

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

LETICIA LOBO DE MELO SIMAS

**Interaction of dual biofilm with commercial and
experimental endodontic cements of calcium silicate**

**Interação de biofilme microbiano misto com cimentos
endodônticos comerciais e experimentais de silicato de
cálcio**

BAURU
2023

LETICIA LOBO DE MELO SIMAS

Interaction of dual specie biofilm with commercial and experimental endodontic cements of calcium silicate

Interação de biofilme microbiano misto com cimentos endodônticos comerciais e experimentais de silicato de cálcio

Dissertação constituída por artigo apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas aplicadas, na área de concentração Endodontia

Orientador: Prof. Dr.^a Flaviana Bombarda de Andrade

BAURU
2023

Lobo de Melo Simas, Leticia

Interação de biofilme microbiano misto com cimentos endodônticos comerciais e experimentais de silicato de cálcio / Leticia Lobo de Melo Simas. -- Bauru, 2023.

51 p. : il. ; 31 cm.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2023.

Orientador: Prof. Dr. ^a Flaviana Bombarda de Andrade

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

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 56193422.5.0000.5417
Data:09/05/2022



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Assistência Técnica Acadêmica
Serviço de Pós-Graduação

FOLHA DE APROVAÇÃO

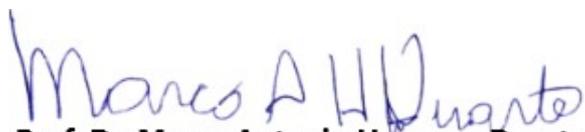
Dissertação apresentada e defendida por
LETÍCIA LOBO DE MELO SIMAS
e aprovada pela Comissão Julgadora
em 28 de novembro de 2023.

Prof.^a Dr.^a **LIDIANE DE CASTRO PINTO**
HRAC-USP

Prof.^a Dr.^a **MARINA ANGÉLICA MARCIANO DA SILVA**
FOP-UNICAMP

Prof.^o Dr.^o **MARCO ANTONIO HUNGARO DUARTE**
FOB-USP

Prof.^a Dr.^a **FLAVIANA BOMBARDA DE ANDRADE**
Presidente da Banca
FOB - USP


Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte
Presidente da Comissão de Pós-Graduação
FOB-USP



USP
FACULDADE
DE
ODONTOLOGIA
DE
BAURU



Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 | Bauru-SP | CEP 17012-901



www.posgraduacao.fob.usp.br



[posgraduacaofobusp](https://www.facebook.com/posgraduacaofobusp)



[fobuspoficial](https://www.youtube.com/fobuspoficial)



14 3235-8223



posgrad@fob.usp.br



[@posgradfobusp](https://www.instagram.com/posgradfobusp)



[@FobPos](https://twitter.com/FobPos)

DEDICATÓRIA

Gostaria de dedicar este trabalho principalmente a minha família, a qual sempre me apoiou na minha trajetória.

Quero também dedicar a minha Professora Flaviana Bombarda de Andrade, por todas as oportunidades durante esses anos, sou muito grata pelos artigos publicados, inúmeros aprendizados no meio científico e por sempre ter me auxiliado.

Dedico também meu trabalho a meus colegas da Endodontia, pois só com a ajuda deles foi possível concluir este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pois foi ele quem me encaminhou e permitiu realizar minha graduação e pós-graduação na Faculdade de Odontologia de Bauru.

A minha família, em especial a minha mãe Renata e meus irmãos Camila e Alexandre que sempre me apoiaram e deram todo suporte para que conseguisse concluir esta etapa.

Aos meus amigos, Carolina Gachet, Karina Azanha, Ana Beatriz Mói, que me acompanharam e deram suporte durante todo o período.

Não podia deixar de fazer um agradecimento especial a minha companheira de laboratório e amiga Mirela César de Barros, pela parceria, sem sua ajuda tudo seria mais difícil.

A Faculdade de Odontologia de Bauru e a Universidade de São Paulo e a todos os docentes, pela experiência e aprendizado que adquiri nesta instituição e imensurável.

Gostaria também de agradecer ao CNPq a bolsa concedida (processo: 131956/2021-3), que me permitiu concluir minha pós-graduação.

"O mundo não é dos espertos. É das pessoas honestas e verdadeiras. A esperteza um dia é descoberta e vira vergonha. A honestidade se transforma em exemplo para as próximas gerações. Uma corrompe a vida; outra enobrece a alma"

Chico Xavier

RESUMO

Objetivo: avaliar a atividade antimicrobiana de cimentos experimentais a base de silicato de cálcio contendo sulfato de bário e óxido de zircônio prontos para uso e na forma pó-líquido, associados aos veículos propilenoglicol, polietilenoglicol e glicerina, nas proporções de 100% ou de 50% em água destilada. Material e Métodos: o cimento comercial Bio C Sealer[®] foi utilizado como controle. Inicialmente, foi realizado o teste de tempo de presa seguindo as normas ANSI/ADA(2000). A seguir as cepas de *E. faecalis* e *Lactobacillus casei* foram reativadas em caldo BHI e MRS, respectivamente, para a formação de biofilme. Raízes palatinas de 49 molares superiores recém-extraídos foram coletadas, instrumentadas e contaminadas com ambas as cepas supracitadas. Em seguida, as raízes foram obturadas com os cimentos descritos e depois avaliadas em microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). Também foi realizado o teste de contato direto dos cimentos frescos sobre o biofilme, utilizando placas de 24 poços, nos períodos de 1, 24 e 48 horas, a fim de quantificar as unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Resultados: o cimento Bio-C Sealer, seguido do veículo propilenoglicol associado a água proporcionaram a presa mais rápida em relação aos demais grupos. Na contagem de UFC/mL ($p > .05$), o propilenoglicol seguido do cimento Bio-C Sealer foram responsáveis pela maior redução microbiana e, de forma geral, *L. casei* demonstrou maior suscetibilidade aos cimentos testados do que *E. faecalis*. Na análise em MCVL, os menores valores de viabilidade bacteriana foram observados no grupo que continha polietilenoglicol, glicerina, glicerina associada a água e comercial ($p > .05$). Conclusão: o veículo propilenoglicol favoreceu o efeito antimicrobiano nos cimentos experimentais em contato direto, seguido do cimento comercial Bio-C Sealer. Na descontaminação intratubular, os cimentos veiculados em polietilenoglicol, glicerina, glicerina associada a água e comercial obtiveram melhor desempenho.

Descritores: Biofilme. Silicato de cálcio. Atividade antimicrobiana. *Enterococcus faecalis*

ABSTRACT

Interaction of dual species biofilm with commercial and experimental endodontic cements of calcium silicate

Aim: to evaluate the antimicrobial activity of experimental cements based on calcium silicate with barium sulfate and zirconium oxide ready for use and of powder-liquid presentation, associated with the vehicle propylene glycol, polyethylene glycol or glycerin, in proportions of 100% or 50% in distilled water. Material and methods: the commercial sealer Bio C Sealer® was used as control group. At first, the setting time test was performed following the ANSI/ADA (2000) standards. Following, *E. faecalis* and *Lactobacillus casei* strains were reactivated in BHI and MRS broth respectively for biofilm formation. The palatal root of 49 extracted maxillary molars were collected, instrumented, and contaminated with the both strains mentioned above. Subsequently the specimens were filled with the appropriate sealer and thereafter evaluated in confocal laser scanning microscope (CLSM). The direct contact test was also performed using 24-well plates, of fresh sealers over the biofilms, in periods of 1, 24 and 48 hours, in order to quantify the colony forming units (CFU/mL). Results: the commercial sealer, followed by propylene glycol in distilled water group had the faster setting time, compared with the others. In the CFU/mL count ($p>.05$), propylene glycol followed by Bio-C Sealer were responsible for the greatest microbial reduction and, in general, *L. casei* showed greater susceptibility to the tested cements than *E. faecalis*. In the MCVL analysis, the lowest bacterial viability values were observed in the group that contained polyethylene glycol, glycerin, glycerin in distilled water and commercial sealer ($p>.05$). Conclusion: the vehicle propylene glycol favored the antimicrobial effect in the experimental sealers in direct contact, followed by the commercial cement Bio-C Sealer. At the intratubular decontamination, the sealers with polyethylene glycol, glycerin, glycerin in distilled water and commercial sealer had the best performance.

Key – words: Biofilm. Calcium silicate. Antimicrobial activity. *Enterococcus faecalis*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação gráfica da mediana e viabilidade bacteriana após 1, 24 e 48 horas para *L. casei*. 28
- Figura 2 - Representação gráfica da mediana e viabilidade bacteriana após 1, 24 e 48 horas para *E. faecalis*. 29
- Figura 3 - A) Representação gráfica da mediana e viabilidade bacteriana após 10 dias de contato com os cimentos. B) Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de amostras representativas mostraram células bacterianas viáveis (verde) e mortas (vermelhas). 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Grupos e composição química dos cimentos experimentais e comercial utilizados nos testes.	20
Tabela 2 -	Tempo de presa em horas (h) dos cimentos experimentais e comercial.	27
Tabela 3 -	Porcentagem mediana (intervalo de confiança de 95%) de bactérias viáveis nos túbulos dentinários.	46
Tabela 4 -	Mediana (Me), mínimo e máxima (Min-Max) de UFC/mL e redução percentual de <i>L. casei</i> (%) para cada grupo experimental.	47
Tabela 5 -	Mediana (Me), mínimo e máxima (Min-Max) de UFC/mL e redução percentual de <i>E. faecalis</i> (%) para cada grupo experimental.	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	ARTIGO	17
3	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO	41
	APÊNDICE	46
	ANEXO	49

1 Introdução

O tratamento endodôntico bem-sucedido conta com a máxima eliminação da infecção presente no sistema de canais radiculares e a prevenção da re-contaminação desses espaços após o tratamento (CHEUNG & STOCK, 1993; SIQUEIRA et al., 2001). A obturação dos canais radiculares visa o preenchimento do espaço ampliado e descontaminado, com o objetivo de selar hermeticamente esse sistema tridimensionalmente complexo (CHEUNG & STOCK, 1993; SIQUEIRA et al., 2001; CINTRA et al., 2017; GIACOMINO et al., 2019).

Os cimentos endodônticos devem ser confeccionados de forma a permitir satisfatória união guta-percha/dentina, apresentando propriedades físico-químicas adequadas seguindo as normas ISO (*International Organization for Standardization*) (ISSO 6876) e ADA (*American Institute/ American Dental Association*) nº57, que determinam parâmetros para propriedades ideais de solubilidade, pH, tempo de presa e escoamento.

Cimentos endodônticos à base de silicato de cálcio, também denominados cimentos hidráulicos, foram introduzidos na endodontia e ganharam popularidade devido às suas vantagens como bioatividade e biocompatibilidade aos tecidos periapicais (CAMPS et al., 2015; ALSUBAITH et al., 2020).

Uma das vantagens de novos cimentos são suas propriedades bioativas que estimulam as respostas fisiológicas ósseas e a remineralização da estrutura dentinária, criando um ambiente favorável para a cicatrização da periodontite apical (CANDEIRO et al., 2019; BAGHDADI et al., 2020). Os cimentos denominados hidráulicos são baseados nos mecanismos do precursor MTA.

A introdução do agregado trióxido mineral (MTA) na odontologia começou no início dos anos 90, devido à necessidade de um material com propriedades físico-químicas e biológicas satisfatórias, a fim de ser usado em casos de capeamento pulpar direto, como cimento retro-obturador e em acidentes e complicações comuns da prática endodôntica, como as perfurações.

Os estudos iniciais de Torabinejad (1995) mostraram que quando empregado como cimento retro-obturador possuía propriedades físico-químicas superiores aos comumente usados na época como amálgama, IRM e Super EBA, superior capacidade de impedir infiltração bacteriana e menor citotoxicidade (TORABINEJAD et al., 1995). O MTA também

foi sugerido como um material para selar comunicações entre o endodonto e tecidos periodontais mostrando-se superior ao amálgama e IRM na prevenção da infiltração bacteriana (NAKATA et al., 1998).

Considerando os resultados positivos obtidos com o MTA, outros estudos foram realizados, sendo sua principal indicação a regeneração do tecido pulpar e da dentina, obtendo bons resultados em procedimentos de capeamento pulpar, pulpotomia, perfuração radicular, apicificação e reabsorções (ROBERTS et al., 2008; TSATSAS et al., 2005; ZAFAR et al., 2020), além de ser utilizado em cirurgia parodontal como cimento retro-obturador (ALCALDE et al., 2018). O MTA é considerado um material bioativo, pois quando em contato com os tecidos libera hidróxido de cálcio $[Ca(OH)_2]$ estimulando o reparo pulpar ou perirradicular. Segundo Zafar (2020) as propriedades que os materiais bioativos devem apresentar são: resistência adequada, propriedades antimicrobianas, biocompatibilidade, bioatividade (capaz de estimular e modular a resposta do hospedeiro), ser dimensionalmente estável, ter fácil manipulação, ter bom selamento, não ser sensível a umidade, não reabsorvível, não tóxico, não carcinogênico/genotóxico, e apresentar radiopacidade satisfatória.

Assim, baseados nos mecanismos do MTA, os cimentos hidráulicos têm sido recomendados para situações clínicas em que atuarão como reparadores (perfurações, capeamento e obturação retrógrada) ou obturadores (obturações dos canais radiculares) (DUARTE et al., 2018).

Dentre esses novos materiais inclui-se o Bio C Sealer (Angelus, PR, Brasil), cimento pronto para uso que possui em sua composição silicatos de cálcio, aluminato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de ferro, dióxido de silício, óxido de zircônio exercendo a função de radiopacificador e como agente dispersante o polietilenoglicol (SILVA et al., 2020; TAVARES et al., 2021; ANTUNES et al., 2021; SANZ et al., 2021). Mostra-se biocompatível e bioativo quando testado em contato íntimo com tecido subcutâneo de ratos, através da liberação de íons hidroxila que alcalinizam o ambiente e o cálcio, tendo papel fundamental no reparo (SILVA et al., 2020).

Estudos mostraram que suas propriedades físico-químicas de tempo de presa, alcalinização do meio, radiopacidade e alteração dimensional estão dentro dos resultados desejáveis (PRIMUS et al., 2019; ANTUNES et al., 2021; SANZ et al., 2021). Em contrapartida teve solubilidade maior do que a recomendada pelas normas ISO/ADA

(ZORDAN-BRONZEL et al., 2019). Quanto a sua capacidade antimicrobiana o cimento antes de seu tempo de presa final apresentou efetividade contra cepas de *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, porém não contra *S. mutans* e após a presa, Bio C Sealer apresentou potencial antimicrobiano comparável à de outros cimentos comerciais (BARBOSA et al., 2020).

Acredita-se que os diversos resultados ocorrem devido aos diferentes testes microbianos utilizados, e, poucos estudos foram publicados acerca da atividade antibacteriana do cimento a base de silicato de cálcio Bio C Sealer, em especial quando se trata da interação destes cimentos com biofilme bacteriano misto, o que representaria melhor a situação clínica.

Sabe-se que os microrganismos ainda podem estar presentes no momento da obturação e viáveis para causar infecção quando novamente em contato com fluidos tissulares ou exsudato, os quais podem invadir o sistema de canais radiculares, devido a falhas na obturação. Também, infiltração via coronária pode carrear saliva e nutrientes para os mesmos, ainda que o preparo biomecânico seja capaz de mudar drasticamente o ambiente no interior do canal, microrganismos mais resistentes podem manter seu estado de viabilidade e patogenicidade e retomar suas atividades metabólicas quando as fontes de nutrientes são restabelecidas (SIQUEIRA et al., 2018).

Enterococcus faecalis, coco Gram-positivo altamente resistente, tem a capacidade de invadir os túbulos dentinários e resistir ao pH alcalino proporcionado pela pasta de hidróxido de cálcio *in vitro* (VASUDEVA et al., 2017; ZANCAN et al., 2018, VERA et al., 2012), porém pode ser eliminado quando em contato direto (FERREIRA et al, 2007), sendo comumente relacionado a casos de fracasso do tratamento endodôntico. Pinheiro et al. (2003) mostrou que pode ser encontrado em 52,94% dos casos de insucesso.

Quando feita a análise de dentes com persistência de lesão perirradicular, indicados para retratamento endodôntico, *E. faecalis* foi a bactéria mais prevalente presente em 77% dos casos, seguido das espécies anaeróbias *P. alactolyticus*, *P. propionicum*, *D. pneumosintes*, e *F. alocis* (SIQUEIRA & ROÇAS, 2004).

Prada et al. (2019) em sua revisão de literatura cita *E. faecalis* como uma das bactérias mais presentes quando se trata de fracasso do tratamento devido aos seus mecanismos de sobrevivência, em especial a capacidade de formar biofilme e sobreviver por longos períodos sem nutrientes.

Com o desenvolvimento das técnicas anaeróbias houve um progresso no estudo da microbiologia, mostrando que a infecção endodôntica tem etiologia polimicrobiana. Uma vez que os microrganismos entram no canal, eles podem posteriormente invadir os túbulos dentinários e formar um biofilme complexo interagindo com outras espécies (SEN et al., 1997; EGAN et al., 2002).

O caminho mais comum de microrganismos da cavidade oral para a polpa dentária é através da lesão de cárie e assim o sistema de canais radiculares se torna um ambiente favorável à sua proliferação com consequente degradação da polpa (BAUMGARTNER et al., 1991).

Lactobacillus casei é um bacilo, Gram-positivo, anaeróbio facultativo. Desempenha papel importante nas etapas de iniciação e progressão da lesão de cárie profunda (SMILINE et al., 2012).

Apesar de estar associada a cárie dentária, esta espécie também pode ser encontrada no interior dos canais radiculares quando há infecção endodôntica. Lana et al. (2001) realizou uma análise microbiológica de 31 dentes antes e depois da instrumentação e entre os gêneros mais encontrados estava o *Lactobacillus*, juntamente com *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Clostridium* e *Peptostreptococcus*.

Em 1999, Suzuki e colaboradores em seu estudo isolaram 20 espécies bacterianas de canais radiculares com necrose pulpar, sendo uma delas o *Lactobacillus casei*.

Com os materiais e técnicas disponíveis atualmente, as várias etapas do tratamento endodôntico visam alcançar um ambiente o mais asséptico possível nos canais radiculares, para que haja previsibilidade terapêutica. Para isso, a redução da carga microbiana no sistema de canais radiculares é fundamental para que haja o reparo dos tecidos periapicais (SIQUEIRA & ROÇAS, 2008).

Os cimentos endodônticos com atividade antimicrobiana podem representar uma estratégia adicional para eliminar os microrganismos remanescentes dos canais, prevenindo infecções recorrentes e também para promover melhor reparo das estruturas afetadas (SINGH et al., 2016). Além disso, a dificuldade de aderência de microrganismos na superfície desses materiais deve ser bastante desejável.

Visto que nenhum material obturador preenche todos os requisitos apropriados e que a maioria apresenta atividade antimicrobiana somente antes de tomar presa e

discreta atividade após a presa, são relevantes os estudos para entender melhor o mecanismo de ação dos cimentos disponíveis, assim como para desenvolver novos produtos que atendam melhor essa necessidade (BARBOSA et al., 2020).

Portanto, este estudo possibilitou avaliar o comportamento antimicrobiano de cimentos endodônticos comerciais e experimentais frente ao biofilme misto de *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus casei*, visto que não foi encontrado na literatura estudos que correlacionam este tipo de biofilme aos cimentos endodônticos em questão. Além disso, possibilitou a análise de cimentos biocerâmicos experimentais, associados a diferentes veículos, os quais podem alterar seu comportamento. A pesquisa foi feita através do uso da microscopia confocal de varredura laser (MCVL), teste de contato direto (TCD) e determinação do tempo de presa, com a finalidade de avaliar a porcentagem de microrganismos em seus túbulos dentinários, quantificar as unidades formadoras de colônias em contato com os cimentos frescos e determinar o tempo de presa.

2 ARTIGO

O artigo apresentado nesta dissertação foi escrito de acordo com as instruções e orientações para a submissão de artigos apresentados na revista *Journal of Endodontics*.

2.1 Artigo 1

Interação de biofilme microbiano misto com cimentos endodônticos comerciais e experimentais de silicato de cálcio

Leticia Lobo de Melo Simas¹
Mirela Cesar de Barros¹
Jéssica Almeida Coelho¹
Marco Antônio Hungaro Duarte¹
Flaviana Bombarda de Andrade¹

¹Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, São Paulo, Brasil.

Autor correspondente:

Dra. Flaviana Bombarda de Andrade
Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Al. Dr. Octavio Pinheiro
Brisolla, 9-75, Bauru, São Paulo, Brasil.

Email: Flaviana@fob.usp.br

RESUMO

Objetivo: avaliar a atividade antimicrobiana de cimentos experimentais a base de silicato de cálcio contendo sulfato de bário e óxido de zircônio prontos para uso e na forma pó-líquido, associados aos veículos propilenoglicol, polietilenoglicol e glicerina, nas proporções de 100% ou de 50% em água destilada. **Material e Métodos:** o cimento comercial Bio C Sealer[®] foi utilizado como controle. Inicialmente, foi realizado o teste de tempo de presa seguindo as normas ANSI/ADA(2000). A seguir as cepas de *E. faecalis* e *Lactobacillus casei* foram reativadas em caldo BHI e MRS, respectivamente, para a formação de biofilme. Raízes palatinas de 49 molares superiores recém-extraídos foram coletadas, instrumentadas e contaminadas com ambas as cepas supracitadas. Em seguida, as raízes foram obturadas com os cimentos descritos e depois avaliadas em microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). Também foi realizado o teste de contato direto dos cimentos frescos sobre o biofilme, utilizando placas de 24 poços, nos períodos de 1, 24 e 48 horas, a fim de quantificar as unidades formadoras de colônias (UFC/mL). **Resultados:** O cimento Bio-C Sealer, seguido do veículo propilenoglicol associado a água proporcionaram a presa mais rápida em relação aos demais grupos. Na contagem de UFC/mL ($p > .05$), o propilenoglicol seguido do cimento Bio-C Sealer foram responsáveis pela maior redução microbiana e, de forma geral, *L. casei* demonstrou maior suscetibilidade aos cimentos testados do que *E. faecalis*. Na análise em MCVL, os menores valores de viabilidade bacteriana foram observados no grupo que continha polietilenoglicol, glicerina, glicerina associada a água e comercial ($p > .05$). **Conclusão:** o veículo propilenoglicol favoreceu o efeito antimicrobiano nos cimentos experimentais em contato direto, seguido do cimento comercial Bio-C Sealer. Na descontaminação intratubular, os cimentos veiculados em polietilenoglicol, glicerina, glicerina associada a água e comercial obtiveram melhor desempenho.

Descritores: Biofilme. Silicato de cálcio. Atividade antimicrobiana. *Enterococcus faecalis*.

Introdução

O sucesso do tratamento endodôntico depende da redução ou eliminação da infecção intrarradicular (1). O preparo químico e mecânico é responsável pela maior eliminação bacteriana, juntamente com a aplicação de medicação intracanal, porém microrganismos no interior dos canais radiculares e nos túbulos dentinários ainda podem estar viáveis no momento da obturação, logo as propriedades antibacterianas dos cimentos obturadores podem agregar benefícios ao eliminar bactérias persistentes nos túbulos dentinários (2,3). Com as informações disponíveis na literatura é conhecido que cimentos a base de silicato de cálcio ou cimentos hidráulicos, possuem intensa atividade antimicrobiana antes da presa final, sendo ela discreta ou inexistente após a presa. Esses cimentos são uma mistura pó/líquido, em que o pó contém os principais constituintes do material e o líquido é o veículo para dissolução do mesmo (4). Além das propriedades antimicrobianas, também possuem outras características desejáveis como alta biocompatibilidade e baixa citotoxicidade, liberação de hidróxido de cálcio $[Ca(OH)_2]$, selamento contra bactérias e saliva, capacidade de endurecimento na presença de sangramento ou condições úmidas, resistência a compressão adequada e dureza aceitável (5). Porém, sua consistência inadequada que leva a um difícil manuseio e alta solubilidade ainda são dificuldades a serem superadas. O teste de formulações inéditas associadas a diferentes veículos tem grande importância para superar os presentes desafios. Glicerina, propilenoglicol e polietilenoglicol são usados na endodontia como agente dispersante devido as suas adequadas propriedades (4,6). Dissociação iônica, viscosidade, tempo de presa e resposta do tecido podem depender do veículo utilizado (7). Novas formulações associadas a diferentes veículos podem alterar o comportamento dos cimentos endodônticos.

Portanto, este estudo possibilitará avaliar o comportamento antimicrobiano de cimentos endodônticos comerciais e experimentais frente ao biofilme misto de *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus casei*, visto que não foi encontrado na literatura estudos que correlacionam este tipo de biofilme aos cimentos endodônticos em questão. Além disso, possibilitará a análise de cimentos biocerâmicos experimentais, associados a diferentes veículos, os quais podem alterar seu comportamento. A pesquisa foi feita através do uso da microscopia confocal de varredura laser (MCVL), teste de contato direto (TCD) e determinação do tempo de presa, com a finalidade de avaliar a porcentagem de

microrganismos em seus túbulos dentinários, quantificar as unidades formadoras de colônias em contato com os cimentos frescos e determinar o tempo de presa.

Material e método

Foram testados cimentos experimentais constituídos de silicato de cálcio, sulfato de bário e óxido de zircônio com os veículos propilenoglicol, polietilenoglicol e glicerina, contendo 2,5% de cloreto de cálcio como catalisador, variando-se a condição de cimentos prontos para uso ou cimentos pó-líquido, de acordo com as proporções dos veículos (Tabela 1):

Tabela 1 – Grupos e composição química dos cimentos experimentais e comercial utilizados nos testes

Grupos	Pó	Líquido
G1 (pronto pra uso)	40% Silicato de cálcio 5% Sulfato de bário 55% Óxido de zircônio	100% Propilenoglicol
G2 (pronto pra uso)	40% Silicato de cálcio 5% Sulfato de bário 55% Óxido de zircônio	100% Polietilenoglicol
G3 (pronto pra uso)	40% Silicato de cálcio 5% Sulfato de bário 55% Óxido de zircônio	100% Glicerina
G4 (pó-líquido)	40% Silicato de cálcio 5% Sulfato de bário 55% Óxido de zircônio	50% Propilenoglicol 50% Água destilada
G5 (pó-líquido)	40% Silicato de cálcio 5% Sulfato de bário 55% Óxido de zircônio	50% Polietilenoglicol 50% Água destilada
G6 (pó-líquido)	40% Silicato de cálcio 5% Sulfato de bário 55% Óxido de zircônio	50% Glicerina 50% Água destilada
G7 - Bio C Sealer (Angelus/ Paraná – Brasil) - Controle pronto pra uso	Silicatos de cálcio, aluminato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de zircônio, óxido de ferro, dióxido de silício.	Agente dispersante.

Determinação do tempo de presa dos cimentos

Cinco anéis fundidos de gesso de Paris, com diâmetro interno de 10 mm e espessura de 2 mm, foram preparados. As bordas externas dos moldes foram fixadas com cera em placa de vidro (75 × 25 × 1 mm). Os moldes foram então preenchidos com o material e transferidos para uma câmara com 95% de umidade relativa e temperatura de 37 °C. Após 150 ± 10 s do início da mistura do cimento, uma agulha do tipo Gilmore com massa de 100 ± 0,5 g e extremidade plana de 2,0 ± 0,1 mm de diâmetro foi cuidadosamente abaixada verticalmente na superfície horizontal de cada amostra. A ponta da agulha foi limpa e a sondagem foi repetida até que as endentações deixassem de ser visíveis. Se os resultados diferissem em mais de ± 5%, o teste era repetido (8).

Ação antimicrobiana intratubular

Preparo dos espécimes

O projeto foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da instituição local – CEP/FOB-USP.

Foram utilizadas 49 raízes palatinas de primeiros molares superiores de humanos, extraídos por motivos adversos ao projeto, com ápices completamente formados. Os dentes foram conservados em solução de timol a 1%. Dentes com rizogênese incompleta, tratamento endodôntico anterior, reabsorções e fraturas radiculares foram excluídos. Todos eles foram limpos utilizando-se curetas periodontais e ultrassom Jetsonic Quatro (Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil) para a remoção de restos de tecido e cálculos dentários. As amostras receberam três banhos em cuba ultrassônica (Odontobras, Ribeirão Preto, SP, Brasil) de 10 minutos cada, com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% (Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brasil), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 17% (Biodinâmica Química e Farmacêutica, Ibiporã, PR, Brasil) seguidos de água destilada para neutralizar as substâncias anteriores.

Todos os dentes tiveram suas coroas removidas no nível da junção cimento-esmalte por meio de disco diamantado de 0,3 mm de espessura em máquina de corte Isomet (Isomet, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) a 200 rpm com objetivo de facilitar o preparo dos canais radiculares.

A fim de realizar a distribuição amostral, os espécimes de dentina foram analisados em Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico (TCFF). No intuito de fixar os elementos dentais para escaneamento tomográfico, foi confeccionada uma placa de isopor quadrangular (12x12 cm), com auxílio de um cortador de isopor elétrico. Os dentes foram inseridos no centro da placa com diâmetro correspondente ao campo de visão (Field of view - FOV) do aparelho tomográfico (6 cm). Para isso, ainda com auxílio de um cortador de isopor, pequenas depressões foram realizadas de forma a posicionar e fixar os dentes em linhas dispostas no interior do círculo correspondente ao campo de visão, com seus eixos vestibulo-lingual e méso-distal em um mesmo sentido. Na última linha foi realizada apenas uma depressão no canto inferior esquerdo, a fim de identificar a posição da placa após a aquisição das imagens.

O conjunto raízes/placa de isopor foi adaptado à mesa do tomógrafo computadorizado de feixe cônico (i-CAT® Cone Beam 3D, Imaging Sciences International, Hartfield, PA, EUA) da Clínica de Radiologia Odontológica da FOB-USP, e em seguida foi realizada a aquisição das imagens com protocolo de aquisição com voxel isométrico de 0,25 mm, tempo de exposição de 40 s, KVP de 120 kV, corrente de 36 mAs e campo de visão (Field of view - FOV) de 6 cm.

A etapa seguinte consistiu na análise das imagens obtidas com auxílio do programa RadiAnt DICOM Viewer, para avaliar a presença de rizogênese incompleta, tratamento endodôntico anterior, reabsorções e fraturas radiculares (9).

As 49 raízes palatinas dos molares superiores foram randomicamente divididos em 7 grupos (n=07) por meio do software on line (https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm). Após a divisão dos grupos foi calculado o volume do canal de todas as raízes de cada grupo utilizando o programa RadiAnt DICOM Viewer (Medixant, Poznan, Polônia) e foi realizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis.

Para instrumentação dos canais foi utilizado o motor VDW Silver (VDW GmbH, Munique, Alemanha) e a técnica de preparo utilizada foi a coroa-ápice utilizando o sistema recíprocante Reciproc (VDW GmbH, Munique, Alemanha). O comprimento de trabalho foi estabelecido pela visualização da lima tipo K nº 10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) no forame apical e subtraindo-se 1 mm. O canal foi inundado com hipoclorito de sódio a 1% e foi realizada a exploração inicial do comprimento de trabalho com a lima manual tipo K nº15 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça).

O preparo dos canais foi realizado com instrumento R25 do sistema Reciproc. Este foi utilizado com suaves movimentos de introdução e remoção de pequenas amplitudes até que se atinja os 2/3 do comprimento de trabalho. Em seguida os canais foram irrigados com 2 mL de NaOCl a 1% com auxílio de uma seringa e agulha de calibre 30 (Navitip, Ultradent Products Inc. South Jordan, UT) e foi realizada a irrigação passiva ultrassônica por 20 segundos utilizando o ultrassom Jet-Sonic Four Plus (Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil) operando no modo Endo e potência 2, munido da ponta Irrisonic (Helse, São Paulo, SP, Brasil).

Seguiu-se o preparo primeiramente à 3 mm do comprimento de trabalho e posteriormente até atingir a extensão do mesmo, sendo que a agitação ultrassônica foi realizada em cada uma das etapas. Para finalização do preparo do terço apical foi utilizado o instrumento Reciproc R40 (VDW, Munique, Alemanha). Após o término do preparo foi realizada a irrigação passiva ultrassônica do EDTA a 17% (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Ibitiporã, PR, Brasil) a 2 mm aquém do comprimento de trabalho por 20s, a qual foi repetida por 3 vezes. Ao final cada canal foi irrigado com 5 mL de solução fisiológica e secos com pontas de papel absorvente #40 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça).

Contaminação intradentinária dos espécimes

Para realizar o processo de contaminação foi seguido o protocolo proposto por Andrade et al. (2015). Os espécimes foram esterilizados dentro de microtubos com 1,5 mL de água destilada, em autoclave (Cristófoli, Campo Mourão, PR, Brasil) a 121°C por 20 minutos. Utilizando uma câmara de fluxo laminar, a água foi removida, 1000µL 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 máxima penetração do meio de cultura nos túbulos dentinários.

Para a contaminação das amostras de dentina foram utilizadas as cepas bacterianas catalogadas com número de registro da American Type Culture Collection de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e de *Lactobacillus casei* (ATCC 7469). Todos os procedimentos de contaminação foram realizados dentro de uma câmara de fluxo laminar seguindo os protocolos de biossegurança. As cepas de *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus casei* foram cultivadas em 3 mL de caldo BHI e MRS respectivamente, esterilizado e mantidas em estufa de cultura a 37°C durante 24 horas. *Lactobacillus casei*

foi inserido primeiramente para permitir seu crescimento, uma vez que esta espécie atinge o ápice de proliferação em 18h, segundo sua curva de crescimento. *Enterococcus faecalis* foi inserido um dia depois, devido seu ápice de proliferação ser mais rápido, em torno de 7 horas.

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 meio de cultura específico esterilizado foi adicionado um volume calculado do caldo com *Enterococcus faecalis* e outro com *Lactobacillus casei* para ajustar o inóculo a uma concentração de 3×10^8 UFC/mL e armazenado em estufa de cultura a 37°C, para ocorrer o crescimento exponencial dos microrganismos.

Em seguida, o meio de cultura utilizado em cada microtubo com os espécimes foi removido e 1000 µL do inóculo adicionado. Os microtubos foram levados a uma centrífuga (Eppendorf 5417R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) para a realização de uma sequência de centrifugações, em duplicata, nas velocidades 1400, 2000, 3600 e 5600 rotações por minuto (rpm), durante 5 minutos a 25°C (11). O inóculo foi renovado após cada centrifugação. Ao final das 8 centrifugações, o inóculo foi removido e 1000µL de BHI esterilizado limpo foi adicionado. Em seguida, uma única centrifugação a 3600 rpm foi realizada durante 5 minutos a temperatura de 25°C. Os microtubos foram armazenados em estufa a 37°C durante 24 horas.

No segundo dia, o meio de cultura foi removido dos microtubos e 1000µL 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 centrifugações foram realizados da mesma forma como no primeiro dia. No quarto dia o procedimento foi o mesmo que o realizado no segundo dia. No quinto dia, os cilindros de dentina estavam devidamente contaminados intratubularmente e aptos para a obturação.

Obturação

Para a obturação dos canais a quantidade e proporções dos cimentos obturadores experimentais foram determinadas por um estudo piloto. O cimento comercial foi manipulado segundo informações do fabricante, colocado sobre uma placa de vidro e pesado em uma balança de precisão AR 2140 (Ohaus Corporation, Shanghai, China) sendo que a quantidade de cimento para cada dente foi de aproximadamente 0,1012 gramas. O cimento foi misturado em uma placa de vidro, usando uma espátula de metal nº 24 até se obter uma consistência homogênea.

Para os sete grupos, o cimento obturador foi inserido a 2 mm aquém do comprimento de trabalho com auxílio de espiral de Lentulo nº 35 acionada em motor elétrico VDW Silver Reciproc (VDW GmbH, Munique, Alemanha) utilizando rotação horária contínua de 250 rpm. Para a obturação foram utilizados cones de guta-percha 40.06 (VDW GmbH, Munique, Alemanha), os quais foram inseridos envoltos em cimento e em movimento único. Após a obturação o excesso do cone foi cortado e uma leve compactação vertical realizada com condensadores de Paiva nº 3 (Golgran, São Paulo, Brasil) e os dentes foram mantidos em umidade de 95% a 37°C durante 10 dias, para a presa do cimento.

Análise em Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

Após o período de armazenamento as amostras de dentina foram seccionadas longitudinalmente no sentido vestibulo/palatino utilizando uma máquina de corte Isomet (Isomet, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) com disco diamantado de 0,3 mm de espessura a 200 rpm e com solução fisiológica esterilizada. Após o seccionamento, as secções foram imersas em EDTA a 17% (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Ibiporã, PR, Brasil) durante 5 minutos e logo após foram imersos em solução fisiológica. Foram selecionada uma hemi-parte de cada espécime e corada com 30µL LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) durante 10 minutos.

Após o referido período, os espécimes foram fixados em uma lâmina de vidro com óleo de imersão e levadas ao microscópio confocal de varredura à laser (Leica TCS-SPE, Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha). A obtenção das imagens de cada espécime foi realizada com a objetiva de 40x, com intervalo de 1µm de profundidade e resolução de imagem de 1024 x 1024 pixels. Foram obtidas imagens de quatro campos, sendo 2 próximos (próximo a luz do canal) e 2 distantes (em direção a porção externa da raiz)

utilizando o programa Leica Application Suite-Advanced Fluorescence (LAS AF, Leica Mannheim, Alemanha). As imagens foram analisadas com o programa Bioimage L v2-1 e os microrganismos vivos e mortos foram quantificados, através da fluorescência verde (SYTO 9 ®) e vermelha (iodeto de propídeo) respectivamente, emitida pelas mesmas nas imagens avaliadas. Assim foi possível quantificar espacialmente os microrganismos viáveis dentro dos túbulos dentinários em contato com a obturação endodôntica.

Teste de contato direto em placa de 24 poços

Contaminação das placas de 24 poços

Foram utilizadas as cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Lactobacillus casei* (ATCC 7469). Após o ajuste da densidade (3×10^8 UFC/mL) cada poço de uma placa de 24 poços (Corning, NY, EUA, ref. No. 3524) recebeu 100 µL de *E. faecalis* + 100 µL de *L. casei* + 1.5mL de caldo BHI (11,12). O BHI foi renovado a cada 48 h durante 7 dias. Ao longo deste intervalo de tempo, a placa foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C.

Tratamento com os grupos experimentais

Após a formação do biofilme no fundo da placa, os poços foram lavados com 1mL de água destilada esterilizada para remover as bactérias fracamente aderidas e então 1 grama de cada formulação testada (recém-espaturada, quando fosse o caso) foi colocada no fundo da placa de cultura de células de 24 poços, incluindo um grupo controle positivo que não recebeu tratamento (cimento). Os cimentos foram deixados repousar pelos períodos de tempo de 1, 24 e 48 horas em estufa bacteriológica a 37°C.

Em seguida, foi adicionado 1 mL de água destilada esterilizada em cada poço e transferido 100 µL deste conteúdo para microtubos contendo 900 µL de água destilada esterilizada. Os microtubos tiveram seu conteúdo homogeneizado por agitação em vórtex durante 1 min. Em seguida, as soluções foram diluídas em série em água destilada esterilizada até 10^{-6} . 50 µL, de cada diluição foram semeados em placas de Petri contendo o meio de cultura M-enterococcus ágar (Merck, Darmstadt, Alemanha) para determinar as contagens de *E. faecalis* e o meio Man, Rogosa e Sharpe (MRS) ágar (Merck, Darmstadt, Alemanha) para determinar as contagens de *L. casei*. As placas foram incubadas em condições aeróbicas a 37°C por 48 horas para subsequente contagem das unidades formadoras de colônia/mL.

Resultados

Determinação do tempo de presa dos cimentos

A tabela 2 resume os tempos de presa inicial e final dos cimentos experimentais, de acordo com o veículo utilizado, além do controle. O Bio-C Sealer apresentou tempo de presa inferior aos demais cimentos testados ($p < 0,05$), dentro do especificado pela ANSI/ADA (2000). Com relação ao veículo empregado, a associação do propilenoglicol com água destilada na proporção de 1:1, foi responsável por acelerar a presa em comparação as demais formulações.

Tabela 2 – Tempo de presa em horas (h) dos cimentos experimentais e comercial.

Tempo de presa (horas)	G 1 Propileno glicol	G 2 Polietileno glicol	G 3 Glicerina	G 4 Propileno glicol/água destilada	G 5 Polietileno glicol/água destilada	G 6 Glicerina/água destilada	G 7 Bio C-Sealer
Inicial	72	48	48	48	216	72	4
Final	240	216	216	120	288	240	4

Teste de contato direto em placa de 24 poços

De forma geral, *L. casei* demonstrou maior suscetibilidade aos cimentos testados do que *E. faecalis*. No período de 1h, o polietilenoglicol favoreceu atividade antimicrobiana na forma pronto para uso. Tanto em 24h quanto em 48h o propilenoglicol nas duas formas de uso dos cimentos seguido do cimento Bio-C Sealer foram responsáveis pela maior redução microbiana para ambas espécies (Figuras 1 e 2).

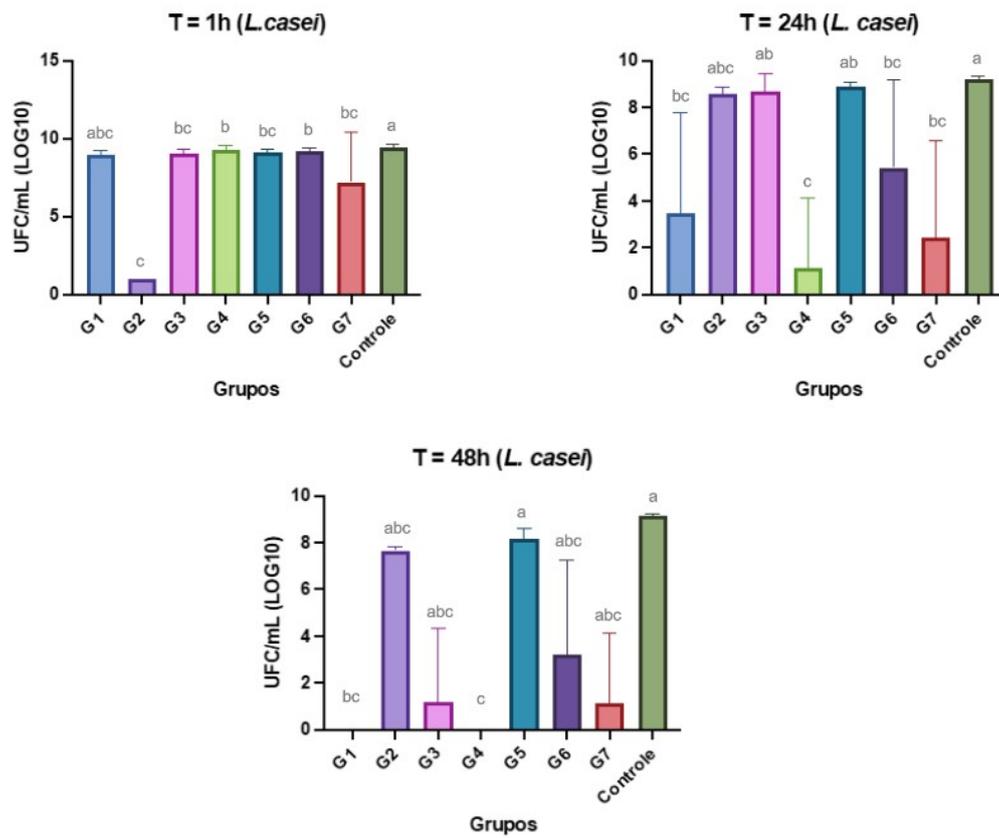


Figura 1. Representação gráfica da mediana e viabilidade bacteriana após 1, 24 e 48 horas para *L. casei*.

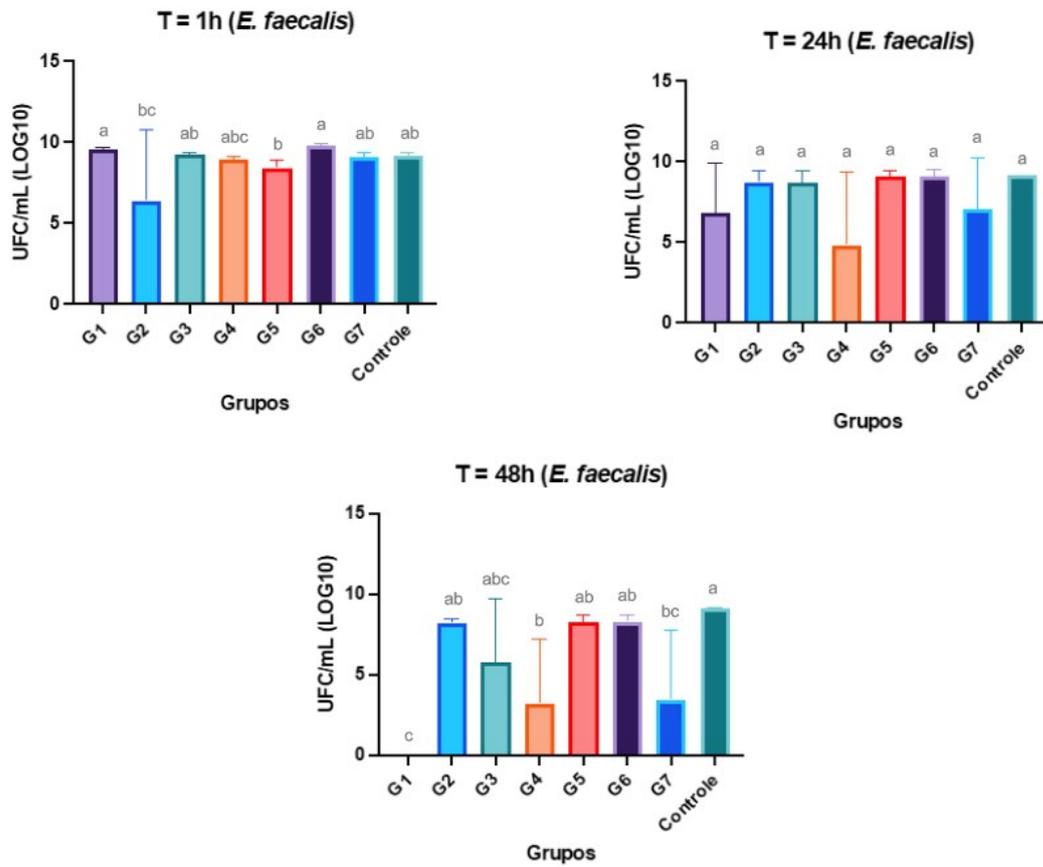
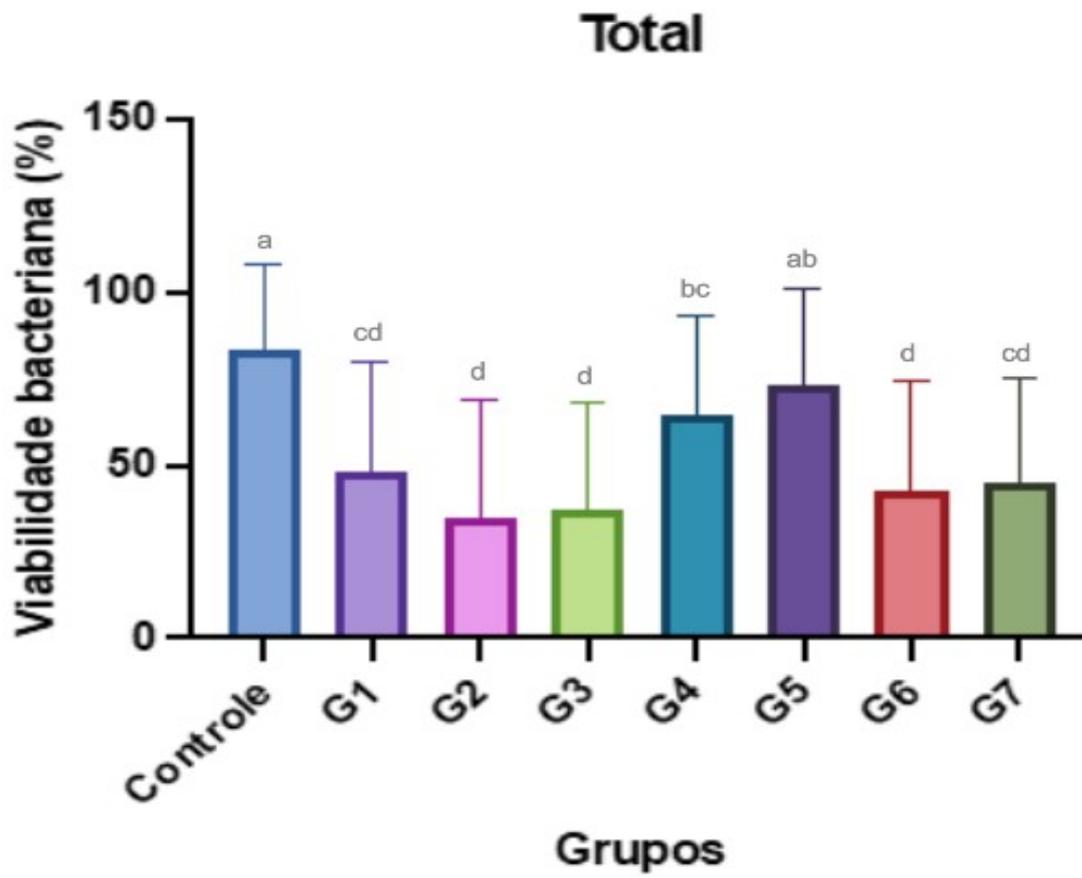


Figura 2. Representação gráfica da mediana e viabilidade bacteriana após 1, 24 e 48 horas para *E. faecalis*.

Viabilidade bacteriana em microscopia confocal de varredura laser

Para a viabilidade total, todas as formulações testadas, exceto a contendo polietilenoglicol associado à água, reduziram significativamente a porcentagem de bactérias viáveis em comparação ao grupo que não passou por nenhum tratamento (controle negativo) ($p < 0.05$). O melhor desempenho antimicrobiano intratubular foi observado nos grupos que continham polietilenoglicol, seguido de glicerina, glicerina associada a água, propilenoglicol e o comercial Bio-C sealer (Angelus/Paraná-Brasil), variando de 76,83% a 54,06%. Na análise por terços, todos os cimentos foram capazes de diminuir a viabilidade bacteriana (variando de 90,36% a 59,17%) quando comparados ao controle negativo, tanto no terço cervical quanto no apical, exceto o propilenoglicol e polietilenoglicol associados à água. O mesmo foi observado nas regiões superficial e profunda.



B

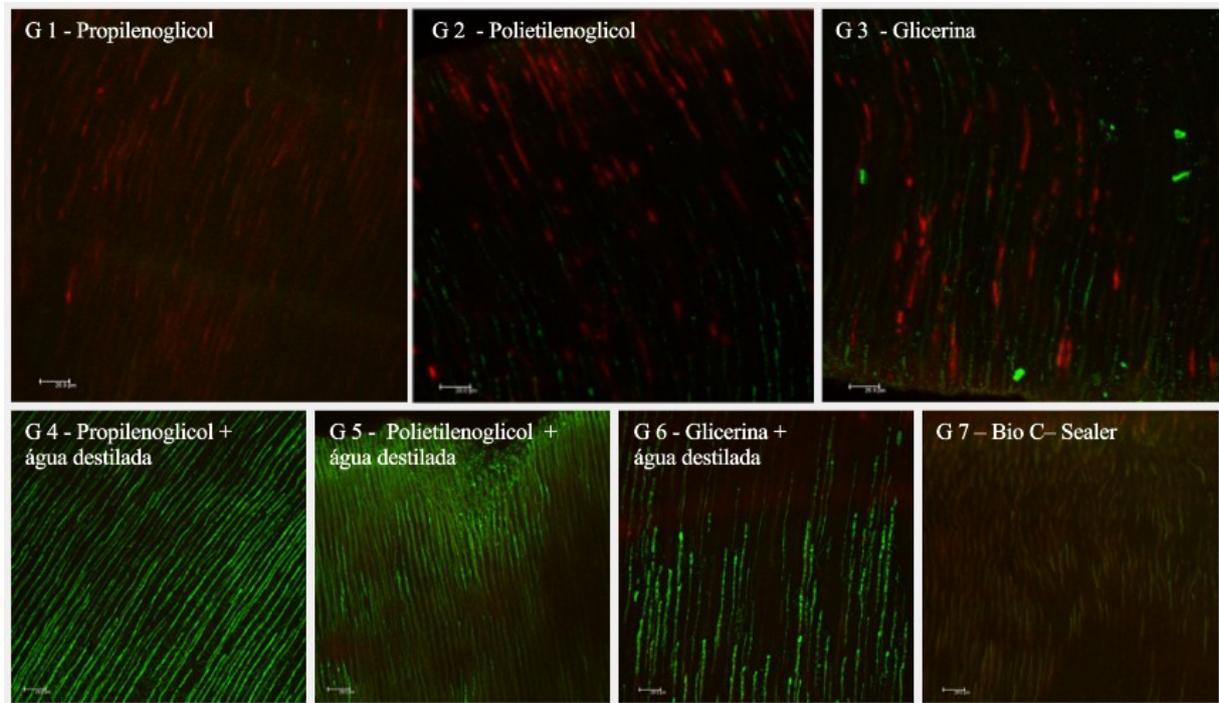


Figura 3. A) Representação gráfica da mediana e viabilidade bacteriana após 10 dias de contato com os cimentos. B) Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de amostras representativas mostraram células bacterianas viáveis (verde) e mortas (vermelhas).

Discussão

A prática endodôntica contemporânea tem acesso a materiais bioativos, com propriedades capazes de estimular o selamento biológico em perfurações radiculares, retrobturações, capeamento pulpar, pulpotomia, apicificações, procedimentos endodônticos regenerativos, além de outras situações clínicas (14, 15, 16).

O presente trabalho teve como principal objetivo desenvolver um novo material com propriedades antimicrobianas, já que os cimentos disponíveis no mercado são caracterizados em sua maioria pela discreta ação frente a microrganismos (17,18).

O sucesso do tratamento endodôntico depende da redução ou eliminação da infecção intrarradicular (1), em que o preparo químico-mecânico é responsável pela maior eliminação bacteriana, juntamente com a aplicação de medicação intracanal, porém microrganismos no interior dos canais radiculares e nos túbulos dentinários ainda podem estar viáveis no momento da obturação, logo as propriedades antibacterianas dos cimentos obturadores podem agregar benefícios ao eliminar bactérias persistentes nos túbulos dentinários (2, 3).

Cimentos a base de silicato de cálcio possuem intensa atividade antimicrobiana antes da presa final, sendo ela discreta ou inexistente após a presa. Esses cimentos são uma mistura pó/líquido, em que o pó contém os principais constituintes do material e o líquido é o veículo para dissolução do constituinte (4). Glicerina, propilenoglicol e polietilenoglicol têm sido usados na Endodontia como veículos devido as suas adequadas propriedades biológicas, físico-químicas e antimicrobianas (4,6). Dissociação iônica, viscosidade, tempo de presa e resposta tecidual podem depender do veículo utilizado (7).

A partir da hidratação do silicato de cálcio, devido ao seu contato com água ou fluido de tecidos vivos ocorre a formação do hidróxido de cálcio e com sua dissociação há liberação de íons cálcio e hidroxila, o que proporciona um ambiente alcalino propício a formação de tecido mineralizado e desfavorável ao crescimento bacteriano, resultando na atividade antibacteriana desse material. Essa alteração do pH é lenta e depende de vários fatores (19).

O Bio-C Sealer apresentou tempo de presa inferior aos demais cimentos testados ($p < 0,05$), dentro do especificado pela ANSI/ADA (2000). Com relação ao veículo

empregado, a associação do propilenoglicol com água destilada na proporção de 1:1, foi responsável por acelerar a presa em comparação as demais formulações (4).

No presente estudo, foram utilizadas as metodologias de teste de contato direto (TCD) e fluorescência em microscopia confocal. Os dados do TCD, estão relacionados ao efeito bactericida e não bacteriostático das formulações. Isso é importante, pois as bactérias podem voltar a apresentar atividade após a redução do efeito bacteriostático dos cimentos (5). Em relação às bactérias, embora tenham sido cultivadas juntas em biofilme, a sua contagem foi separada, em meios seletivos. Dessa maneira foi possível evidenciar que *L. casei* foi mais sensível que *E. faecalis*, gerando menos colônias após o desafio antimicrobiano, o que corrobora estudos anteriores que mostram maior resistência de *E. faecalis* (20).

Na primeira uma hora de contato com os cimentos, para ambas as bactérias, o cimento veiculado em polietilenoglicol (grupo 1) promoveu menor proliferação bacteriana. Já nas 24 e 48 horas de contato biofilme-cimentos, para ambas as bactérias, os grupos que mais inibiram essa proliferação foram G1(cimento pronto para uso com propilenoglicol), G4 (cimento manipulado com propilenoglicol e água destilada) e G7 (cimento comercial), sendo estatisticamente diferentes dos demais grupos. Entre G1, G4 e G7, G4 promoveu os menores valores de unidades formadoras de colônias.

Desde 1965 o propilenoglicol é relatado como um antimicrobiano com marcada atividade germicida (21), assim como o polietilenoglicol, pois ambos têm sua capacidade bactericida já elucidada na literatura (22,23). No TCD, o cimento com propilenoglicol apresentou-se efetivo tanto na redução de *E. faecalis*, quanto de *L. casei*. Nalawade et al (2015) avaliando a efetividade de alguns veículos, incluindo o propilenoglicol, contra diferentes microrganismos em teste de contato direto, demonstraram que os mesmos não foram capazes de diminuir a viabilidade de *E. faecalis* (25,26). Contrariamente, no presente estudo, apesar da capacidade antibacteriana dos veículos empregados, a formulação por si só influenciou os resultados positivos encontrados.

Também Pereira et al. (2017) não detectaram efetividade antimicrobiana intratubular quando testaram somente o veículo propilenoglicol como controle. Provavelmente, o efeito antimicrobiano desses veículos seja dificultado pelo acesso mais difícil às bactérias escondidas dentro dos túbulos dentinários.

De acordo com a análise de MCVL, todas as associações testadas foram capazes de reduzir o número de bactérias viáveis quando comparado ao controle negativo, o que sugere a capacidade antimicrobiana da formulação nas concentrações testadas. De todos os veículos utilizados a glicerina foi relatada na literatura como capaz de exercer pouca atividade antimicrobiana (27, 4) enquanto a água destilada não possui atividade. Nessa associação (glicerina + água), a formulação testada foi capaz de reduzir o número de bactérias vivas em microscopia confocal mais efetivamente que o grupo controle, devendo este efeito ser atribuído à liberação de hidroxila dos cimentos ao invés de efeito produzido pelos veículos.

Ademais, pode se observar que em microscopia confocal, todos os grupos (especialmente G4 e G5) que estavam associados a água destilada apresentaram um menor desempenho quando comparado ao teste de contato direto (Figura 3A). Acreditamos que isso ocorreu porque a água apresenta alta tensão superficial, resultando em uma menor penetrabilidade nos túbulos dentinários, quando comparada aos veículos propilenoglicol, polietilenoglicol e glicerina (28). A tensão superficial da água é mais alta (72,8mN/m), seguida pela glicerina (63,1 mN/m) e depois polietilenoglicol e propilenoglicol (52,5 e 36,0 mN/m respectivamente), o que pode explicar os melhores resultados desses dois últimos veículos tanto no TCD quanto na descontaminação intratubular (29,30,31)

As bactérias encontradas na superfície são facilmente removidas com o preparo biomecânico. Contudo, as que conseguem se alojar no interior dos túbulos podem sobreviver a tais procedimentos podendo causar o insucesso (33).

E. faecalis é a bactéria mais prevalente envolvendo falhas do tratamento endodôntico. Uma das razões é sua habilidade de penetração profunda em túbulos dentinários (300 μm) e a capacidade tampão da dentina que preserva os microrganismos das alterações de pH (34).

Além do veículo empregado, o tamanho e forma das partículas que constituem os cimentos testados, podem controlar essa penetração. O silicato de cálcio apresenta partículas nanométricas, inferiores a 10 μm , o que favorece suas propriedades físico-químicas, assim como uma melhor difusão nos túbulos (35).

Os novos materiais desenvolvidos, especialmente cimentos de silicato de cálcio, devem passar por testes laboratoriais e clínicos para verificar se os componentes atendem também as propriedades físico-químicas, em especial a solubilidade. Estudos

mostram que esse tipo de cimento pode apresentar solubilidade acima do recomendado, o que pode comprometer a qualidade do selamento a longo prazo (12). Portanto, mais investigações são necessárias para elucidar melhor as propriedades dos cimentos de silicato de cálcio e em qual situação clínica devem ser empregados.

Agradecimentos

Este estudo foi parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Os autores negam qualquer conflito de interesse.

Referências

- 1 SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **J Endod.**, v. 34, N. 11, p. 1291-1301, Nov. 2008.
- 2 ALCALDE, M. P.; BRAMANTE, C. M.; VIVAN, R. R.; AMORSO-SILVA, P. A.; ANDRADE, F. B.; DUARTE, M. A. H. Intradental antimicrobial action and filling quality promoted by ultrasonic agitation of epoxy resin-based sealer in endodontic obturation. **J Appl Oral Sci**, v. 25, p. 641-649, 2017.
- 3 BOSAIID, F.; AKSEL, H.; AZIM, A. A. Influence of acidic pH on antimicrobial activity of different calcium silicate based–endodontic sealers. **Clin Oral Investig**, v. 26, n. 8, p. 5369-5376, 2022.
- 4 DE AZEVEDO QUEIROZ, I. O.; MACHADO, T. ALVES, C. C.; BRITO, V. G. B.; VASCONCELOS, B. C.; GOMES-FILHO, J. E. et al. Biological and antimicrobial properties of the association Ambroxol and a water-soluble viscous liquid as a vehicle for a tricalcium silicate-based sealer. **J. Mater**, v. 32, p. 1-8, 2021.
- 5 MILANI, A. S.; MOEINIAN, A.; BARHAGHI, M. H. S.; ABDOLLAHI, A. Evaluation of the film thickness and antibacterial property of mineral trioxide aggregate mixed with propylene glycol as a root canal sealer. **Dent Res J**, v. 17, n. 2, p. 142, 2020.
- 6 MARCIANO, M. A.; GUIMARÃES, B. M.; AMOROSO-SILVA, P.; CAMILLERI, J.; DUARTE, M. A. H. Physical and chemical properties and subcutaneous implantation of mineral trioxide aggregate mixed with propylene glycol. **J Endod.**, v. 42, n. 3, p. 474-479, 2016
- 7 SAFAVI, K.; NAKAYAMA, T. A. Influence of mixing vehicle on dissociation of calcium hydroxide in solution. **J Endod.**, v. 26, n. 11, p. 649-651, 2000.
- 8 FLORES, D. S.; RACHED, F.J. JR.; VERSIANI, M. A.; GUEDES, D. F.; SOUSANETO, M. D.; PÉCORÁ, J. D. Evaluation of physicochemical properties of four root canal sealers. **Int Endod J**. v. 44, n. 2, p. 126-135, 2011.
- 9 LOUZADA, V. G. Influência de diferentes potências ultrassônicas associadas ou não à solução antimicrobiana em biofilme de *Enterococcus faecalis*. 2022. Dissertação (Mestrado em Odontologia) UNAERP – Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2022.
- 10 ANDRADE, F. B.; ARIAS, M. P.; MALIZA, A. G.; DUARTE, M. A.; GRAEFF, M. S.; AMOROSO-SILVA, P. A. et al. A new improved protocol for in vitro intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization

- and validation by confocal laser scanning microscopy. **J Appl Oral Sci.**, v. 23, n. 6, p. 591-598, Nov-Dec. 2015.
- 11 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.**, v. 37, n. 10, p. 1380-5, Oct. 2011.
- 12 ZORDAN-BRONZEL, C. L.; TORRES, F. F. E.; TANOMARU-FILHO, M.; CHÁVEZ-ANDRADE, G. M. ; BOSSO-MARTELO, R.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M. Evaluation of physicochemical properties of a new calcium silicate–based sealer, Bio-C Sealer. **J Endod.**, v. 45, n. 10, p. 1248-1252, 2019.
- 13 GOMES, B. P.; FERRAZ, C. C.; VIANNA, M. E.; BERBER, V. B.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **Int Endod J**, v. 34, n. 6, p. 424-428, 2001.
- 14 CAMPS, J.; JEANNEAU, C.; EL AYACHI, I.; LAURENT, P. About I. Bioactivity of a Calcium Silicate-based Endodontic Cement (BioRoot RCS): Interactions with Human Periodontal Ligament Cells In Vitro. **J Endod.**, v. 41, n. 9, p. 1469–1473, Sep. 2015.
- 15 ALSUBAIT, S. A. Combined surgical and nonsurgical endodontic therapy for the retreatment of a root canal with a broken round bur in the apical third: A case report with a 4-year follow-up. **Saudi Endod J.**, v. 11, n. 1, p. 111 – 115, Jul. 2020.
- 16 ZAFAR, K.; JAMAL, S.; GHAFOR, R. Bio-active cements-Mineral Trioxide Aggregate based calcium silicate materials: a narrative review. **J Pak Med Assoc.**, v. 70, n. 3, p. 497 – 504, Mar. 2020.
- 17 CAVENAGO, B. C. DEL CARPIO-PEROCHENA, A. E.; ORDINOLA-ZAPATA, R.; ESTRELA, C.; GARLET, G. P.; TANOMARU-FILHO, M. et al. Effect of using different vehicles on the physicochemical, antimicrobial, and biological properties of white mineral trioxide aggregate. **J Endod**, v. 43, n. 5, p. 779-786, 2017.
- 18 HOLT, D. M.; WATTS, J. D.; BEESON, T. J.; KIRKPATRICK, T. C.; RUTLEDGE, R. E. 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.**, v. 33, n. 7, p. 844-847, 2007.
- 19 ESTRELA, C.; CINTRA, L. T. A.; DUARTE, M. A. H, ROSSI-FEDELE G.; GAVINI G.; SOUSA-NETO M. D. Mechanism of action of Bioactive Endodontic Materials. **Braz. Dent. J**, v. 34, p. 1-11, 2023.

- 20 GAO, Y.; JIANG, X.; LIN, D.; CHEN, Y.;, TONG, Z. The starvation resistance and biofilm formation of *Enterococcus faecalis* in coexistence with *Candida albicans*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus*, or *Lactobacillus acidophilus*. **J endod**, v. 42, n. 8, p. 1233-1238, 2016.
- 21 OLITZKY, I. Antimicrobial properties of a propylene glycol based topical therapeutic agent. **J. Pharm. Sci**, v. 54, n. 5, p. 787-788, 1965.
- 22 MOGHBEL, A.; FARJZADEH, A.; AGHEL, N.; AGHELI, H.; RAISI, N. Evaluation of the effect of green tea extract on mouth bacterial activity in the presence of propylene glycol. **Jundishapur J Nat Pharm Prod**, v. 7, n. 2, p. 56, 2012.
- 23 CHIRIFE, J.; HERSZAGE, L.; JOSEPH, A.; BOZZINI, J. P.; LEARDINI, N.; KOHN, E. S. In vitro antibacterial activity of concentrated polyethylene glycol 400 solutions. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 24, n. 3, p. 409-412, 1983.
- 24 NALAWADE, T. M.; BHAT, K.; SOGI, H. P. S. Bactericidal activity of propylene glycol, glycerine, polyethylene glycol 400, and polyethylene glycol 1000 against selected microorganisms. **J Int Soc Prev Community Dent** v. 5, n. 2, p. 114, 2015.
- 25 KINNUNEN, T.; KOSKELA, M. Antibacterial and antifungal properties of propylene glycol, hexylene glycol, and 1, 3-butylene glycol in vitro. **Acta Derm. Venereol**, v. 71, n. 2, p. 148-150, 1991
- 26 BOZZINI, J. P.; KOHN, E.S.; JOSEPH, A.; HERSZAGE, L.; CHIRIFE, J. Submicroscopical changes in *Klebsiella pneumoniae* cells treated with concentrated sucrose and polyethylene glycol 400 solutions. **J. appl. bacteriol**, v. 60, n. 5, p. 375-379, 1986.
- 27 GANGWAR, A. Antimicrobial effectiveness of different preparations of calcium hydroxide. **Indian J Dent Res**. v. 22, n. 1, p. 66, 2011
- 28 CRUZ, E. V.; KOTA, K.; HUQUE, J.; IWAKU, M.; HOSHINO, E. Penetration of propylene glycol into dentine. **Int Endod J**, v. 35, n. 4, p. 330-336, 2002.
- 29 DENKER, J. N.; HERBSTTRITT, F.; HECK, J.; GRÜNEWALD, M.; & BIESSEY, P. Gas-liquid flow patterns in a rectangular milli-structured channel with static mixing elements. **Chem Eng & Technol**, v. 45, n. 4, p. 762-767, 2022.
- 30 RUJESCU, C.; NEGREA, I.; TUCHILĂ, C.; JIANU, C.; & JIANU, I. Structure correlations – colloidal properties among some “homogenous” polyethylene glycols (n = 3-18) derivated with aroma radicals as possible additivition systems. **J Agroalimnt** v. 6, n. 2, p. 443-450, 2005.

- 31 TAKAMURA, K.; FISCHER, H.; & MORROW, N. R. Physical properties of aqueous glycerol solutions. **J Pet Sci Eng**, v. 98, p. 50-60, 2012.
- 32 PEREIRA, T. C.; VASCONCELOS, L. R.; GRAEFF, M. S.; DUARTE, M. A.; BRAMANTE, C. M.; ANDRADE, F. B. Intratubular disinfection with tri-antibiotic and calcium hydroxide pastes. **Acta Odontol Scand**, v. 75, n. 2, p. 87-93, 2017.
- 33 SOUZA, G. L.; MAGALHÃES, T. E. A.; FREITAS, G. A. N.; LEMUS, N. X. A.; BARBOSA, G. L. R.; SILVA, A. C. A. et al. Calcium-doped zinc oxide nanocrystals as an innovative intracanal medicament: a pilot study. **RDE** , v. 47, 2022.
- 34 ZAND, V.; MOKHTARI, H.; HASANI, A.; JABBARI, G. Comparison of the penetration depth of conventional and nano-particle calcium hydroxide into dentinal tubules. **Iran Endod J.**, v. 12, n. 3, p. 366, 2017
- 35 CHANG, S. W.; GAUDIN, A.; TOLAR, M.; OH, S.; MOON, S. Y.; PETERS, O. A. Physicochemical and biological properties of four calcium silicate-based endodontic cements. **J Dent Sci**, v. 17, n. 4, p. 1586-1594, 2022.

3. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- ALCALDE, M. P.; VIVAN, R. R.; MARCIANO, M. A.; DUQUE, J. A.; FERNANDES, S. L.; ROSSETO, M. B. et al. Effect of ultrasonic agitation on push-out bond strength and adaptation of root-end filling materials. **Restor. Dent. Endod.**, v. 43, n. 2, 2018.
- ALSUBAIT, S.; ALBADER, S.; ALAJLAN, N.; ALKHUNAINI, N.; NIAZY, A.; ALMAHDY, A. Comparison of the antibacterial activity of calcium silicate-and epoxy resin-based endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms: a confocal laser-scanning microscopy analysis. **Odontology**, v. 107, p. 513-520, 2020.
- ANTUNES, T. B. M. JANINI, A. C. P.; PELEPENKO, L. E.; ABUNA, G. F.; PAIVA, E. M.; SINHORETI, M. A. C. et al. Heating stability, physical and chemical analysis of calcium silicate-based endodontic sealers. **Int Endod J.**, v. 54, n. 7, p. 1175-1188, 2021.
- BARBOSA, V. M.; PITONDO-SILVA, A.; OLIVEIRA-SILVA, M. MARTORANO, A. S.; RIZZI-MAIA, C. C.; SILVA-SOUSA, Y. T. C. et al. Antibacterial activity of a new ready-to-use calcium silicate-based sealer. **Braz. Dent. J.**, v. 31, p. 611-616, 2020.
- BAUMGARTNER, J. C.; FALKLER, W. A. JR. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. **J Endod.**, v. 17, n. 8, p. 380-383, 1991.
- CAMPS, J.; JEANNEAU, C.; EL AYACHI, I.; LAURENT, P.; ABOUT, I. Bioactivity of a calcium silicate-based endodontic cement (BioRoot RCS): interactions with human periodontal ligament cells in vitro. **J Endod.**, v. 41, n. 9, p. 1469-1473, 2015.
- CHEUNG, G. S. P.; STOCK, C. J. R. In vitro cleaning ability of root canal irrigants with and without endosonics. **Int Endod J.**, v. 26, n. 6, p. 334-343, 1993.
- CINTRA, L. T. A.; BENETTI, F.; DE AZEVEDO QUEIROZ, Í. O.; FERREIRA, L. L.; MASSUNARI, L.; BUENO, C. R. E. et al. Evaluation of the cytotoxicity and biocompatibility of new resin epoxy-based endodontic sealer containing calcium hydroxide. **J Endod.**, v. 43, n. 12, p. 2088-2092, 2017.
- DUARTE, M. A. H.; MARCIANO, M. A.; VIVAN, R. R.; TANOMARU, FILHO, M.; TANOMARU, J. M. G.; CAMILLERI, J.. Tricalcium silicate-based cements: properties and modifications. **Braz. Oral Res.**, v. 32, 2018.

EGAN, M. W.; SPRATT, D. A.; NG, Y. L.; LAM, J. M.; MOLES, D. R.; GULABIVALA, K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. **Int Endod J.**, v. 35, n. 4, p. 321-329, 2002.

FERREIRA, F. B. A.; TORRES, S. A.; ROSA, O. P.; FERREIRA, C. M.; GARCIA, R. B.; MARCUCCI, M. C. et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** , v. 104, n. 5, p. 709-716, 2007.

GIACOMINO, C. M.; WEALLEANS, J. A.; KUHN, N.; DIOGENES, A. Comparative biocompatibility and osteogenic potential of two bioceramic sealers. **J Endod.**, v. 45, n. 1, p. 51-56, 2019.

ISO 4287:1997. Geometrical Product Specifications (GPS) — Surface texture: Profile method — Terms, definitions and surface texture parameters. 1997.

LANA, M. A.; RIBEIRO-SOBRINHO, A. P.; STEHLING, R. GARCIA, G. D.; SILVA, B. K.; HAMDAN, J. S. et al. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. **Oral microbiol**, v. 16, n. 2, p. 100-105, 2001.

NAKATA, T. T.; BAE, K. S.; BAUMGARTNER, J. C. Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using an anaerobic bacterial leakage model. **J Endod.**, v. 24, n. 3, p. 184-186, 1998.

PINHEIRO, E. T.; GOMES, B. P.; FERRAZ, C. C.; SOUSA, E. L.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Int Endod J.**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2003.

PRADA, I.; MICÓ-MUÑOZ, P.; GINER-LLUESMA, T.; MICÓ-MARTÍNEZ, P.; COLLADO-CASTELLANO, N.; MANZANO-SAIZ, A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**, v. 24, n. 3, p. e364, 2019.

PRIMUS, C. M.; TAY, F. R.; NIU, L. N. Bioactive tri/dicalcium silicate cements for treatment of pulpal and periapical tissues. **Acta biomater**, v. 96, p. 35-54, 2019.

ROBERTS, H. W.; TOTH, J. M.; BERZINS, D. W.; CHARLTON, D. G. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. **Dent mater**, v. 24, n. 2, p. 149-164, 2008.

SANZ, J. L.; LÓPEZ-GARCÍA, S.; LOZANO, A.; PECCI-LLORET, M. P.; LLENA, C.; GUERRERO-GIRONÉS, J. et al. Microstructural composition, ion release, and bioactive potential of new premixed calcium silicate–based endodontic sealers indicated for warm vertical compaction technique. **Clin Oral Investig**, v. 25, p. 1451-1462, 2021.

SEN, B. H.; SAFAVI, K. E.; SPÅNGBERG, L. S. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 84, n. 1, p. 68-73, 1997.

ALVES SILVA, E. C.; TANOMARU-FILHO, M.; DA SILVA, G. F.; DELFINO, M. M.; CERRI, P. S.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M. Biocompatibility and bioactive potential of new calcium silicate–based endodontic sealers: Bio-C Sealer and Sealer Plus BC. **J Endod.**, v. 46, n. 10, p. 1470-1477, 2020.

SINGH, G.; ELSHAMY, F. M.; HOMEIDA, H. E.; BOREAK, N.; GUPTA, I. An in vitro Comparison of Antimicrobial Activity of Three Endodontic Sealers with Different Composition. **J. Contemp. Dent. Pract.**, v. 17, n. 7, p. 553-556, 2016.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **J Endod.**, v. 34, n. 11, p. 1291-1301. e3, 2008.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N.. Polymerase chain reaction–based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 97, n. 1, p. 85-94, 2004.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N.; VALOIS, C. R.. Apical sealing ability of five endodontic sealers. **Aust Endod J.**, v. 27, n. 1, p. 33-35, 2001.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F. RÔÇAS, I. D. N.; MARCELIANO-ALVES, M. F.; PÉREZ, A. R.; RICUCCI, D. Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. **Braz. Oral Res.**, v. 32, p. e65, 2018.

SMILINE, G. A.; PANDI, S. K.; HARIPRASAD, P.; RAGURAMAN, R. A preliminary study on the screening of emerging drug resistance among the caries pathogens isolated from carious dentine. **Indian J Dent Res**, v. 23, n. 1, p. 26, 2012.

SUZUKI, K.; NAOYA, H.; NAOKI, H.; TORU, M.; HIROSHI, M. Antimicrobial effect of calcium hydroxide on bacteria isolated from infected root canals. **Dentistry in Japan**, v. 35, p. 43-47, 1999.

Tavares, K. I. M. C.; Pinto, J. C.; Santos-Junior, A. O.; Torres, F. F. E.; Guerreiro-Tanomaru, J. M.; Tanomaru-Filho., M. Micro-CT evaluation of filling of flattened root canals using a new premixed ready-to-use calcium silicate sealer by single-cone technique. **MRT.**, v. 84, n. 5, p. 976-981, 2021.

TORABINEJAD, M.; HONG, C. U.; MCDONALD, F.; PITT FORD, T. R. L. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **J Endod.**, v. 21, n. 7, p. 349-353, 1995.

TORABINEJAD, M.; RASTEGAR, A. F.; KETTERING, J. D.; PITT FORD, T. R. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. **J Endod.**, v. 21, n. 3, p. 109-112, 1995.

TSATSAS, D.V.; MELIOU, H.A.; KEREZOU DIS, N. P. Sealing effectiveness of materials used in furcation perforation in vitro. **Int Dent J.**, v. 55, n. 3, p. 133-41, Jun. 2005.

VASUDEVA, A.; SINHA, D. J.; TYAGI, S. P.; SINGH, N. N.; GARG, P.; UPADHYAY, D. Disinfection of dentinal tubules with 2% Chlorhexidine gel, Calcium hydroxide and herbal intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*: An in-vitro study. **Singap.**, v. 38, p. 39-44, Dec .2017

VERA, J.; SIQUEIRA, J. F. JR.; RICUCCI, D.; LOGHIN, S.; FERNÁNDEZ. N.; FLORES, B. et al. One-versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. **J Endod.**, v. 38, n. 8, p. 1040-1052, 2012.

ZAFAR, K.; JAMAL, S.; GHAFOR, R. Bio-active cements-Mineral Trioxide Aggregate based calcium silicate materials: a narrative review. **J Pak Med Assoc.**, v.70, n. 3, p. 497 – 504, Mar. 2020.Z

ZANCAN, R.F.; VIVAN, R. R.; LOPES, M. R. M.; WECKWERTH, P. H.; ANDRADE, F. B.; PONCE, J. B. et al. Antimicrobial activity and physicochemical properties of calciumhydroxide pastes used as intracanal medication. **J Endod.**, v. 42, n. 12, p. 1822-1828, Dec. 2016.

ZORDAN-BRONZEL, C. L.; ESTEVES TORRES, F. F.; TANOMARU-FILHO, M.; CHÁVEZ-ANDRADE, G. M.; BOSSO-MARTELO, R.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M.

Evaluation of physicochemical properties of a new calcium silicate–based sealer, Bio-C Sealer. **J Endod.**, v. 45, n. 10, p. 1248-1252, 2019.

APÊNDICES

Tabela 3 - Porcentagem mediana (intervalo de confiança de 95%) de bactérias viáveis nos túbulos dentinários.

Grupos	Total Me (Min-Máx)	Superficial Me (Min-Máx)	Profundo Me (Min-Máx)
Controle	96.52 (10.99 - 99.95) ^a	91.87 (10.99 - 99.95)	97.74 (29.59 - 99.87)
G1	39.21 (2.17 - 99.79) ^{cd}	38.92 (0.58 - 99.22)	33.55 (0.21 - 99.79)
G2	23.17 (0.00 - 99.68) ^d	31.35 (0.06 - 94.97)	15.61 (0.00 - 99.68)
G3	30.26 (0.83 - 97.01) ^d	27.36 (1.21 - 85.97)	36.02 (0.83 - 97.01)
G4	71.89 (1.16 - 99.81) ^{bc}	61.57 (1.16 - 95.41)	84.66 (15.35 - 99.81)
G5	87.98 (3.62 - 100.0) ^{ab}	79.29 (18.55 - 100.0)	91.18 (3.62 - 99.99)
G6	38.50 (0.47 - 99.54) ^d	37.32 (0.47 - 95.26)	40.09 (4.24 - 99.54)
G7	45.94 (0.17 - 99.89) ^{cd}	25.53 (0.17 - 99.89)	50.50 (1.53 - 97.67)

Tabela 4 - Mediana (Me), mínimo e máxima (Min-Max) de UFC/mL e redução percentual de *L. casei* (%) para cada grupo experimental.

<i>L. casei</i>	1 h	24 h	48 h
	(Log ₁₀ UFC/mL)	(Log ₁₀ UFC/mL)	(Log ₁₀ UFC/mL)
Grupos	Me (Min-Máx)	Me (Min-Máx)	Me (Min-Máx)
Controle	9.42 (9.12 - 9.67) ^a	9.12 (9.05 - 9.38) ^a	9.12 (9.07 - 9.30) ^a
G1	9.03 (8.30 - 9.27) ^{abc}	0.00 (0.00 - 8.27) ^{bc}	0.00 (0.00 - 0.00) ^{bc}
G2	0.95 (0.91 - 0.96) ^c	8.72 (8.12 - 8.82) ^{abc}	7.72 (7.42 - 7.82) ^{abc}
G3	9.07 (8.67 - 9.42) ^{bc}	8.90 (7.12 - 9.42) ^{ab}	0.00 (0.00 - 8.27) ^{abc}
G4	9.29 (8.96 - 9.75) ^b	0.00 (0.00 - 7.90) ^c	0.00 (0.00 - 0.00) ^c
G5	9.16 (8.90 - 9.42) ^{bc}	8.90 (8.57 - 9.05) ^{ab}	8.27 (7.42 - 8.55) ^a
G6	9.06 (9.03 - 9.58) ^b	7.12 (0.00 - 8.38) ^{bc}	0.00 (0.00 - 7.97) ^{abc}
G7	8.14 (0.00 - 9.41) ^{bc}	0.00 (0.00 - 8.68) ^{bc}	0.00 (0.00 - 7.90) ^{abc}

Tabela 5 - Mediana (Me), mínimo e máxima (Min-Max) de UFC/mL e redução percentual de *E. faecalis* (%) para cada grupo experimental

<i>E. faecalis</i>	1 h	24 h	48 h
	(Log ₁₀ UFC/mL)	(Log ₁₀ UFC/mL)	(Log ₁₀ UFC/mL)
Grupos	Me (Min-Máx)	Me (Min-Máx)	Me (Min-Máx)
Controle	9.12 (9.12 - 9.60) ^{ab}	9.127 (9.12 - 9.17) ^a	9.12 (9.10 - 9.12) ^a
G1	9.52 (9.38 - 9.72) ^a	7.42 (0.00 - 9.12) ^a	0.00 (0.00 - 0.00) ^c
G2	8.94 (0.00 - 9.20) ^{bc}	8.97 (7.12 - 9.12) ^a	8.20 (7.90 - 8.55) ^{ab}
G3	9.20 (9.08 - 9.42) ^{ab}	8.90 (7.12 - 9.42) ^a	7.90 (0.00 - 8.55) ^{abc}
G4	8.90 (8.60 - 9.20) ^{abc}	7.60 (0.00 - 9.29) ^a	0.00 (0.00 - 7.90) ^b
G5	8.55 (7.42 - 8.75) ^b	9.08 (8.42 - 9.78) ^a	8.20 (7.60 - 9.12) ^{ab}
G6	9.82 (9.60 - 9.90) ^a	9.20 (8.24 - 9.42) ^a	8.44 (7.82 - 9.12) ^{ab}
G7	9.11 (8.50 - 9.44) ^{ab}	8.30 (0.00 - 9.44) ^a	0.00 (0.00 - 9.19) ^{bc}

ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FOB-USP

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Interação de biofilme microbiano misto com cimentos endodônticos comerciais e experimentais de silicato de cálcio.

Pesquisador: LETICIA LOBO DE MELO SIMAS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 58193422.5.0000.5417

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Bauru

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.397.703

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo experimental comparativo entre diferentes materiais obturadores endodônticos no intuito de avaliar, em dentes humanos extraídos, a atividade antimicrobiana destes sobre cepas de *E. faecalis* e *C. albicans*.

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com os pesquisadores os objetivos da pesquisa são:

Informações extraídas na íntegra do documento "Projeto de Pesquisa".

Objetivo primário:

Comparar o efeito antimicrobiano intra-dentinário e a presença e caracterização de biofilme de dois cimentos comerciais a base de Silicato de Cálcio: 1) Bio C Sealer® (Angelus/ Paraná – Brasil), 2) Bio Root RCS® (Septodont/ Saint-Maur-des-Fossés – França) e cimentos experimentais contendo Silicato de Bário, Sulfato de Bário e Óxido de zircônio associados aos veículos propilenoglicol e polietilenoglicol em diferentes proporções, frente a cepas de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*.

Objetivos secundários

Comparar os diferentes cimentos endodônticos comerciais e experimentais em relação à:

- Porcentagem intra-dentinária de bactérias vivas e mortas por fluorescência utilizando Microscopia Confocal de Varredura a Laser;

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8358 **Fax:** (14)3235-8358 **E-mail:** cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



Continuação do Parecer: 8.3897/2022

- Porcentagem na superfície dos cimentos de bactérias vivas e mortas e biovolume por fluorescência utilizando Microscopia Confocal de Varredura a Laser;
- Análise de rugosidade da superfície e atividade antimicrobiana dos cimentos por Microscopia de Força Atômica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com os pesquisadores os Riscos e Benefícios descritos pelos autores são:

Informações extraídas na íntegra do documento PB Informações Básicas:

Riscos:

- Cansaço auditivo; - Risco de vazamento de dados devido uso de formulário online. Para amenizar esta situação será sugerido volume confortável durante a pesquisa (sem fones de ouvido) e os questionários serão enviados para e-mail único, no qual apenas mestranda e orientador terão acesso, afim de minimizar a possibilidade de vazamento de dados.

Benefícios:

- Conteúdo auxiliar no ensino; - Material disponível a qualquer momento para acesso; - Acesso simples ao conteúdo; - Possível de ser usado durante atividades cotidianas como meio de fixação."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa sem pendências de ordem ética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos apresentados nesta nova versão estão de acordo com as normas exigidas por este colegiado, não havendo mais necessidade de ajustes.

Recomendações:

Não há recomendações de ordem ética para esta pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências anteriormente listadas foram corrigidas/adequadas pelos pesquisadores nesta nova versão apresentada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 04/05/2022, via Google Meet, devido à pandemia da COVID-19 e por orientações da CONEP, com base nas normas éticas da Resolução CNS 468/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8356 Fax: (14)3235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br

**USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP**



Continuação do Parecer: L-2097/2022

e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P ROJETO_1887354.pdf	13/04/2022 22:40:49		Aceito
Outros	oficioanexarPB.pdf	13/04/2022 22:36:53	LETICIA LOBO DE MELO SIMAS	Aceito
Folha de Rosto	1folhaDeRosto.pdf	21/03/2022 21:56:02	LETICIA LOBO DE MELO SIMAS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetocep.pdf	20/03/2022 15:58:12	LETICIA LOBO DE MELO SIMAS	Aceito
Outros	cessaodentes.pdf	20/03/2022 15:25:01	LETICIA LOBO DE MELO SIMAS	Aceito
Outros	Departamentonovo.pdf	14/02/2022 14:44:43	LETICIA LOBO DE MELO SIMAS	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	14/02/2022 14:41:38	LETICIA LOBO DE MELO SIMAS	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	14/02/2022 14:40:57	LETICIA LOBO DE MELO SIMAS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensadotcle.pdf	14/02/2022 14:37:51	LETICIA LOBO DE MELO SIMAS	Aceito
Outros	Check_listCEP_2019.pdf	14/02/2022 14:34:50	LETICIA LOBO DE MELO SIMAS	Aceito
Outros	DeclaracaoCompromissoPesquisadorRe sultadosPesquisa.pdf	14/02/2022 13:47:57	LETICIA LOBO DE MELO SIMAS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 73 QUADRA B
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)2235-8356 Fax: (14)2235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br