos sanguíneos e a presença de células gigantes dispersas também foram observadas em alguns espécimes, bem como a presença de material extravasado, caracterizado por estruturas amorfas de coloração acastanhada.

O grupo 5 (própolis 10%) também foi caracterizado por uma fina cápsula de tecido conjuntivo fibroso, sendo visualizados poucos vasos sanguíneos de pequeno calibre e com a predominância de um infiltrado inflamatório mononuclear, característico de um processo inflamatório crônico de leve intensidade. Neste grupo também foram visualizadas estruturas acastanhadas compatíveis com material extravasado, assim como material fagocitado por células mononucleares, sugerindo

ser macrófagos. Observou-se também a presença de linfócitos. Os espécimes do grupo 2 (BDP) apresentaram características microscópicas semelhantes ao grupo anteriormente descrito.

Alguns espécimes do grupo 1 (BDA) apresentaram um tecido conjuntivo frouxo menos organizado, evidenciando o início da resposta reparadora. Em outros espécimes observou-se feixes de fibras colágenas permeado por um infiltrado inflamatório mais intenso que os grupos anteriormente descritos, sendo predominantemente composto por células mononucleares.

No grupo 3 (GTA) os espécimes apresentaram uma resposta reparadora menos pronunciada com um tecido fibrocelular fino permeado por vasos sanguíneos e uma predominância de infiltrado inflamatório composto principalmente por células mononucleares. Alguns espécimes apresentaram a formação de células gigantes. O grupo 4 (GTP) mostrou-se similar ao GTA, porém na constituição da cápsula foram observados menos vasos. Além disso verificou-se a presença de macrófagos mononucleados exibindo atividade fagocítica em relação ao material extravasado.

Período de 30 dias

Nas amostras do grupo controle foi observado um processo avançado de reparo, com a formação de tecido conjuntivo fibroso contendo fibras organizadas paralelamente.

No grupo 6 (água destilada) notou-se o aumento da espessura do tecido conjuntivo em relação ao período de 15 dias. A reação inflamatória apresentava-se de leve intensidade, composta por um infiltrado mononuclear permeado por vasos sanguíneos. Também houve a presença de material extravasado de coloração acastanhada.

No grupo 1 (BDA), na maior parte dos espécimes, notou-se um ligeiro avanço no reparo tecidual, de modo que a região em contato com o material apresentava formação de tecido conjuntivo fibroso com presença de células mononucleadas esparsas. Porém em alguns espécimes ainda notou-se a persistência de um infiltrado inflamatório mononuclear em permeio às fibras colágenas. A descrição anterior também pode ser aplicada ao grupo 2 (BDP), no entanto em alguns espécimes foram verificados focos de material residual.

Os grupos 3 (GTA) e 4 (GTP) demonstraram persistência do infiltrado inflamatório crônico, sendo este envolvido por um tecido conjuntivo frouxo.

Adicionalmente, focos de material remanescente, bem como a presença de poucas células gigantes em alguns espécimes foram observados.

No grupo 5 (própolis) notou-se uma discreta evolução no reparo em relação ao período de 15 dias, caracterizado por um tecido fibrocelular, permeado por um infiltrado inflamatório mononuclear.

Período de 60 dias

No grupo controle, assim como no período de 30 dias, foi constatado o reparo tecidual com a presença de uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, bem como uma diminuição expressiva do infiltrado inflamatório em relação aos períodos anteriores. Este grupo apresentou um reparo notavelmente mais avançado que os demais grupos.

No grupo 6 (água destilada) a presença do tecido fibrocelular se manteve. Uma redução do infiltrado inflamatório mononuclear e da vascularização, em relação aos períodos anteriores, foram notadas.

No grupo 1 (BDA) a superfície em contato com o material apresentou um tecido fibrocelular denso com células inflamatórias esparsas. Porém, em planos teciduais acima da cápsula foi observado um tecido fibrocelular contendo fibrócitos e poucos vasos sanguíneos. Notou-se também um infiltrado inflamatório de natureza crônica com predominância de linfócitos e células macrofágicas. Foi constatado a presença de células gigantes em alguns espécimes. A descrição do grupo 3 (GTA) é similar ao grupo relatado anteriormente, porém com um infiltrado inflamatório um pouco mais pronunciado, com fibras colágenas mais dispersas, com maior vascularização e presença de algumas células gigantes.

Nos grupos 2 (BDP) e 4 (GTP), com exceção de alguns espécimes, apresentaram um atraso na formação do tecido fibrocelular e persistência de um infiltrado inflamatório crônico contendo linfócitos e células de natureza macrofágica (macrófagos e células gigantes), sendo também observado em poucos espécimes a presença de focos de material residual.

Dentre os grupos experimentais, o grupo da própolis (G5) foi o que demonstrou uma maior reparação tecidual no período de 60 dias, apresentando um tecido fibrocelular frouxo e organizado na maioria dos espécimes com a presença discreta de um infiltrado de células mononucleares. Somente em um espécime foi possível observar a presença de células gigantes.

Figura 26 – Fotomicrografias representativas dos grupos controle e experimentais no período de 15 dias. As áreas correspondentes ao tubo preenchido com os cimentos implantado estão indicadas com (*). Na imagem do grupo GTP uma célula gigante está indicada com seta. Coloração H&E. Objetiva de 40x. Escala de 50µm.

Figura 27 – Fotomicrografias representativas dos grupos controle e experimentais no período de 30 dias. As áreas correspondentes ao tubo preenchido com os cimentos implantado estão indicadas com (*). Coloração H&E. Objetiva de 40x. Escala de 50µm.

60 dias

Figura 28 – Fotomicrografias representativas dos grupos controle e experimentais no período de 60 dias. As áreas correspondentes ao tubo preenchido com os cimentos implantado estão indicadas com (*). Coloração H&E. Objetiva de 40x. Escala de 50µm.

5.3.1.2 Análise histomorfométrica dos implantes em tecido subcutâneo

Os diferentes parâmetros histológicos foram avaliados quantitativamente por meio do cálculo de densidade de área referente às seguintes estruturas: fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos, células mononucleares, polimorfonucleares e células gigantes além de outras estruturas. Para fins estatísticos os parâmetros relativos ao tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório foram analisados em conjunto, por meio da soma das densidades de área das estruturas correspondentes à cada um destes tecidos.

Para organizar a disposição dos resultados com a comparação entre os grupos avaliados serão apresentados os resultados relativos aos diferentes períodos experimentais

Período de 15 dias

Ao avaliar o tecido conjuntivo não foi constatada diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais e o grupo controle (gráfico 6). O grupo referência, no qual o MTA foi manipulado com água destilada também não apresentou diferença com os demais grupos. Considerando separadamente as estruturas relacionadas ao tecido conjuntivo, o grupo controle apresentou mais fibras ($P < 0,05$) que os grupos BDA, GTA, GTP e H_2O . Porém em relação aos parâmetros fibroblasto e vasos, o grupo controle apresentou menor densidade ($P < 0,05$) em relação a alguns grupos experimentais.

O grupo controle apresentou menor ($P < 0,05$) infiltrado inflamatório entre todos os grupos (gráfico 7). Dentre os grupos experimentais, o grupo GTA apresentou maior densidade ($P < 0,05$) em relação ao P10%, no entanto o grupo H_2O foi similar em relação aos demais grupos experimentais. O mesmo resultado descrito foi encontrado em relação as células mononucleares. Todos os grupos experimentais apresentaram maior ($P < 0,05$) densidade de células polimorfonucleadas quando comparados ao grupo controle. Não foram encontradas células gigantes no grupo controle.

Gráfico 6 – Análise comparativa da densidade de área (%) de tecido conjuntivo e parâmetros constituintes, no período de 15 dias, representados com os valores da média e desvio-padrão. Diferentes letras representam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Gráfico 7 – Análise comparativa da densidade de área (%) do infiltrado inflamatório e parâmetros constituintes, no período de 15 dias, representados com os valores da média e desvio-padrão. Diferentes letras representam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Período de 30 dias

Neste período experimental, somente o grupo da própolis apresentou diferença ($P<0,05$) com o grupo controle. Em relação a densidade de fibras, o grupo BDP assim como o da própolis a mesmo foi maior que os grupos GTA, GTP e H_2O . O grupo controle apresentou menor densidade ($P<0,05$) de fibroblastos e vasos sanguíneos quando comparado com os grupos experimentais (gráfico 8).

O gráfico 9 mostra que o grupo controle apresentou o menor ($P<0,05$) infiltrado inflamatório, assim como células mononucleares e polimorfonucleares. Nos referidos parâmetros o grupo do MTA manipulado com água destilada não apresentou diferença significativa ($P>0,05$) com os demais grupos experimentais.

Gráfico 8 – Análise comparativa da densidade de área (%) de tecido conjuntivo e parâmetros constituintes, no período de 30 dias, representados com os valores da média e desvio-padrão. Diferentes letras representam diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$).

Gráfico 9 – Análise comparativa da densidade de área (%) do infiltrado inflamatório e parâmetros constituintes, no período de 30 dias, representados com os valores da média e desvio-padrão. Diferentes letras representam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Período de 60 dias

Em relação ao tecido conjuntivo, o grupo controle apresentou a menor densidade de área com diferença significativa ($P < 0,05$) com os grupos BDA, P10% e H₂O. Somente o grupo GTP apresentou menor densidade em relação ao grupo H₂O. Resultado similar também foi observado em relação à densidade de fibroblastos. O grupo controle não apresentou vasos sanguíneos, esta variável ocorreu similarmente entre os grupos experimentais (gráfico 10).

O grupo controle apresentou o menor infiltrado inflamatório com diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação à maioria dos grupos experimentais, exceto com o grupo da própolis. O mesmo resultado foi observado em relação às células mononucleares. Entretanto em relação às células polimorfonucleares nenhum grupo experimental ($P < 0,05$) foi similar ao grupo controle (gráfico 11).

No gráfico 12 encontra-se a densidade de área de outras estruturas encontradas nos grupos avaliados dentro dos três períodos experimentais. Os gráficos 13 e 14 apresentam a evolução dos grupos em função do período

experimental para a densidade (%) de tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório respectivamente.

Gráfico 10 – Análise comparativa da densidade de área (%) de tecido conjuntivo e parâmetros constituintes, no período de 60 dias, representados com os valores da média e desvio-padrão. Diferentes letras representam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Gráfico 11 – Análise comparativa da densidade de área (%) do infiltrado inflamatório e parâmetros constituintes, no período de 60 dias, representados com os valores da média e desvio-padrão. Diferentes letras representam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Gráfico 12 – Análise comparativa da densidade de área (%) de outras estruturas, nos períodos de 15, 30 e 60 dias, representados com os valores da média e desvio-padrão. Diferentes letras representam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Gráfico 13 – Evolução dos grupos em função dos períodos experimentais na variável densidade de área (%) de tecido conjuntivo.

Gráfico 14 – Evolução dos grupos em função dos períodos experimentais na variável densidade de área (%) de infiltrado inflamatório.

5.3.2 Análise em tecido alveolar

5.3.2.1 Análise microtomográfica descritiva

Após o escaneamento em micro-tomógrafo as maxilas foram reconstruídas para avaliar tridimensionalmente o processo de reparo alveolar por meio dos programas DataViewer e CTVox. Para isso foram utilizadas secções nos planos sagital e axial em áreas adjacentes ao implante, tomando como referência a interface da extremidade do tubo na qual o cimento encontrava-se inserido. O parâmetro considerado foi a neoformação óssea no alvéolo que recebeu o implante. Como referência da conformação alveolar, foi observado o alvéolo oposto, onde foi mantido íntegro o incisivo central superior esquerdo. Para verificar o grau de maturação óssea ao longo dos períodos experimentais foi considerado a densidade tomográfica, levando em conta estruturas radiopacas como corticais ósseas. Dentre os grupos experimentais e controle foi possível observar um padrão singular da resposta do tecido alveolar comum a todos. Assim foram realizadas descrições genéricas que podem ser aplicadas a todos grupos de acordo com cada período estudado.

No período de 15 dias ao avaliar cortes sagitais, observou-se na grande maioria dos espécimes que os tubos implantados encontravam-se um pouco além do terço médio alveolar, apresentando uma área radiolúcida adjacente ao implante correspondente ao espaço alveolar. A neoformação óssea, representada por uma estrutura radiopaca de aspecto trabeculado, foi observada limitada ao fundo do alvéolo, ainda distante da interface com os cimentos implantados, fato também observado por meio dos cortes axiais (figura 29).

Após 30 dias grande parte dos espécimes apresentaram o tubo implantado aquém do terço médio, ademais em 2 espécimes o implante não foi visualizado. Os grupos apresentaram morfológicamente um processo de reparo similar com maior neoformação de tecido ósseo da extremidade do tubo implantado até o fundo do alvéolo, porém não suficientemente para o completo preenchimento do espaço alveolar. Por meio de cortes axiais foi possível observar em alguns espécimes a presença de tecido ósseo formado muito próximo a interface com o cimento implantado (figura 30).

Aos 60 dias, em muitos espécimes a ausência do tubo implantado foi observada, outros porém apresentaram o tubo no terço cervical do alvéolo próximo

ao meio bucal vinculado com um processo de reparo atrasado. No entanto em outros espécimes com uma condição esperada, observou-se através do plano sagital um tecido ósseo neoformado preenchendo totalmente a região alveolar, evidente pela presença de osso trabeculado denso. No plano axial foi possível visualizar o processo de remodelação da conformação alveolar (figura 31).

De modo geral, não foi possível constatar diferenças quanto à morfologia do reparo entre os grupos experimentais. Porém o implante com tubo de polietileno parece não ter retentividade na região alveolar, fator que gerou sua extrusão com o decorrer do tempo, conforme visualizado nas imagens reconstruídas, este fato comprometeu a avaliação histomorfométrica do período de 60 dias.

Figura 29 – Imagens bidimensionais e tridimensionais de cortes sagitais e axiais de espécimes representativos do período de 15 dias. Implante de MTA manipulado com extrato da própolis (A) e água destilada (B).

Figura 30 – Imagens bidimensionais e tridimensionais de cortes sagitais e axiais de espécimes representativos do período de 30 dias. Implante de MTA manipulado com BDA (A) e água destilada (B).

Figura 31 – Imagens bidimensionais e tridimensionais de cortes sagitais e axiais de espécimes representativos do período de 60 dias. Implante de MTA manipulado com água destilada (A) e com ausência do implante (B), conforme achado frequente neste período.

5.3.2.2 Análise histológica descritiva dos implantes em tecido alveolar

Uma descrição histológica qualitativa foi realizada para caracterizar a dinâmica da reação tecidual frente aos materiais testados, avaliando a interface e a região alveolar adjacente à extremidade do tubo onde encontrava-se inserida o cimento.

No período de 15 dias, no grupo referência, no qual foi utilizado o MTA manipulado com água destilada, observou-se um tecido conjuntivo estruturalmente organizado localizado diretamente em contato com a superfície ocupada pelo cimento. Permeando o tecido conjuntivo, havia a presença de um discreto infiltrado inflamatório, composto predominantemente por células mononucleares, porém com presença de células polimorfonucleares. Células gigantes, dispersas nesta região também foram vistas neste período, bem como um tecido ósseo em processo de neoformação a partir da região ocupada por tecido conjuntivo. Os espécimes dos grupos da bardana em propilenoglicol (BDP) e própolis apresentaram características microscópicas semelhantes ao grupo anteriormente descrito, assim como o grupo guaçatonga em propilenoglicol (GTP), porém este último com uma maior presença de infiltrado inflamatório. Nos grupos da bardana (BDA) e guaçatonga (GTA) em extrato aquoso, um intenso infiltrado inflamatório de aspecto crônico foi observado, caracterizado pela presença de células inflamatórias mononucleares, envolvidas por um tecido conjuntivo fibroso. Porém nestes grupos, a evidência de neoformação óssea em proximidade a região ocupada pelos cimentos não foi constatada, conforme relatado nos grupos anteriores.

Aos 30 dias, no grupo da água destilada, foi possível observar a organização de fibrosamento de característica capsular. Um tecido conjuntivo fibroso é evidente separando a região ocupada pelo tubo contendo o material e a outra região ocupada em parte por tecido ósseo em processo de maturação. Algumas amostras, com uma menor quantidade de matriz óssea, apresentaram um tecido conjuntivo organizado, com presença de fibroblastos em meio à matriz extracelular, rica em colágeno. Ainda foi constatada uma discreta presença de infiltrado inflamatório, marcada por células mononucleares, dispostas predominantemente na região previamente ocupada pelo tubo. A descrição do grupo anterior pode ser aplicada aos grupos BDA, BDP e da própolis. Assim como para o grupo GTA, salvo que neste grupo, células gigantes multinucleadas em contato com a superfície do material foram observadas em

poucos espécimes. Já no grupo GTP, embora alguns espécimes apresentaram características similares ao anteriores, outros espécimes apresentaram a região do tubo envolvida por intenso infiltrado inflamatório mononuclear.

Aos 60 dias, de modo geral, espécimes do mesmo grupo apresentaram características de configuração histológica distintas quanto à resposta inflamatória e o processo de reparo. Amostras com presença de células sugestivas de processo infeccioso foram descartadas.

No grupo da água destilada, alguns espécimes apresentaram intenso infiltrado inflamatório crônico, contendo células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares, presentes na interface entre tubo, permeado por tecido conjuntivo rico em vasos sanguíneos. Também foi possível observar uma fina camada de tecido ósseo em neoformação adjacente ao tecido conjuntivo contendo células com morfologia de osteoblastos ativos. Por outro lado, em uma condição esperada, alguns espécimes apresentaram a formação de cápsula fibrosa bem definida, com presença de um tecido conjuntivo fibroso separando a região ocupada pelo tubo contendo o material e a região ocupada por tecido ósseo, denotando o reparo da região adjacente. Poucas células inflamatórias foram observadas, e quando presentes encontravam-se, predominantemente, na região ocupada pelo tubo. Os grupos BDA, BDP, GTA, GTP e P10% também apresentaram as duas condições descritas no grupo anterior.

Porém, no grupo GTP, alguns espécimes apresentaram células com morfologia aparente de células de revestimento, na superfície do espaço do tubo. Já no grupo da própolis, alguns espécimes apresentaram maior infiltrado inflamatório crônico, contendo mais células inflamatórias polimorfonucleadas, presentes na interface entre tubo e tecido conjuntivo, sendo este altamente vascularizado. No entanto, outros espécimes apresentaram uma delgada cápsula de tecido conjuntivo interposta entre a superfície ocupada pelo material e um tecido ósseo maduro.

Figura 32 – Imagens de cortes representativos dos diferentes grupos no período de 15 dias, evidenciando áreas teciduais na interface do cimento e adjacentes. A área branca demarcada com (*) representa a área previamente ocupada pelo tubo. Área indicada por (O) representa matriz óssea, as setas na primeira imagem indicam a presença de células gigantes multinucleadas. Coloração HE e objetiva de 40x.

Figura 33 – Imagens de cortes representativos dos diferentes grupos no período de 30 dias, evidenciando áreas teciduais na interface do cimento e adjacentes. A área branca demarcada com (*) representa a área previamente ocupada pelo tubo. Área indicada por (O) representa matriz óssea. Coloração HE e objetiva de 40x.

Figura 34 – Imagens de cortes representativos dos diferentes grupos no período de 60 dias, evidenciando áreas teciduais na interface do cimento e adjacentes. A área branca demarcada com (*) representa a área previamente ocupada pelo tubo. Área indicada por (O) representa matriz óssea. Coloração HE e objetiva de 40x.

5.3.2.3 Análise histomorfométrica dos implantes em tecido alveolar

Para realizar uma análise quantitativa dos parâmetros histológicos preteridos, as seguintes estruturas foram contabilizadas: fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos, células mononucleares e polimorfonucleares, células gigantes, matriz óssea, osteoblastos, osteoclastos e outras estruturas. Para fins estatísticos os parâmetros relativos ao tecido conjuntivo, infiltrado inflamatório e tecido ósseo também foram analisados em conjunto, por meio da soma das densidades de área das estruturas correspondentes à cada um destes tecidos de acordo com os períodos experimentais.

Em função do modelo metodológico empregado, no período de 60 dias, foram constatadas três situações distintas, distribuídas aleatoriamente entre todos grupos. Em uma condição esperada, os tubos encontravam-se posicionados dentro do alvéolo com os tecidos adjacentes em avançado processo de reparo, no entanto em outros casos os tubos apresentavam-se em processo de extrusão ou extruídos do alvéolo, situação que estabeleceu uma via de contato com o meio bucal, fato

esse que proporcionou uma contaminação do meio, gerando uma reposta inflamatória intensa frente essa condição. A terceira situação observada foi a ausência do tubo implantado no alvéolo. Para não gerar dados incompatíveis, as duas últimas situações foram excluídas, sendo realizado a histomorfometria das lâminas restantes. Porém o número de amostras foi muito reduzido e os dados obtidos não foram suficientes para análise estatística, dessa forma o período de 60 dias foi retirado da análise morfométrica.

Para organizar a disposição dos resultados, estes serão apresentados em relação aos períodos experimentais de 15 e 30 dias.

Período de 15 dias

Ao avaliar o total das estruturas referentes ao tecido conjuntivo, foi constatado diferença estatística ($P < 0,05$) apenas entre os grupos 2 (BDP) e 3 (GTA) (gráfico 15). Considerando separadamente as estruturas relacionadas ao tecido conjuntivo, tanto a densidade de área de fibras colágenas, quanto a densidade de área de vasos sanguíneos, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P > 0,05$). O grupo 1 (BDA) apresentou menor densidade fibroblastos ($P < 0,05$) em relação aos demais grupos experimentais.

Tanto o grupo 1 (BDA) quanto o grupo 3 (GTA) apresentaram maior infiltrado inflamatório ($P < 0,05$) em relação aos grupos controle (vazio) e 5 (P10%) (gráfico 16). Ao analisar separadamente as células constituintes, o grupo controle (vazio) e o grupo de referência (H_2O) foram similares ($P > 0,05$) aos demais grupos no quesito das células mononucleares. Para as células polimorfonucleares os grupos 3 (GTA) e 6 (H_2O) foram mais expressivos ($P < 0,05$) que os grupos 5 (P10%) e controle (vazio). Já a densidade de células gigantes foi significativamente menor ($P < 0,05$) no grupo controle quando comparado com os grupos 1 (BDA), 4 (GTP) e 6 (H_2O).

Na análise da densidade de área do parâmetro "outras estruturas" foram apontadas diferenças significantes ($P < 0,05$) quando comparado o grupo 1 (BDA) com os grupos 5 (P10%) e controle (vazio).

Neste período de acordo com os campos selecionados e a magnificação microscópica utilizada, não foi quantificado tecido ósseo em nenhum espécime.

Gráfico 15 – Análise comparativa da densidade de área (%) de tecido conjuntivo e dos parâmetros constituintes, no período de 15 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Diferentes letras representam diferença significativa ($P<0,05$).

Gráfico 16 – Análise comparativa da densidade de área (%) do infiltrado inflamatório e dos parâmetros constituintes, no período de 15 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Diferentes letras representam diferença significativa ($P<0,05$).

Período de 30 dias

Neste período o processo de reparo ocorreu de maneira uniforme entre todos grupos avaliados, pois não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$) tanto para o tecido conjuntivo quanto para o tecido ósseo, bem como para seus parâmetros constituintes. O infiltrado inflamatório também ocorreu de forma similar. A única variável onde houve diferença significativa foi para células polimorfonucleares, na qual os grupos 5 (P10%), 6 (H₂O) e controle (vazio) apresentaram menor ($P < 0,05$) densidade de área das referidas células quando comparadas com os grupos 1 (BDA) e 4 (GTP).

Gráfico 17 – Representação da densidade de área (%) de tecido conjuntivo e dos parâmetros constituintes, no período de 30 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Não houveram diferenças significativas ($P > 0,05$) para as variáveis representadas.

Gráfico 18 – Representação da densidade de área (%) de tecido ósseo e dos parâmetros constituintes, no período de 30 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Não houveram diferenças significativas ($P>0,05$) para as variáveis representadas.

Gráfico 19 – Representação da densidade de área (%) do infiltrado inflamatório e dos parâmetros constituintes, no período de 30 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Diferentes letras representam diferença significativa ($P<0,05$).

Gráfico 20 – Representação da densidade de área (%) do parâmetro outras estruturas, nos períodos de 15 e 30 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos grupos. Diferentes letras representam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

5.3.2.4 Dosagem de citocinas

A resposta molecular do reparo ósseo do tecido alveolar foi verificada por meio do ensaio ELISA, no qual foi evidenciado um padrão similar na dosagem, haja visto que nenhum extrato associado ao MTA induziu maior expressão das citocinas pró-inflamatória (TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10).

Tanto no período de 15 dias quanto em 30 dias não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os grupos para as duas citocinas avaliadas (gráficos 21, 22, 23 e 24).

Outro fator observado foi a expressão de maiores níveis de IL-10 do que o expressado para TNF- α . Além disso a cinética observada, independentemente do grupo, foi a diminuição na expressão de TNF- α e o aumento na expressão de IL-10 em função tempo decorrido.

Nos gráficos a seguir encontram-se a expressão das citocinas, a dosagem de proteínas totais presentes nas amostras e a normalização das amostras, representada pela quantidade em picogramas de citocinas por miligrama de proteínas.

Gráfico 21 – Expressão de TNF- α em pg/mg de proteínas, também encontra-se a expressão de TNF- α em pg/mL do concentrado tecidual e a dosagem de proteínas totais apresentado em mg/mL no período de 15 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Não houveram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos.

Gráfico 22 – Expressão de TNF- α em pg/mg de proteínas, também encontra-se a expressão de TNF- α em pg/mL do concentrado tecidual e a dosagem de proteínas totais apresentado em mg/mL no período de 30 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Não houveram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos.

Gráfico 23 – Expressão de IL-10 em pg/mg de proteínas, também encontra-se a expressão de IL-10 em pg/mL do concentrado tecidual e a dosagem de proteínas totais apresentado em mg/mL no período de 15 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Não houveram diferenças significativas ($P>0,05$) entre os grupos.

Gráfico 24 – Expressão de IL-10 em pg/mg de proteínas, também encontra-se a expressão de IL-10 em pg/mL do concentrado tecidual e a dosagem de proteínas totais apresentado em mg/mL no período de 30 dias. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão de cada grupo. Não houveram diferenças significativas ($P>0,05$) entre os grupos.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Atualmente o MTA é o material de escolha para o emprego como cimento retro-obturador e selador de perfurações radiculares. Quando hidratado o MTA resulta em um gel coloidal que solidifica em uma rígida estrutura (TORABINEJAD et al., 1995; ROBERTS et al., 2008). Porém, essa, dentre outras características do material estão relacionadas com a quantidade de água associada. Neste estudo, foi utilizada a proporção de 3 partes de pó para 1 de líquido, pois favorece propriedades físico-químicas mais satisfatórias ao MTA branco (CAVENAGO et al., 2014).

Apesar da recomendação para o uso de água destilada, outras substâncias foram associadas ao MTA com o intuito de agregar ou potencializar alguma propriedade ao cimento, especialmente na intenção de melhorar a consistência de trabalho (KOGAN et al., 2006) e aumentar seu efeito antimicrobiano, o qual é baixo (PARIROKH; TORABINEJAD, 2010).

A clorexidina a 2% pode aumentar significativamente o efeito antibacteriano do MTA no entanto reduz à resistência a compressão (HOLT et al., 2007) e compromete a biocompatibilidade do cimento, pois eleva consideravelmente sua citotoxicidade mesmo quando utilizada em menor concentração (HERNANDEZ et al., 2005). De acordo com algumas de suas indicações o MTA fica em contato direto com os tecidos perirradiculares, assim o comprometimento da biocompatibilidade é um fator indesejável, haja vista que de acordo com alguns estudos o MTA é considerado um cimento bem tolerado, que gera resposta inflamatória de baixa intensidade aos tecidos do organismo hospedeiro, sendo gradualmente reduzida em função do tempo de implantação (HOLLAND et al., 2002; CAMILLERI; PITT FORD, 2006; BÓRIO et al., 2014).

Neste estudo foram utilizados extratos de dois fitoterápicos e da própolis associados ao MTA. A extração em água dos fitoterápicos foi realizada de acordo com a farmacopéia brasileira por diferentes laboratórios. Cada extrato aquoso foi utilizado em substituição a água destilada para a manipulação do MTA. O extrato aquoso da própolis foi desconsiderado pois durante o estudo piloto não foi possível obter um produto com qualidade satisfatória.

O propilenoglicol também foi utilizado como solução extratora, pois essa substância melhora a consistência de trabalho do MTA, neste estudo foi utilizada a

proporção recomendada de 80% de água destilada e 20% de propilenoglicol como veículo para manipular o MTA (DUARTE et al., 2012). Além disso, o emprego do propilenoglicol na manipulação do MTA não interfere na biocompatibilidade do material (HOLLAND et al., 2007).

A *Arctium lappa* L. e a *Casearia sylvestris* SW., popularmente conhecidas como bardana e guaçatonga, respectivamente, foram eleitas pois são duas plantas facilmente encontradas e cultivadas em todo território brasileiro. Extratos de ambos fitoterápicos apresentam atividades biológicas e farmacológicas reportadas em relação as propriedades antibacteriana com ação sobre o *Enterococcus faecalis* e antifúngica com ação sobre a *Cândida albicans* (PEREIRA et al., 2005; GENTIL et al., 2006; SCHNEIDER et al., 2006). Ambos fitoterápicos ainda apresentam propriedade anti-inflamatória, validada por meio de estudos *in vivo* (ESTEVES et al., 2005; CHAN et al., 2010; ALBANO et al., 2013; DE ALMEIDA et al., 2013).

Não há relatos da associação desses fitoterápicos com o MTA mas um resultado interessante revelado por um estudo de Duarte et al. (2009) foi que o extrato aquoso da guaçatonga associado ao hidróxido de cálcio, se mostrou inerte à pasta em relação ao pH e a liberação de íons cálcio.

O extrato da própolis foi empregado neste estudo devido a sua comprovada propriedade antibacteriana sobre um amplo espectro de micro-organismos, incluindo o *Enterococcus faecalis* (FERREIRA et al., 2007; SEIDEL et al., 2008; AWAWDEH et al., 2009; KANDASWAMY et al., 2010; MADHUBALA et al., 2011) ou associado ao hidróxido de cálcio (DE REZENDE et al., 2008). Um estudo relatou que a própolis inibiu o crescimento bacteriano por impedir a divisão celular, com desorganização do citoplasma, membrana citoplasmática e parede celular, gerando uma bacteriólise parcial com inibição da síntese de proteínas (TAKAISI-KIKUNI; SCHILCHER, 1994). A própolis também apresenta satisfatória capacidade antifúngica, demonstrada por meio de estudos laboratoriais que evidenciaram a ação sobre a *Cândida albicans* tanto na forma planctônica (KUJUMGIEV et al., 1999; KOO et al., 2000; SALOMÃO et al., 2008) quanto em biofilme (TYAGI et al., 2013).

Estudos apontam o efeito anti-inflamatório como uma importante propriedade da própolis (MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998; SFORCIN, 2007), considerada uma substância com baixo potencial irritativo conforme demonstrado em pesquisas *in vitro* (AL-SHAHER et al., 2004) e *in vivo* (SILVA et al., 2004). Entretanto os efeitos biológicos promovidos pela própolis são atribuídos ao conjunto de substâncias que

as compõem (MARCUCCI, 1995), sendo variada de acordo com seu local de origem (KUJUMGIEV et al., 1999; BANKOVA, 2005). Como a composição da própolis depende muito de sua origem botânica se faz necessário a realização de testes para sua tipificação (BANKOVA, 2005; SCAZZOCCHIO et al., 2006). A própolis utilizada neste estudo é de origem brasileira, denominada como própolis verde. O extrato foi produzido e sua qualidade determinada de acordo com protocolos definidos na literatura (MARCUCCI et al., 2001; FERREIRA et al., 2007; TROCA et al., 2011) por meio da análise química de seus componentes e da cromatografia líquida de alta eficiência para determinar o teor de flavonóides e substâncias fenólicas, além de avaliar sua atividade antioxidante pelo ensaio do DPPH. A quantidade de sólidos solúveis, umidade, cinzas e cera também foram determinados. De acordo com os resultados obtidos, foi possível constatar que a própolis utilizada apresentou boa qualidade, de acordo com os padrões definidos pela legislação vigente (Ministério da Agricultura - DIPOA, 2001).

A solução extratora utilizada nessa pesquisa foi o propilenoglicol de modo a se obter uma concentração da própolis a 10%. Estudos *in vitro* demonstraram que a referida concentração mostrou efetiva atividade antibacteriana (KOO et al., 2000; FERREIRA et al., 2007). Um dado interessante é que mesmo quando empregado em extrato etanólico, o efeito antimicrobiano da própolis não é influenciado pelo veículo extrator (FERREIRA et al. 2007).

O *Enterococcus faecalis* foi escolhido para avaliar a ação antibacteriana do MTA pelo fato de ser uma bactéria anaeróbia facultativa presente em infecções endodônticas primárias e principalmente secundárias (SUNDQVIST et al., 1998; HANCOCK et al., 2001). Essa espécie bacteriana apresenta rápido crescimento com capacidade de penetrar e colonizar os túbulos dentinários (ORSTAVIK; HAAPASALO, 1990), mantendo-se viáveis e aderidas ao colágeno quando na presença de fluídos (LOVE, 2001).

O MTA propicia um meio alcalino, segundo alguns autores pode promover um pH de 10.2 após a manipulação e de 12.5 após 3 horas (TORABINEJAD et al., 1995). O pH elevado promove uma ação alcalinizante que conduz a inibição microbiana por meio de ação enzimática irreversível. Em teoria o elevado pH deveria inibir o *Enterococcus faecalis*, uma vez que o pH ideal para eliminá-lo deve ser de 11.5 (MCHUGH et al., 2004). Porém em alguns estudos o MTA não apresentou

efetividade contra algumas cepas de bactérias, incluindo o *Enterococcus faecalis* (ESTRELA et al., 2000; MORGENTAL et al., 2011).

A *Cândida albicans* foi selecionada para determinar o potencial antifúngico do MTA, uma vez que também é encontrada com frequência em casos de insucesso do tratamento endodôntico. Esse fungo possui grande afinidade à dentina, aderindo e colonizando fortemente essa estrutura, ademais é conhecida a sua resistência a alguns medicamentos intracanaais, tais como o hidróxido de cálcio (SIQUEIRA; SEN, 2004). A literatura apresenta resultados variáveis quanto a ação do MTA sobre a *Cândida albicans*, no entanto alguns estudos sugeriram que o potencial antifúngico do MTA está relacionado com sua presa (AL-NAZHAN; AL-JUDAI, 2003; MOHAMMADI et al., 2006) e concentração (AL-HEZAIMI et al., 2005).

Entretanto não há nenhum relato a respeito da associação do MTA com os referidos extratos de produtos naturais. Frente a essa lacuna na literatura, o presente estudo avaliou algumas propriedades físicas (tempo de presa, escoamento e alteração volumétrica), químicas (pH e liberação de íons cálcio), antimicrobiana (frente ao *Enterococcus faecalis* e *Cândida albicans*) e biocompatibilidade do MTA branco associado com a *Arctium lappa* L., *Casearia sylvestris* SW. e própolis em extratos aquoso e/ou em propilenoglicol por meio de diversas metodologias.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Nesse estudo, o tempo de presa foi determinado seguindo as recomendações da norma ASTM C266-08, no entanto os corpos de prova foram confeccionados com o uso de moldes de acordo com a norma ISO 6876:2001. A hibridização de padrões foi empregada devido à utilização de uma quantidade menor de cimento para confeccionar a amostra (VIVAN et al., 2010; DUARTE et al., 2012; HUNGARO DUARTE et al., 2012).

Os resultados demonstraram que os cimentos nos quais foram preparados com os extratos em propilenoglicol apresentaram tempo de presa, tanto inicial quanto final mais longos, corroborando com os dados encontrados por Duarte et al. (2012). Porém, não há comparação da influência dos diferentes extratos no tempo de presa, visto que não há estudos na literatura empregando essa temática. No entanto, o que se pode constatar foi que, com exceção do extrato aquoso da

bardana no tempo de presa inicial, todos os veículos experimentados alteraram significativamente o tempo de presa do MTA.

Entretanto mesmo no grupo referência, no qual foi empregado água destilada, outros autores (BORTOLUZZI et al., 2009; VIVAN et al., 2010) encontraram um tempo de presa mais curto. Possivelmente essa diferença pode estar relacionada com a manipulação do material, quando considerada a agregação, pois nesta etapa existe grande possibilidade de variabilidade na hidratação do cimento (NEKOO FAR et al., 2010).

O teste de escoamento foi realizado de acordo com a norma ISO 6876:2001, porém neste estudo foi proposta e executada uma modificação quanto à forma de análise dos corpos de prova. Após o teste, as amostras foram fotografadas juntamente com uma régua milimetrada e com isso as imagens foram analisadas quanto ao perímetro formado pelo corpo de prova através do programa Image J. A referida norma ISO recomenda que o disco formado pelo cimento tenha um diâmetro maior que 20mm, no entanto nenhum espécime dos grupos avaliados atingiram tal diâmetro recomendado, em desconformidade com os resultados obtidos por Duarte et al. (2012), nos quais tanto o MTA manipulado com água quanto com 20% de propilenoglicol superaram o mínimo exigido pela norma. Tal diferença pode ser explicada pela proporção de pó e líquido (2.5:1) utilizada pelos referidos autores que deixou o cimento mais fluido, fator que favorece o escoamento.

O MTA é um cimento rico em óxido de cálcio, que ao ser hidratado converte-se em hidróxido de cálcio, que se dissocia em íons cálcio e hidroxila (CAMILLERI et al., 2005; CAMILLERI, 2008), fator colaborador para o aumento do pH (DUARTE et al., 2003). Foi observado nesse estudo, que somente no período de 3 horas, o emprego dos extratos em propilenoglicol promoveram um pH maior quando comparados com a água destilada. Aliás no grupo referência, MTA manipulado com água destilada, o pH após 3 horas (8.29) foi muito aquém ao pH de 12.5 encontrado por outro estudo (TORABINEJAD et al., 1995). No entanto, os resultados desse estudo corroboram com outras pesquisas que utilizaram metodologia semelhante (MASSI et al., 2011; DUARTE et al., 2012). Com o intuito de simular de maneira correspondente com a condição clínica, neste estudo as amostras foram inseridas em retrocavidades de dentes de acrílico, isso promoveu somente uma pequena área de cimento em contato com a água onde foi imerso, isso pode explicar um pH

mais baixo que o apresentado por amostras com o formato de disco (BORTOLUZZI et al., 2009).

Em relação a liberação de íons cálcio, os resultados obtidos mostraram que somente a associação com extrato da guaçatonga em propilenoglicol promoveu maior liberação de íons cálcio que a água destilada no período de 3 horas, assim como o extrato da própolis no período de 7 dias. Neste estudo não foi encontrado nos grupos avaliados um padrão decrescente com maior liberação de íons cálcio no primeiro período avaliado, conforme verificado em outros estudos (DUARTE et al., 2003; DUARTE et al., 2012). A quantidade de íons cálcio liberados pelo MTA é muito variável entre os diferentes estudos que empregaram essa metodologia, onde encontra-se desde pequenas (DUARTE et al., 2003) até grandes quantidades (MASSI et al., 2011).

Entretanto foi constatado um fator importante com os resultados dessa pesquisa, nenhuma das associações ao MTA desfavoreceram a capacidade do cimento em manter o pH alcalino e liberar íons cálcio em todos os períodos avaliados conforme observado por outros estudos (DUARTE et al., 2003; VIVAN et al., 2010; MASSI et al., 2011; DUARTE et al., 2012; CAVENAGO et al., 2014).

O pH alcalino e a liberação de íons cálcio são propriedades responsáveis pela bioatividade do MTA (GANDOLFI et al., 2010). Estudos anteriores demonstraram que a maior solubilidade do cimento favorece maior pH e liberação de íons cálcio (VIVAN et al., 2010; CAVENAGO et al., 2014), no entanto é de suma importância que haja um equilíbrio de modo a manter a integridade do cimento sem comprometer o selamento.

Para avaliar a solubilidade, normalmente os estudos adotam normas internacionais que standardizam o teste, como as normas ANSI/ADA 57/2000 ou ISO 6876:2001, as quais determinam que o material não deve apresentar solubilidade maior que 3%. No entanto deve-se enfatizar que tais métodos são baseados na diferença de peso do cimento, antes e depois da imersão do cimento em água ultrapura (TORABINEJAD et al., 1995; FRIDLAND; ROSADO, 2003; FRIDLAND; ROSADO, 2005; VIVAN et al., 2010; HUNGARO DUARTE et al., 2012). De acordo com Parirokh e Torabinejad (2010), o padrão de teste de solubilidade baseado no peso das amostras apresenta limitações que podem influenciar nos resultados, pois algumas partículas do material podem ser despendidas durante a armazenagem ou o cimento pode absorver água.

Pelo fato do MTA ser um material hidrofílico é recomendado manter as amostras em um desumidificador para a secagem antes da pesagem inicial e final, a fim de evitar o excesso de água (BORTOLUZZI et al., 2009; DUARTE et al., 2012). Além da possibilidade da influência da água sobre o peso da amostra, outra desvantagem das metodologias ISO e ADA é o corpo de prova utilizado para o teste, no qual possui duas faces com 20 milímetros de diâmetro do cimento em contato com a água, sendo passíveis de solubilização e não condiz com a realidade clínica. Em estudo piloto prévio foi possível constatar a dificuldade em eliminar a água dos corpos de prova, apresentando resultados incompatíveis, pois, em muitas vezes ocorreu um peso maior após a imersão do espécime em água.

Frente a essa adversidade, uma nova metodologia para avaliação da solubilidade foi desenvolvida para este estudo, já validada por estudo piloto (CAVENAGO et al., 2014), mensurando-se o volume do cimento por meio de microtomografia computadorizada. Para simular uma condição clínica, amostras dos cimentos avaliados foram inseridas em retrocavidades de dentes acrílicos, a fim de proporcionar uma única e menor face em contato com o fluido. As referidas amostras foram escaneadas em micro-CT e a partir das imagens geradas reconstruídas foi obtido o volume do material, pré e pós imersão em água, sendo assim, correlacionada a solubilidade por meio da porcentagem da volumetria alterada. Certamente o grande trunfo dessa metodologia é que o viés que a água pode representar, fica excluída da análise, pois somente o material radiopaco é avaliado. No presente estudo, os espécimes foram escaneados antes e após 7 dias da imersão em água, sendo a porcentagem de solubilidade calculada pela diferença de volume entre os dois períodos, dividida pelo volume inicial.

Como requisitado pelas normas ADA ou ISO, o MTA foi imerso em água após presa completa, fato que evita a desfragmentação prematura do cimento. Porter et al. (2010) mostraram que amostras de MTA recém manipulada apresentaram uma perda de material significativa quando imerso em água, o que afetou entre 80 a 100% no selamento marginal. Após imersão em água o cimento sofre processos de erosão e deposição, fatores que estabelecem uma mudança substancial na superfície inicial do material (FORMOSA et al., 2012). Assim o veículo e sua quantidade pode gerar influência na solubilidade do MTA (CAVENAGO et al., 2014). No entanto este estudo demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos avaliados. Todos os grupos apresentaram perda de volume menor que 3%,

como recomendado pela especificação ISO, corroborando com os achados de outros autores (BORTOLUZZI et al., 2009, HUNGARO DUARTE et al., 2012). Solubilidade superior a 3% favorece maior degradação do material e consequentemente, uma maior formação de espaços vazios que pode comprometer o selamento e gerar uma maior infiltração.

PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA

A literatura esta repleta de variados estudos que avaliaram os efeitos antimicrobianos do MTA frente a diversos micro-organismos (PARIROKH; TORABINEJAD, 2010), por meio de testes de difusão em ágar (ESTRELA et al., 2000; HOLT et al., 2007; TANOMARU-FILHO et al., 2007; MORGENTAL et al., 2011), contato direto (AL-NAZHAN; AL-JUDAI, 2003; LOVATO; SEDGLEY, 2011; MORGENTAL et al., 2011) e ação sobre biofilme (ALSALLEEH et al., 2014), porém os resultados obtidos com as diferentes metodologias são divergentes.

Apesar de muito utilizados os testes de difusão em ágar apresentam limitações conhecidas, talvez a principal seja que a formação dos halos de inibição depende muito da capacidade de difusão do material testado no ágar, fator que pode influenciar os resultados (COBANKARA et al., 2004). Um estudo piloto prévio foi realizado, empregando o teste de difusão em ágar com o MTA branco associados aos diferentes extratos propostos frente ao *Enterococcus faecalis* e *Cândida albicans*. Os resultados deste estudo prévio corroboraram os encontrados por Estrela et al. (2000) pois em todas as amostras foram detectados halos de difusão, porém sem halos de inibição.

O teste de contato direto foi utilizado neste estudo pois é um método quantitativo que simula o contato do microrganismo avaliado com o MTA. Este método permite um melhor controle sobre algumas variáveis em relação ao teste de difusão em ágar, como a difusão do material testado (WEISS et al., 1996; ZHANG et al., 2009).

Neste estudo as amostras de MTA foram inseridas em mini tubos de vidro esterilizados, levados ao meio de cultura para o teste após o decorrer do tempo de presa. Diferentemente de outro estudo (HOLT et al., 2007) não foi necessário remover a amostra do molde, este fato permitiu manter uma quantidade padronizada de cimento. Após o contato do cimento com o inócuo, amostras do meio de cultura

em diferentes períodos experimentais foram avaliadas para verificar a cinética de crescimento e redução dos microrganismos.

Ao utilizar a metodologia do contato direto os cimentos apresentaram um baixo potencial antibacteriano frente ao *Enterococcus faecalis*, sendo necessário um ajuste na metodologia, com a redução da concentração do inócuo e a diluição do meio de cultura antes do plaqueamento, para possibilitar a contagem das unidades formadora de colônia (UFC), e assim, avaliar estatisticamente os resultados. No grupo controle positivo foi observada uma cinética decrescente com a redução de UFC com o avançar do tempo. Foi constatado que nenhum dos grupos testados inibiram completamente o crescimento bacteriano em qualquer tempo, corroborando com outro estudo (LOVATO; SEDGLEY, 2011), no entanto todos o grupos experimentais apresentaram uma quantidade significativamente menor de UFC quando comparados ao grupo controle positivo, isso possibilitou indicar o efeito antibacteriano do MTA que não sofreu influência dos extratos associados, exceto no período de 48 horas, no qual o extrato da própolis gerou maior inibição bacteriana em relação o MTA manipulado com água destilada.

Ao empregar a mesma metodologia frente à *Cândida albicans*, o efeito antifúngico do MTA foi constatado, pois em todos os períodos avaliados os cimentos reduziram o número de UFC em relação ao controle positivo. Esse dado encontrado está em acordo com outros reportes na literatura que consideram efetiva a atividade antifúngica do MTA (AL-NAZHAN; AL-JUDAI, 2003; MOHAMMADI et al., 2006; ALSALLEEH et al., 2014), porém essa propriedade é dependente de sua concentração (AL-HEZAIMI et al., 2006).

Somente a associação do MTA com o extrato da própolis proporcionou uma maior inibição, resultando em menor quantidade de unidades formadoras de colônia, que o grupo do cimento manipulado com água destilada, após o período inicial de 10 horas. Nos demais períodos não foi encontrado diferença entre os grupos experimentais.

Com o emprego da metodologia de contato direto e de acordo com os dois micro-organismos utilizados, foi possível inferir que o MTA possui maior efeito antifúngico que antibacteriano, visto que para o fungo foi utilizada uma maior concentração do inócuo para uma menor diluição do mesmo quando comparado com a bactéria.

Outra metodologia utilizada para verificar o efeito antimicrobiano dos cimentos foi a descontaminação dentinária avaliada por microscopia confocal de varredura laser. O uso de tubos de dentina bovina contaminados por *Enterococcus faecalis* foram descritos na literatura (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987; EVANS et al., 2003) para avaliar diferentes substâncias utilizadas no tratamento endodôntico, no entanto nunca foi aplicada para avaliar a ação antimicrobiana do MTA. Nesse estudo essa metodologia foi aplicada somente com o uso do *Enterococcus faecalis* pois essa bactéria é capaz de penetrar e colonizar os túbulos dentinários (LOVE, 2001). A microscopia confocal de varredura laser (MCVL) é um meio eficaz para detectar a viabilidade bacteriana em túbulos dentinários, desde que empregado uma técnica de imunofluorescência (ZAPATA et al., 2008).

Uma metodologia que combina a contaminação dentinária com *Enterococcus faecalis* e a verificação de sua viabilidade por MCVL foi proposta por Ma et al. (2011). Os autores recomendaram a realização de ciclos de centrifugação para promover a contaminação dos corpos de prova e a marcação com o corante fluorescente LIVE/DEAD para a analisar tridimensionalmente a viabilidade bacteriana. Com essa metodologia os autores obtiveram uma contaminação volumosa e uniformemente distribuída em profundidade nos túbulos dentinários, fato confirmado no presente estudo.

Dentes bovinos foram utilizados devido a semelhança estrutural com a dentina humana, segmentos radiculares de 3mm foram obtidos do terço apical, local onde o MTA é utilizado como retro-obturador. Os canais radiculares foram instrumentados até uma lima tipo K número 120 e tratados com EDTA, este procedimento foi adotado para padronizar o volume do canal e facilitar o processo de contaminação, pois de acordo com Haapasalo e Orstavik (1987) a remoção da camada de cimento é importante para facilitar o ingresso de microrganismos nos túbulos dentinários.

Nesse estudo, a metodologia proposta por Ma et al. (2011) foi utilizada com algumas modificações, conforme proposto por outros autores (ARIAS, 2013; MALIZA, 2013), com o intuito de aumentar quantitativa e qualitativamente a contaminação intratubular, sendo realizada com mais ciclos de centrifugação, e após cinco dias, os espécimes encontravam-se aptos para serem testados. A quantificação tridimensional do volume de bactérias vivas e mortas foi realizada utilizando o software BioimageL (CHÁVEZ DE PAZ, 2009).

De acordo com os resultados obtidos com essa metodologia, somente o extrato da própolis foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade bacteriana quando comparado com o cimento manipulado com água destilada após o período de 24 horas, aliás outro dado interessante que foi encontrado no referido período é que o biovolume foi similar entre todos os grupos, indicando um processo de contaminação uniforme, permitindo uma comparação entre grupos confiável. Após 168 horas a viabilidade bacteriana no grupo controle positivo reduziu pela metade ao contrário do observado em outro estudo (ARIAS, 2013) que encontrou viabilidade superior após 15 dias.

Em suma, baseado nessa metodologia o MTA manipulado com água destilada não apresentou efeito antimicrobiano já que em nenhum período avaliado houve diferença significativa em relação ao grupo controle positivo. No entanto, o extrato da própolis agregou a esse efeito. Estudos futuros serão importantes para verificar se a ação antimicrobiana encontrada nesse estudo também se aplica a modelos de micro-organismos estruturados em biofilmes.

BIOCOMPATIBILIDADE

Um material é considerado biocompatível quando não causa danos aos tecidos de um organismo vivo no qual foi implantado. Devido à sua aplicabilidade clínica o MTA permanece em íntimo contato com o periodonto, estudos que avaliaram essa relação consideram a biocompatibilidade do cimento (TORABINEJAD et al., 1995; TORABINEJAD et al., 1997; HOLLAND et al., 1999; BERNABÉ et al., 2007), portanto qualquer alteração em sua composição requer testes preliminares para verificar se a referida propriedade permanece em uma condição análoga.

O MTA inserido em tubo de polietileno implantado em tecido subcutâneo de ratos é um método muito utilizado para determinar a resposta biológica local promovida pelo cimento (YALTIRIK et al., 2004; SHAHI et al., 2006; SUMER et al., 2006; VOSOUGHHOSSEINI et al., 2008; MINOTTI et al., 2014; DA FONSECA et al., 2015). O uso de tubos de polietileno apresenta algumas vantagens pois limita de maneira uniforme a quantidade de cimento, proporcionando em sua extremidade uma interface adequada de contato do cimento com o tecido, além disso facilita o ato da implantação. O tubo de polietileno é considerado biocompatível, dessa forma

é utilizado nos estudos como grupo de referência (SUMER et al., 2006; DA FONSECA et al., 2015), no entanto nesse estudo não foram implantados tubos vazios, para estabelecer o grupo controle foram avaliadas as laterais dos tubos preenchidos com os cimentos experimentais (MINOTTI et al., 2014).

Os períodos experimentais de 15, 30 e 60 dias foram elegidos com base nas recomendações da Federação Dentária Internacional para avaliação biológica de materiais dentários por meio de implantação em tecido subcutâneo (FDI 4.11) sendo os menos utilizados por outros autores (MORETTON et al., 2000; SUMER et al., 2006; MINOTTI et al., 2014).

Aplicando tal metodologia os fenômenos teciduais podem ser observados e quantificados por meio de lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina. A quantificação da resposta inflamatória gerada pelo MTA normalmente é estabelecida através da atribuição de escores (SHAHI et al., 2006; VOSOUGHHOSSEINI et al., 2008; MARTÍNEZ LALIS et al., 2009; ZMENER et al., 2012), entretanto essa forma de avaliação parece representar de forma genérica os resultados. Buscando apresentar dados mais acurados, nesse estudo a histomorfometria foi representada por meio da densidade de volume do tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório, bem como suas células constituintes.

A constatação microscópica da presença de tecido conjuntivo fibroso constituindo uma cápsula sobre material implantado indica que o mesmo é bem tolerado pelos tecidos (YALTIRIK et al., 2004) fato que foi observado nesse estudo em todos os grupos experimentais. O MTA exibiu um infiltrado inflamatório de baixa intensidade ao contrário da severa reação com necrose de coagulação apresentada no estudo de Moretton et al. (2000) essa diferença pode ser explicada pelo corpo de prova utilizado, haja visto que o referido autor implantou discos de MTA. Um resultado interessante observado em nosso estudo é que nenhum extrato interferiu na biocompatibilidade do MTA, apesar de serem considerados substâncias anti-inflamatórias (BURDOCK, 1998; ESTEVES et al., 2005; CHAN et al., 2010). De acordo com os fenômenos histológicos a cinética observada no tecido subcutâneo foi o aumento do tecido conjuntivo e a redução do infiltrado inflamatório conforme o decorrer do tempo em concordância com outros estudos (HOLLAND et al., 2002; BÓRIO et al., 2014; DA FONSECA et al., 2015).

Diversos estudos demonstram a resposta inflamatória do MTA quando implantado em tecido subcutâneo, porém a literatura é escassa quanto a

informações dessa resposta em tecido alveolar, sítio mais próximo das condições clínicas. Nesse estudo o MTA foi implantado em dois sítios distintos no mesmo animal seguindo modelo experimental similar ao proposto por Moretton et al. (2000), entretanto os cimentos foram inseridos em tubos de polietileno e estes implantados no alvéolo e tecido subcutâneo de ratos.

O emprego da microtomografia computadorizada permitiu o escaneamento das maxilas dos animais que resultou em imagens tridimensionais com alta resolução, as quais foram avaliadas previamente ao processamento histotécnico das amostras. Esse recurso adicional permitiu uma avaliação complementar à análise histológica, por meio da observação nos diferentes planos a neoformação de tecido ósseo foi constatada através de áreas radiopocadas compatíveis com osso no interior do espaço alveolar, essa característica foi similar entre os grupos experimentais sendo mais definida e presente nos períodos mais longos. Uma característica interessante foi observada em alguns espécimes, nos quais as imagens obtidas no plano coronal sugeriram uma deposição de tecido ósseo diretamente em contato com o cimento implantado, porém quando avaliado as lâminas histológicas isso nunca foi confirmado pois mesmo em casos avançados de reparo sempre foi encontrada uma fina cápsula fibrosa formando uma interface entre o cimento implantado e o osso formado. A partir das imagens microtomográficas seria possível realizar uma análise morfométrica com dados volumétricos a respeito do tecido ósseo neoformado. No entanto o uso dessa tecnologia é recente e a literatura ainda não apresenta um protocolo estabelecido para esse tipo de análise.

Ainda sobre o tecido alveolar, após avaliar as lâminas histológicas referentes ao período de 15 dias, foi constatada uma resposta microscópica similar entre os grupos avaliados, pois a quantificação da área de infiltrado inflamatório demonstrou que não houve diferença dos grupos experimentais quando comparados com o controle. No estudo de Cintra et al. (2006) que empregou metodologia semelhante foi observado tecido ósseo próximo à extremidade do tubo implantado após 7 dias, porém em nosso estudo a análise histomorfométrica não revelou tecido ósseo após o período de 15 dias, isso pode ser creditado ao aumento microscópico de 100 vezes utilizado para essa finalidade, haja vista que as análises histológica descritiva e microtomográfica detectaram em todos os grupos uma discreta formação de tecido ósseo localizado, principalmente, na porção final do alvéolo. Aos 30 dias a análise microscópica revelou que a resposta inflamatória ocorreu de forma similar entre

todos os grupos, fato também reportado por outros autores (CINTRA et al., 2006; GOMES-FILHO et al., 2011). A partir desse período foi possível contabilizar tecido ósseo na histomorfometria, fato que indica a presença do referido tecido próximo ao implante.

A avaliação microscópica do processo de reparo dos alvéolos ficou comprometida no período mais longo, aos 60 dias, por conta de um problema de ordem metodológica, em suma foi frequentemente observado nesse período o fato de o tubo ser “extruído” do alvéolo. Esse fenômeno pode ter ocorrido pela neoformação óssea no fundo do alvéolo, observada por meio das imagens obtidas por microtomografia computadorizada, que promoveu o deslocamento do tubo, o qual não apresentou retentividade adequada. Provavelmente, não se deve à incompatibilidade do implante aos tecidos, pois outros estudos que empregaram a mesma metodologia demonstraram o reparo do tecido alveolar, no entanto o período mais longo avaliado foi de 30 dias (CINTRA et al., 2006; GOMES-FILHO et al., 2011).

Com o deslocamento do implante do alvéolo estabeleceu-se uma via de comunicação com o meio bucal, a qual proporcionou a contaminação do alvéolo, justificando, assim, a presença de um intenso infiltrado inflamatório, com presença massiva de neutrófilos, observada em diversos espécimes, dos diferentes grupos no período de 60 dias. Outra situação ocorrida nesse período foi a constatação da ausência do tubo implantado no alvéolo em diversos espécimes. Com esse viés da metodologia o número de espécimes ficou limitado impossibilitando a avaliação estatística da histomorfometria realizada. No entanto, a resposta dos materiais no período de 60 dias, pôde ser avaliada no tecido subcutâneo, sendo mais uma vez detectada similaridade entre os grupos experimentais, com um discreto avanço no processo de reparo observado na análise histológica descritiva no grupo no qual se empregou o extrato da própolis.

As citocinas são responsáveis por mediar e regular reações imunológicas e inflamatórias (ABBAS et al., 2012) presentes no processo de reparo ósseo alveolar. Dessa forma duas citocinas, uma pró-inflamatória (TNF- α) e outra anti-inflamatória (IL-10) foram dosadas nos tecidos alveolares nos quais receberam os implantes.

Sabe-se que o TNF- α apresenta uma função central na estimulação e regulação das respostas imune e inflamatória, um exemplo importante refere-se a perda de tecido ósseo decorrente de uma resposta inflamatória, isso ocorre pois a

referida citocina é capaz de modular tanto células precursoras e osteoblastos maduros quanto formação e a atividade dos osteoclastos (GRAVES; COCHRAN, 2003).

Por outro lado a interleucina 10 (IL-10) além de inibir a produção de fatores osteoclastogênicos também estimula a produção de seus respectivos antagonistas, dessa forma apresenta efeito inibitório quanto a liberação de TNF- α , favorecendo a formação de tecido ósseo mesmo que de forma indireta (ABBAS LICHTMAN; PILLAI, 2011; VIEIRA, 2013).

Em nosso estudo todos os grupos apresentaram um pico de expressão de TNF- α aos 15 dias com redução no período seguinte, isso pode ser justificado pois na fase inicial do reparo alveolar a expressão de TNF- α é maior em decorrência do estímulo da exodontia e da inserção do implante (VIEIRA, 2013). Já a expressão de IL-10 ocorreu de forma inversa. Outro estudo que avaliou o efeito do MTA quanto a expressão de TNF- α e IL-10 encontrou que o cimento foi capaz de modular a expressão das citocinas pro-inflamatórias e ainda promoveu o aumento de IL-10 no tecido em contato com os materiais, nesse caso o estudo foi realizado em tecido subcutâneo de ratos (REYES-CARMONA et al., 2011), mesmo assim é válido ressaltar que o cimento apresentou o mesmo padrão na indução molecular em dois tecidos distintos.

Os achados moleculares confirmaram a cinética histomorfométrica, uma vez que a redução da densidade de células inflamatórias no período de 30 dias em relação ao período anterior pode ser associada com o aumento da expressão de IL-10 e a redução na expressão de TNF- α . Um dado importante foi que o MTA induziu, de forma quantitativa, uma maior expressão de IL-10 em relação ao TNF- α , indicando que o cimento pode apresentar alguma resposta anti-inflamatória, independentemente da associação de algum extrato.

Diante dos resultados obtidos, pode se constatar que as associações empregadas com o MTA não alteraram sua biocompatibilidade e pareceram não influir determinantemente nas propriedades físico-químicas avaliadas, salvo pelo tempo de presa. Porém, os extratos da *Arctium lappa* L. e *Casearia sylvestris* SW não acrescentaram em relação ao potencial antimicrobiano do MTA frente ao *Enterococcus faecalis* e a *Cândida Albicans*. Já o extrato da própolis favoreceu um maior efeito antibacteriano e antifúngico no diferentes períodos avaliados.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos com os métodos aplicados neste estudo foi possível concluir que :

- A *Arctium lappa* L., *Casearia sylvestris* SW. e a própolis verde a 10% em extratos aquoso e/ou em propilenoglicol associados ao MTA branco, aumentaram significativamente o tempo de presa final do cimento, porém não houve influência na solubilidade e na capacidade do cimento em manter o pH alcalino e liberar íons cálcio.
- Os extratos em propilenoglicol aumentaram o escoamento do cimento.
- O extrato da própolis agregou o efeito antimicrobiano do MTA frente ao *Enterococcus faecalis* e a *Cândida albicans* e aumentou a descontaminação dentinária.
- O MTA mostrou-se biocompatível independentemente do uso dos extratos, os quais não alteraram essa propriedade.
- A associação dos extratos não influenciaram na expressão das citocinas TNF- α e IL-10.

Referências

REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. 592 p.
- Al-Hezaimi K, Al-Hamdan K, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JH, Rotstein I. Effect of white-colored mineral trioxide aggregate in different concentrations on *Candida albicans* in vitro. *J Endod*. 2005;31(9):684-6.
- Al-Hezaimi K, Al-Shalan TA, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JH, Rotstein I. Antibacterial effect of two mineral trioxide aggregate (MTA) preparations against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus sanguis* in vitro. *J Endod*. 2006;32(11):1053-6.
- Al-Nazhan S, Al-Judai A. Evaluation of antifungal activity of mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2003;29(12):826-7.
- Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *J Endod*. 2004;30(5):359-61.
- AlAnezi AZ, Zhu Q, Wang YH, Safavi KE, Jiang J. Effect of selected accelerants on setting time and biocompatibility of mineral trioxide aggregate (MTA). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;111(1):122-7.
- Albano MN, da Silveira MR, Danielski LG, Florentino D, Petronilho F, Piovezan AP. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). *J Ethnopharmacol*. 2013;147(3):612-7.
- Alsalleeh F, Chung N, Stephenson L. Antifungal activity of endosequence root repair material and mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2014;40(11):1815-9.
- Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Brink F. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2005;31(2):101-3.
- Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Stowe S, Brink F. A qualitative X-ray analysis of white and grey mineral trioxide aggregate using compositional imaging. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17(2):187-91.
- Awawdeh L, Al-Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: a laboratory study. *Aust Endod J*. 2009;35(2):52-8.
- Bankova V, Christov R, Kujumgiev A, Marcucci MC, Popov S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z Naturforsch C*. 1995;50(3-4):167-72.
- Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol*. 2005;100(1-2):114-7.

- Basturk FB, Nekoofar MH, Gunday M, Dummer PM. Effect of various mixing and placement techniques on the flexural strength and porosity of mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2014;40(3):441-5.
- Bernabé PF, Gomes-Filho JE, Rocha WC, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Dezan-Júnior E. Histological evaluation of MTA as a root-end filling material. *Int Endod J*. 2007;40(10):758-65.
- Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2012;38(4):495-500.
- Bodrumlu E. Biocompatibility of retrograde root filling materials: a review. *Aust Endod J*. 2008;34(1):30-5.
- Bortoluzzi EA, Araújo GS, Guerreiro Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Marginal gingiva discoloration by gray MTA: a case report. *J Endod*. 2007;33(3):325-7.
- Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru Filho M, Esberard RM. The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *J Endod*. 2009;35(4):550-4.
- Bósio CC, Felipe GS, Bortoluzzi EA, Felipe MC, Felipe WT, Rivero ER. Subcutaneous connective tissue reactions to iRoot SP, mineral trioxide aggregate (MTA) Fillapex, DiaRoot BioAggregate and MTA. *Int Endod J*. 2014;47(7):667-74.
- Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 jan. 2001.
- Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol*. 1998;36(4):347-63.
- Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater*. 2005;21(4):297-303.
- Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J*. 2006;39(10):747-54.
- Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2007;40(6):462-70.
- Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2008;41(5):408-17.
- Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent*. 2008;11(4):141-3.

- Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater.* 2013;29(5):580-93.
- Cavenago BC, Pereira TC, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Marciano MA, Bramante CM, et al. Influence of powder-to-water ratio on radiopacity, setting time, pH, calcium ion release and a micro-CT volumetric solubility of white mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2014;47(2):120-6.
- Chan YS, Cheng LN, Wu JH, Chan E, Kwan YW, Lee SM, et al. A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock). *Inflammopharmacology.* 2010.
- Chávez de Paz LE. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(6):1734-9.
- Cintra LT, de Moraes IG, Estrada BP, Gomes-Filho JE, Bramante CM, Garcia RB, et al. Evaluation of the tissue response to MTA and MBPC: Microscopic analysis of implants in alveolar bone of rats. *J Endod.* 2006;32(6):556-9.
- 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(1):57-60.
- Costa MMTM. Avaliação da reação tecidual frente aos cimentos MTA Ângelus® cinza e um MTA fotopolimerizável experimental. Análise microscópica em alvéolos dentários de ratos [tese]. Araçatuba (SP): Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista; 2008.
- da Fonseca TS, da Silva GF, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. In vivo evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. *Int Endod J.* 2015.
- de Almeida AB, Sánchez-Hidalgo M, Martín AR, Luiz-Ferreira A, Trigo JR, Vilegas W, et al. Anti-inflammatory intestinal activity of *Arctium lappa* L. (Asteraceae) in TNBS colitis model. *J Ethnopharmacol.* 2013;146(1):300-10.
- de Rezende GP, da Costa LR, Pimenta FC, Baroni DA. In vitro antimicrobial activity of endodontic pastes with propolis extracts and calcium hydroxide: a preliminary study. *Braz Dent J.* 2008;19(4):301-5.
- DeAngelis L, Chockalingam R, Hamidi-Ravari A, Hay S, Lum V, Sathorn C, et al. In vitro assessment of mineral trioxide aggregate setting in the presence of interstitial fluid alone. *J Endod.* 2013;39(3):402-5.
- Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SA, Dandiya PC. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol.* 1991;35(1):77-82.
- Duarte MA, Alves de Aguiar K, Zeferino MA, Vivan RR, Ordinola-Zapata R, Tanomaru-Filho M, et al. Evaluation of the propylene glycol association on some

physical and chemical properties of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2012;45(6):565-70.

Duarte MA, Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga SeC. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95(3):345-7.

Duarte MA, Midená RZ, Zeferino MA, Vivan RR, Weckwerth PH, Dos Santos F, et al. Evaluation of pH and calcium ion release of calcium hydroxide pastes containing different substances. *J Endod*. 2009;35(9):1274-7.

Esteves I, Souza IR, Rodrigues M, Cardoso LG, Santos LS, Sertie JA, et al. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. *J Ethnopharmacol*. 2005;101(1-3):191-6.

Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J*. 2000;11(1):3-9.

Estrela C, Estrada-Bernabé PF, de Almeida-Decurcio D, Almeida-Silva J, Rodrigues-Araújo-Estrela C, Poli-Figueiredo JA. Microbial leakage of MTA, Portland cement, Sealapex and zinc oxide-eugenol as root-end filling materials. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16(3):e418-24.

Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod*. 2003;29(5):338-9.

Ferreira FB, Torres SA, Rosa OP, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC, et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;104(5):709-16.

Fridland M, Rosado R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. *J Endod*. 2003;29(12):814-7.

Fridland M, Rosado R. MTA solubility: a long term study. *J Endod*. 2005;31(5):376-9.

Gandolfi MG, Iacono F, Agee K, Siboni F, Tay F, Pashley DH, et al. Setting time and expansion in different soaking media of experimental accelerated calcium-silicate cements and ProRoot MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108(6):e39-45.

Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, Prati C. Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *Int Endod J*. 2010;43(10):917-29.

Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The dual role of p55 tumour necrosis factor- α receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol*. 2007;147(1):128-38.

- Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21(1):12-20.
- Gartner AH, Dorn SO. Advances in endodontic surgery. *Dent Clin North Am*. 1992;36(2):357-78.
- Gentil M, Pereira JV, Sousa YT, Pietro R, Neto MD, Vansan LP, et al. In vitro evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressings. *Phytother Res*. 2006;20(3):184-6.
- Godoi APT. Estudo do Óleo essencial de *Casearia sylvestris* e da Formulação de Enxaguatório bucal. Caracterização química, Citotoxicidade, Potencial antimicrobiano e Efeito nas propriedades dos Materiais Odontológicos estéticos [tese]. Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2013.
- Gomes-Filho JE, de Moraes Costa MM, Cintra LT, Duarte PC, Takamiya AS, Lodi CS, et al. Evaluation of rat alveolar bone response to Angelus MTA or experimental light-cured mineral trioxide aggregate using fluorochromes. *J Endod*. 2011;37(2):250-4.
- Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003;74(3):391-401.
- Guttuso J. Histopathologic study of rat connective tissue responses to endodontic materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1963;16:713-27.
- Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res*. 1987;66(8):1375-9.
- Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;91(5):579-86.
- Hernandez EP, Botero TM, Mantellini MG, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages in vitro. *Int Endod J*. 2005;38(2):137-43.
- Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod*. 1999;25(3):161-6.
- Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Reaction of dogs' teeth to root canal filling with mineral trioxide aggregate or a glass ionomer sealer. *J Endod*. 1999;25(11):728-30.
- Holland R, de Souza V, Nery MJ, Bernabé FE, Filho JA, Junior ED, et al. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. *J Endod*. 2002;28(3):173-6.

- Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Júnior IM, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J*. 2002;13(1):23-6.
- Holt DM, Watts JD, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. The anti-microbial effect against enterococcus faecalis and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chlorhexidine liquid. *J Endod*. 2007;33(7):844-7.
- Huang TH, Yang CC, Ding SJ, Yeng M, Kao CT, Chou MY. Inflammatory cytokines reaction elicited by root-end filling materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;73(1):123-8.
- Hungaro Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru Filho M, et al. Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2012;38(3):394-7.
- Johnson BR. Considerations in the selection of a root-end filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999;87(4):398-404.
- Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Gogulnath D, Kindo AJ. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2010;43(5):419-23.
- Kayaoglu G, Ömürlü H, Akca G, Gürel M, Gençay Ö, Sorkun K, et al. Antibacterial activity of Propolis versus conventional endodontic disinfectants against *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules. *J Endod*. 2011;37(3):376-81.
- Knipping K, van Esch EC, Wijering SC, van der Heide S, Dubois AE, Garssen J. In vitro and in vivo anti-allergic effects of *Arctium lappa* L. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008;233(11):1469-77.
- Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I. The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod*. 2006;32(6):569-72.
- Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res*. 1997;37(3):432-9.
- Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol*. 2000;45(2):141-8.
- Kramer PR, Woodmansey KF, White R, Primus CM, Opperman LA. Capping a pulpotomy with calcium aluminosilicate cement: comparison to mineral trioxide aggregates. *J Endod*. 2014;40(9):1429-34.

- Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*. 1999;64(3):235-40.
- Lee BN, Hwang YC, Jang JH, Chang HS, Hwang IN, Yang SY, et al. Improvement of the properties of mineral trioxide aggregate by mixing with hydration accelerators. *J Endod*. 2011;37(10):1433-6.
- Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod*. 1993;19(11):541-4.
- Lovato KF, Sedgley CM. Antibacterial activity of endosequence root repair material and proroot MTA against clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2011;37(11):1542-6.
- Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J*. 2001;34(5):399-405.
- Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod*. 2011;37(10):1380-5.
- Madhubala MM, Srinivasan N, Ahamed S. Comparative Evaluation of Propolis and Triantibiotic Mixture as an Intracanal Medicament against *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2011;37(9):1287-9.
- Maliza A. Desinfecção intratubular de dentes bovinos por soluções de hipoclorito de sódio acidificas [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2013.
- Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 1995;26:83-99.
- Marcucci MC, Ferreres F, García-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol*. 2001;74(2):105-12.
- Martínez Lalis R, Esaín ML, Kokubu GA, Willis J, Chaves C, Grana DR. Rat subcutaneous tissue response to modified Portland cement, a new mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J*. 2009;20(2):112-7.
- Massi S, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Duarte MA, Grizzo LT, Rabelo Buzalaf MA, et al. pH, Calcium Ion Release, and Setting Time of an Experimental Mineral Trioxide Aggregate-based Root Canal Sealer. *J Endod*. 2011;37(6):844-6.
- McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod*. 2004;30(4):218-9.

Minotti PG, Ordinola-Zapata R, Miden RZ, Marciano MA, Cavenago BC, Bramante CM, et al. Rat subcutaneous tissue response to calcium silicate containing different arsenic concentrations. *J Appl Oral Sci.* 2014;0.

Mohammadi Z, Modaresi J, Yazdizadeh M. Evaluation of the antifungal effects of mineral trioxide aggregate materials. *Aust Endod J.* 2006;32(3):120-2.

Moretton TR, Brown CE, Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *J Biomed Mater Res.* 2000;52(3):528-33.

Morgental RD, Vier-Pelisser FV, Oliveira SD, Antunes FC, Cogo DM, Kopper PM. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *Int Endod J.* 2011;44(12):1128-33.

Nekoofar MH, Aseeley Z, Dummer PM. The effect of various mixing techniques on the surface microhardness of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2010;43(4):312-20.

Olsson B, Sliwowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod.* 1981;7(8):355-67.

Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6(4):142-9.

Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endod.* 1998;24(2):91-6.

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* 2010;36(1):16-27.

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod.* 2010;36(3):400-13.

Pereira JV, Bergamo DC, Pereira JO, França SeC, Pietro RC, Silva-Sousa YT. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. *Braz Dent J.* 2005;16(3):192-6.

Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, van Winkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2001;27(2):76-81.

Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Fédération Dentaire Internationale, Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. *Int Dent J.* 1980;30(2):140-88.

Reyes-Carmona JF, Santos AR, Figueiredo CP, Felipe MS, Felipe WT, Cordeiro MM. In vivo host interactions with mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide: inflammatory molecular signaling assessment. *J Endod.* 2011;37(9):1225-35.

- Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent Mater*. 2008;24(2):149-64.
- Salomão K, Pereira PR, Campos LC, Borba CM, Cabello PH, Marcucci MC, et al. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008;5(3):317-24.
- Scazzocchio F, D'Auria FD, Alessandrini D, Pantanella F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res*. 2006;161(4):327-33.
- Schneider NFZ, Moura NF, Colpo T, Flach A. Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oil of *Casearia sylvestris* Swart. *Rev Bras Farm* 2006;87 112-4.
- Schneider R, Holland GR, Chiego D, Hu JC, Nör JE, Botero TM. White mineral trioxide aggregate induces migration and proliferation of stem cells from the apical papilla. *J Endod*. 2014;40(7):931-6.
- Seidel V, Peyfoon E, Watson DG, Fearnley J. Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytother Res*. 2008;22(9):1256-63.
- Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol*. 2007;113(1):1-14.
- Shah PM, Chong BS, Sidhu SK, Ford TR. Radiopacity of potential root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996;81(4):476-9.
- Shahi S, Rahimi S, Lotfi M, Yavari H, Gaderian A. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. *J Endod*. 2006;32(8):776-80.
- Silva FB, Almeida JM, Sousa SM. Natural medicaments in endodontics -- a comparative study of the anti-inflammatory action. *Braz Oral Res*. 2004;18(2):174-9.
- Siqueira JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97(5):632-41.
- Siqueira JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J*. 2001;34(1):1-10.
- Song JS, Mante FK, Romanow WJ, Kim S. Chemical analysis of powder and set forms of Portland cement, gray ProRoot MTA, white ProRoot MTA, and gray MTA-Angelus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(6):809-15.
- Sumer M, Muglali M, Bodrumlu E, Guvenc T. Reactions of connective tissue to amalgam, intermediate restorative material, mineral trioxide aggregate, and mineral trioxide aggregate mixed with chlorhexidine. *J Endod*. 2006;32(11):1094-6.

- 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(1):86-93.
- Takaisi-Kikuni NB, Schilcher H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med.* 1994;60(3):222-7.
- Tanomaru-Filho M, Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *J Oral Sci.* 2007;49(1):41-5.
- Teske M, Trentini AMM. *Compêndio de fitoterapia.* 4. ed. Curitiba: Editora Herbarium, 2001.
- Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod.* 1993;19(12):591-5.
- Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *J Endod.* 1995;21(12):603-8.
- Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* 1995;21(7):349-53.
- Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kaiyawasam SP. Tissue reaction to implanted super-EBA and mineral trioxide aggregate in the mandible of guinea pigs: a preliminary report. *J Endod.* 1995;21(11):569-71.
- Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. *J Endod.* 1995;21(8):403-6.
- Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod.* 1995;21(10):489-92.
- Torabinejad M, White DJ. Tooth filling material and use. US Patent number 5,769,638; May 1995.
- Torabinejad M, Pitt Ford TR. Root end filling materials: a review. *Endod Dent Traumatol.* 1996;12(4):161-78.
- Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod.* 1997;23(4):225-8.
- Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod.* 2010;36(2):190-202.

- Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. I. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1966;21(3):379-87.
- Troca VB, Fernandes KB, Terrile AE, Marcucci MC, Andrade FB, Wang L. Effect of green propolis addition to physical mechanical properties of glass ionomer cements. J Appl Oral Sci. 2011;19(2):100-5.
- Tyagi SP, Sinha DJ, Garg P, Singh UP, Mishra CC, Nagpal R. Comparison of antimicrobial efficacy of propolis, *Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica* (Neem) and 5% sodium hypochlorite on *Candida albicans* biofilm formed on tooth substrate: An in-vitro study. J Conserv Dent. 2013;16(6):532-5.
- Vieira AE. Caracterização morfométrica e molecular do papel de citocinas pró e anti-inflamatórias no processo de reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas e infecciosas [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2013.
- Vivan RR, Zapata RO, Zeferino MA, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, et al. Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010;110(2):250-6.
- Vosoughhosseini S, Lotfi M, Shahi S, Baloo H, Mesgariabbasi M, Saghiri MA, et al. Influence of white versus gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. J Endod. 2008;34(6):715-7.
- Weiss EI, Shalhav M, Fuss Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. Endod Dent Traumatol. 1996;12(4):179-84.
- Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. J Endod. 2004;30(2):95-9.
- Zapata RO, Bramante CM, de Moraes IG, Bernardineli N, Gasparoto TH, Graeff MS, et al. Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of *Enterococcus faecalis* in infected dentin. J Endod. 2008;34(10):1198-201.
- Zeferino EG, Bueno CE, Oyama LM, Ribeiro DA. Ex vivo assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide. Int Endod J. 2010;43(10):843-8.
- 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(7):1051-5.
- Zhao F, Wang L, Liu K. In vitro anti-inflammatory effects of arctigenin, a lignan from *Arctium lappa* L., through inhibition on iNOS pathway. J Ethnopharmacol. 2009;122(3):457-62.

Zmener O, Martinez Lalis R, Pameijer CH, Chaves C, Kokubu G, Grana D. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. J Endod. 2012;38(9):1233-8.

Anexos

ANEXO 1 – Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 028/2011

Bauru, 20 de outubro de 2011.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **O efeito do uso de fitoterápicos e da própolis nas propriedades físico-químicas, antimicrobiana e biocompatibilidade do MTA**, de autoria de Bruno Cavallini Cavenago, foi enviado ao relator para avaliação e considerado APROVADO em reunião desta Comissão realizada no dia **18 de outubro de 2011**.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte

Docente do Departamento de Dentística Endodontoia e Materiais Odontológicos

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73

e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356

<http://www.fob.usp.br>

ANEXO 2 – Resultados das análises da própolis utilizada no estudo

Tabela 1 - Teor de constituintes da própolis utilizada no estudo e limites de referência estabelecidos pelo Ministério da Agricultura.

	Própolis	Requisitos do Ministério da Agricultura ¹
Cera	10,21%	Máximo 25%
Cinzas	2,77%	Máximo 5%
Perda por dessecação	3,55%	Máximo 8%
Resíduos insolúveis	41,48%	Máximo 40%

¹ Ministério da Agricultura, Secretaria de Defesa Agropecuária, DIPOA – 2001

Tabela 2 - Teor (%) de fenóis, flavonóides e ação antioxidante total (DPPH) encontrados no extrato da própolis utilizada no estudo e limites de referência estabelecidos pelo Ministério da Agricultura.

	Própolis	Requisitos do Ministério da Agricultura ¹
Fenóis	15%	Mínimo 5%
Flavonóides	0,55%	Mínimo 0,5%
DPPH	11 µg/mL	Máximo 22s

¹ Ministério da Agricultura, Secretaria de Defesa Agropecuária, DIPOA – 2001

ANEXO 3 – Parâmetros de aquisição no escaneamento das amostras de MTA

(Teste de alteração volumétrica)

Data Directory=C:\Users\SkyScan\Documents\Bruno\Solubilidade Tese\Inicial\BDA 1,2,3,4
Filename Prefix=9m_800ua_50kv_1.0
Number Of Files= 360
Number Of Rows= 1024
Number Of Columns= 1304
Partial Width=OFF
Image crop origin X= 0
Image crop origin Y=0
Camera binning=1x1
Image Rotation=0.7300
Gantry direction=CC
Optical Axis (line)= 512
Object to Source (mm)=226.60
Camera to Source (mm)=266.50
Source Voltage (kV)= 50
Source Current (uA)= 800
Image Pixel Size (um)=9.48
Scaled Image Pixel Size (um)=9.476000
Image Format=TIFF
Depth (bits)=16
Screen LUT=0
Exposure (ms)=9000
Rotation Step (deg)=1.000
Use 360 Rotation=YES
FlatField Update=YES
Scanning position=30.362 mm
Flat Field Correction=ON
Frame Averaging=ON (2)
Sharpening (%)=40
Random Movement=OFF
Geometrical Correction=ON
Filter=1mm Al
Rotation Direction=CC
Type of Detector Motion=STEP AND SHOOT
Scanning Trajectory=ROUND
Number of connected scans=1
Study Date and Time=Mar 15, 2013 15:41:58
Scan duration=01:51:48

ANEXO 4 – Parâmetros de reconstrução das amostras de MTA

Reconstruction Program=NRecon Version: 1.6.8.0
Reconstruction engine=GPURconServer Version: 1.6.8
Reconstruction from batch=Yes
Reconstruction servers= SCAN1174_088
Dataset Origin=SkyScan1174v2
Dataset Prefix=9m_800ua_50kv_1.0
Dataset Directory=C:\Users\SkyScan\Documents\Bruno\Solubilidade Tese\Inicial\BDA
1,2,3,4
Output Directory=C:\Users\SkyScan\Documents\Bruno\Solubilidade Tese\Inicial\BDA
1,2,3,4\9m_800ua_50kv_1.0_Rec
First Section=13
Last Section=1009
Reconstruction duration per slice (seconds)=0.347041
Total reconstruction time (997 slices) in seconds=346.000000
Postalignment=-11.50
Section to Section Step=1
Sections Count=997
Result File Type=BMP
Result File Header Length (bytes)=1134
Result Image Width (pixels)=1304
Result Image Height (pixels)=1304
Pixel Size (um)=9.47600
Reconstruction Angular Range (deg)=360.00
Use 180+=OFF
Angular Step (deg)=1.0000
Smoothing=4
Smoothing kernel=2 (Gaussian)
Ring Artifact Correction=6
Draw Scales=OFF
Object Bigger than FOV=OFF
Reconstruction from ROI=OFF
Filter cutoff relative to Nyquist frequency=100
Undersampling factor=1
Threshold for defect pixel mask (%)=0
Beam Hardening Correction (%)=60
CS Static Rotation (deg)=0.00
Minimum for CS to Image Conversion=0.020000
Maximum for CS to Image Conversion=0.600000
HU Calibration=OFF
BMP LUT=0
Cone-beam Angle Horiz.(deg)=3.123617
Cone-beam Angle Vert.(deg)=2.453134

ANEXO 5 – Parâmetros de aquisição no escaneamento das amostras de maxila

Data Directory=C:\Users\SkyScan\Documents\Bruno\Tese - Maxila ratos\30 dias\BDA
30d\BDA 01 30d
Filename Prefix=14um_800ua_50kv_0.5
Number Of Files= 370
Number Of Rows= 1024
Number Of Columns= 1304
Partial Width=OFF
Image crop origin X=0
Image crop origin Y=0
Camera binning=1x1
Image Rotation=0.7300
Gantry direction=CC
Optical Axis (line)= 512
Object to Source (mm)=226.60
Camera to Source (mm)=266.50
Source Voltage (kV)= 50
Source Current (uA)= 800
Image Pixel Size (um)=14.12
Scaled Image Pixel Size (um)=14.121000
Image Format=TIFF
Depth (bits)=16
Screen LUT=0
Exposure (ms)=5000
Rotation Step (deg)=0.500
Use 360 Rotation=NO
FlatField Update=YES
Scanning position=28.759 mm
Flat Field Correction=ON
Frame Averaging=ON (3)
Sharpening (%)=40
Random Movement=OFF
Geometrical Correction=ON
Filter=0.5mm Al
Rotation Direction=CC
Type of Detector Motion=STEP AND SHOOT
Scanning Trajectory=ROUND
Number of connected scans=1
Scan duration=01:37:10

ANEXO 6 – Parâmetros de reconstrução das amostras de maxila

Reconstruction Program=NRecon Version: 1.6.8.0
Reconstruction engine=NReconServer Version: 1.6.8
Reconstruction from batch=Yes
Reconstruction mode=Standard
Dataset Origin=SkyScan1174v2
Dataset Prefix=14um_800ua_50kv_0.5
Dataset Directory=C:\Users\SkyScan\Documents\Bruno\Tese - Maxila ratos\30 dias\BDA
30d\BDA 01 30d
Output Directory=C:\Users\SkyScan\Documents\Bruno\Tese - Maxila ratos\30 dias\BDA
30d\BDA 01 30d\14um_800ua_50kv_0.5_Rec
First Section=3
Last Section=1022
Reconstruction duration per slice (seconds)=0.720588
Total reconstruction time (1020 slices) in seconds=735.000000
Postalignment=-5.50
Section to Section Step=1
Sections Count=1020
Result File Type=BMP
Result File Header Length (bytes)=1134
Result Image Width (pixels)=1304
Result Image Height (pixels)=1304
Pixel Size (um)=14.12100
Reconstruction Angular Range (deg)=185.00
Use 180+=OFF
Angular Step (deg)=0.5000
Smoothing=4
Smoothing kernel=2 (Gaussian)
Ring Artifact Correction=5
Draw Scales=OFF
Object Bigger than FOV=OFF
Reconstruction from ROI=OFF
Filter cutoff relative to Nyquist frequency=100
Undersampling factor=1
Threshold for defect pixel mask (%)=0
Beam Hardening Correction (%)=40
CS Static Rotation (deg)=0.00
Minimum for CS to Image Conversion=0.020000
Maximum for CS to Image Conversion=0.130000
HU Calibration=OFF
BMP LUT=0
Cone-beam Angle Horiz.(deg)=4.653363
Cone-beam Angle Vert.(deg)=3.654945

ANEXO 7 – Publicação associada a esta Tese.

International Endodontic Journal

doi:10.1111/iej.12120

Influence of powder-to-water ratio on radiopacity, setting time, pH, calcium ion release and a micro-CT volumetric solubility of white mineral trioxide aggregate**B. C. Cavenago, T. C. Pereira, M. A. H. Duarte, R. Ordinola-Zapata, M. A. Marciano, C. M. Bramante & N. Bernardineli**

Department of Operative Dentistry, Endodontics and Dental Materials, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, São Paulo, Brazil

Abstract

Cavenago BC, Pereira TC, Duarte MAH, Ordinola-Zapata R, Marciano MA, Bramante CM, Bernardineli N. Influence of powder-to-water ratio on radiopacity, setting time, pH, calcium ion release and a micro-CT volumetric solubility of white mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal*.

Aim To evaluate the radiopacity, setting time, pH level, calcium ion release and solubility of white mineral trioxide aggregate (MTA; Angelus, Londrina, Pr, Brazil) with different powder-to-water ratios.

Methodology Three MTA groups were prepared using 4 : 1, 3 : 1 and 2 : 1 powder-to-water ratios. For the radiopacity analysis, the 10 × 1 mm specimens were arranged on occlusal films with a cylinder of dentine and an aluminium stepwedge. The digitized radiographs were evaluated with Digora 1.51 software to determine the radiographic density. The setting time test was performed according to the American Society for Testing and Materials 266/08 standard specifications, but the specimens were made according to International Organization for Standardization 6876:2001. Thirty acrylic teeth with root-end filling material were immersed in ultrapure water for

measurement of pH level and calcium ion release (atomic absorption spectrophotometer) at 3, 24, 72 and 168 h. In the solubility test, the root-end fillings of 30 acrylic teeth were scanned twice by a Micro-CT, before and after immersion in ultrapure water for 168 h. Digital data were reconstructed, and the volume (mm³) of the samples was obtained using CTan software (CTan v1.11.10.0, SkyScan). The data were statistically analysed by the ANOVA, Tukey, Kruskal-Wallis and Dunn's tests.

Results The radiopacity was higher ($P < 0.05$) when the 4 : 1 proportion was utilized. The setting time was longer, and the pH level and calcium ion release were higher ($P < 0.05$) with a greater volume of water. The group with more water (2 : 1) had significantly ($P < 0.05$) more material volume loss (6.46%) compared with the other groups.

Conclusions The ratio of powder/water significantly interfered with the physical and chemical properties of white MTA Angelus.

Keywords: chemical and physical properties, material testing, MTA.

Received 5 July 2012; accepted 3 April 2013