

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE CIMENTOS
ENDODÔNTICOS PUROS E ACRESCIDOS DE
ANTIBIÓTICOS CONTRA DUAS LINHAGENS ATCC
DE *Enterococcus faecalis***

BAURU
2014

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

CAROLINE DE MATOS LOURENÇO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE CIMENTOS
ENDODÔNTICOS PUROS E ACRESCIDOS DE
ANTIBIÓTICOS CONTRA DUAS LINHAGENS ATCC
DE *Enterococcus faecalis***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Farmácia, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth.

BAURU
2014

L892a Lourenço, Caroline de Matos.

Atividade antibacteriana de cimentos endodônticos puros e acrescidos de antibióticos contra duas linhagens atcc de enterococcus faecalis / Caroline de Matos Lourenço -- 2014. 30f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Cimentos obturadores. 2. Antibióticos. 3. Cimentos-antibióticos. 4. Atividade antibacteriana. 5. *Enterococcus faecalis*. I. Weckwerth, Paulo Henrique. II. Título.

CAROLINE DE MATOS LOURENÇO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS
PUROS E ACRESCIDOS DE ANTIBIÓTICOS CONTRA DUAS
LINHAGENS ATCC DE *Enterococcus faecalis***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Farmácia, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth
Mestre e Doutor em Doenças Tropicais
Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP
Universidade Sagrado Coração

Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva
Mestre e Doutor em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Araraquara–UNESP
Universidade Estadual Paulista

Prof. Ms. Bruno Cavalini Cavenago
Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas
Faculdade de Odontologia de Bauru – USP
Universidade de São Paulo

Bauru, 10 de Dezembro de 2014.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por ser essencial em minha vida, me abriu as portas durante todos estes anos e me ajudou a superar os obstáculos, aos meus pais Rogério e Aparecida minha base de carinho e apoio, ao meu namorado sempre presente e amigo, meu professor orientador que fez com que tudo isso acontecesse.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

Ao professor Dr. Paulo Henrique Weckwerth por seus conhecimentos, paciência e confiança ao longo desses anos.

Aos meus pais, minha família, meu namorado e meus amigos que sempre acreditaram em mim e me deram forças para superar as dificuldades e acreditando na minha capacidade.

Agradeço também aos coautores deste trabalho em especial à Vanessa Raquel Greatti e Rodrigo Ricci Vivan, que me ajudaram e me ensinaram muito durante a elaboração do trabalho.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes”.
(Cora Coralina)

RESUMO

Enterococcus faecalis são cocos Gram positivos, elipsóides, em cadeias curtas, anaeróbios facultativos, habitantes do trato intestinal e genital e da cavidade oral de humanos e animais. Apresenta alta prevalência em infecções persistentes endodônticas e sua habilidade em causar doença perirradicular depende de sua habilidade em sobreviver e persistir como um patógeno no canal radicular e nos túbulos dentinários. É de preocupação do cirurgião dentista um completo saneamento do sistema de canais radiculares durante o preparo biomecânico e um completo selamento com cimentos obturadores no final do tratamento. Para isso, os materiais obturadores devem ter propriedades antimicrobianas quando em contato com os microrganismos e biofilmes e ser capaz de manter este efeito. A adição de antibióticos aos cimentos endodônticos tem sido proposta com a finalidade de potencializar esta ação antibacteriana dos materiais obturadores. Diante desta problemática, este estudo avaliou a atividade antibacteriana dos cimentos endodônticos MTA Fillapex, Sealapex, Sealer 26 e Endofill puros e acrescidos de amoxicilina e ciprofloxacina contra duas linhagens ATCC de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 e ATCC 4083). Os testes foram executados pelas técnicas de difusão radial dos cimentos sobre ágar BHI, de difusão radial de discos de papeis impregnados com os cimentos em diferentes variáveis de tempo e pelo teste de contato direto dos cimentos em tubos de Ependorf. Todos os materiais foram manipulados de acordo com o fabricante e os antibióticos adicionados na proporção de 0,5% do peso dos cimentos. Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação múltipla entre os resultados. Pela técnica da difusão dos cimentos em escavações sobre o ágar, Sealapex puro foi o único que apresentou halo de inibição para as duas linhagens testadas. MTA Fillapex associado à amoxicilina e ciprofloxacina revelou os melhores halos de inibição para as duas linhagens. Todos os cimentos tiveram sua ação potencializada pela adição dos antibióticos ($p < 0,05$). Pela técnica de difusão dos cimentos impregnados em discos de papel frente às duas linhagens estudadas, o cimento Sealapex puro fresco revelou atividade antimicrobiana em todas as variáveis de tempo. Quando associados aos antibióticos, todos os cimentos tiveram sua ação antimicrobiana potencializada pela ação das drogas em todas as variáveis de tempo. Este mesmo resultado pode ser observado na técnica do contato direto dos cimentos com as linhagens em estudo. A atividade antibacteriana frente ao *E. faecalis* dos cimentos MTA Fillapex, Endofill, Sealer e Sealapex associados aos antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina é potencializada mesmo após um longo período da reação de presa dos cimentos.

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

ABSTRACT

Enterococcus faecalis are Gram positive coccus, facultative anaerobes, ellipsoid and of short chains in shape, that inhabit the intestinal and the genital tracts, and men's and animals' mouths. They can cause a large range of diseases in people such as cystitis and endocarditis. These microorganisms are highly prevalent in persistent endodontic infections, being usually associated to asymptomatic cases. Their ability to cause periradicular disease depends on their ability to survive and remain as a pathogen in the root canal and in the dentinal tubules. It is the dentist's concern to do a complete sanitation of the root canal system during the biomechanical preparation and a complete sealing with filling materials at the end of the treatment. In order to inhibit bacterial growth, filling materials must have antimicrobial properties when in contact with the microorganisms and, ideally, be able to maintain such action in the long term. The addition of antibiotics to endodontic sealers has been suggested with the purpose of potentiate such antibacterial action in the filling materials. In face of this issue, this study aimed at evaluate the antibacterial action of MTA Fillapex, Sealapex, Sealer 26 and Endofill endodontic sealers, in pure form or with amoxicillin and ciprofloxacin addition against two ATCC *Enterococcus faecalis* lineages (ATCC 29212 and ATCC 4083). Tests were done under the technique of radial diffusion of the sealer directly applied to the agar and impregnated in paper discs and also by direct contact tests. The results obtained were analyzed by ANOVA, followed by the Tukey test in order to establish a multiple comparison between results. According to the diffusion of sealer directly applied to sections dug on the agar technique, Sealapex in pure form was the only agent that displayed inhibition halo for both lineages tested. Amoxicillin and ciprofloxacin combined MTA Fillapex displayed the best inhibition halos for both lineages. All sealers had their action potentiated by the addition of the antibiotics ($p < 0.05$). By the diffusion of sealer impregnated in paper discs technique applied to both lineages under study, fresh Sealapex sealer in pure form showed antimicrobial activity during all time variables. When associated to antibiotics, all sealers had their antimicrobial action potentiated by the action of the drugs in all time variables. This same result could be observed under the technique of direct contact of the sealers with the studied lineages. The antimicrobial activity of amoxicillin and ciprofloxacin combined MTA Fillapex, Endofill, Sealer and Sealapex sealers against *E. faecalis* is potentiated even after a long period of the materials setting reaction.

Key words: Sealers, Antibiotics, Antibiotic-sealers, Antibacterial activity, *Enterococcus faecalis*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivos Gerais.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
4. RESULTADOS.....	17
5. DISCUSSÃO.....	21
REFERÊNCIAS.....	27

1. Introdução

O insucesso do tratamento endodôntico é determinado clinicamente pelo acompanhamento radiográfico, cujo surgimento, persistência ou aumento de uma lesão periapical passa a ser um importante indicativo de insucesso, assim como a persistência ou o aparecimento de sinais e sintomas do dente tratado endodonticamente. O acompanhamento por um longo período é considerado desejável para confirmar o sucesso da terapêutica endodôntica. Para resolução dos casos de insucesso, há duas modalidades de tratamento: o retratamento endodôntico e a cirurgia apical. O retratamento endodôntico é, de acordo com a maioria dos autores, o tratamento de primeira escolha.

Allen et al., 1989 e Hepworth & Friedman, 1997, analisando o sucesso do retratamento endodôntico, encontraram uma taxa de aproximadamente 66%. O menor índice de sucesso do retratamento endodôntico pode indicar, além de dificuldades técnicas devido a fatores iatrogênicos do tratamento anterior, uma dificuldade na eliminação da microbiota do canal radicular de dentes com insucessos do tratamento endodôntico.

Pinheiro, 2005 mostra que a microbiota de canais com insucesso do tratamento endodôntico difere daquela encontrada normalmente em dentes necrosados e não tratados, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, sendo caracterizada por um número limitado de microrganismos, com predominância de Gram positivos. Informações sobre a natureza das infecções dos canais radiculares de dentes com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais têm aumentado nos últimos seis anos (PINHEIRO, 2005). Estudos iniciais revelaram que a microbiota de canais radiculares de dentes com fracasso do tratamento endodôntico era diferente daquela encontrada em canais radiculares de dentes com polpas necrosadas e não tratados endodonticamente. Esses dados foram confirmados, posteriormente, pela maioria dos estudos da microbiota de canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico.

Vários estudos têm demonstrado que a infecção de canais radiculares com polpas necrosadas e não tratados caracteriza-se pela presença de uma microbiota mista e polimicrobiana, comumente em combinações de quatro a sete espécies, predominantemente anaeróbias estritas, com relativo equilíbrio entre bactérias Gram

positivas e Gram negativas. Espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus* e *Eubacterium* são frequentemente cultivadas de canais radiculares infectados (PINHEIRO, 2005).

Molander et al., 1998, analisaram o estado microbiológico de 100 dentes tratados endodonticamente com periodontite apical visível radiograficamente. Os resultados mostraram que havia bactérias presentes em 68 dentes, porém, o uso de clorofórmio para a desobstrução do conduto foi considerado um fator influente, diminuindo o crescimento bacteriano. Dos 21 casos em que se utilizou clorofórmio, houve crescimento bacteriano em apenas dez casos (47,3%), enquanto nos 79 dentes restantes o crescimento foi detectado em 58 canais (73,4%). Um total de 117 linhagens microbianas foram isoladas, com 114 bactérias e três fungos. A maioria dos canais continha uma ou duas espécies bacterianas (85% dos casos). As bactérias anaeróbias facultativas Gram positivas predominaram, constituindo 69% das espécies isoladas. *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Candida* foram os principais gêneros isolados. *Enterococcus* foi o gênero bacteriano mais frequentemente isolado, presente em 47% dos canais com bactérias. Os autores concluíram que a microbiota dos dentes tratados endodonticamente diferenciava, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, dos dentes com polpas necrosadas.

Peciulienne et al., 2001 investigaram a ocorrência de fungos, bacilos entéricos Gram negativos e *Enterococcus* em 40 dentes tratados endodonticamente, assintomáticos, e com periodontites apicais visíveis radiograficamente. Foram detectados microrganismos em 33 dos 40 dentes. Havia fungos presentes em seis canais (18% das culturas positivas) e foram identificados como *Candida albicans* em todos os casos. Bacilos entéricos Gram negativos estavam presentes em três casos: *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. *Enterococcus* estavam presentes em 21 canais (64% das culturas positivas), sendo o principal ou o único componente da microbiota em 19 casos. Todas as cepas foram identificadas como *Enterococcus faecalis*.

O *Enterococcus faecalis* é a espécie bacteriana mais frequentemente isolada, com prevalência variando entre 29% e 77% nos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico.

O gênero *Enterococcus* inclui os enterococos clássicos previamente classificados como estreptococos do grupo D. São habitantes normais do trato gastrointestinal e em menor proporção do trato vaginal e da cavidade oral (JETT et al., 1994).

Tornaram-se importantes agentes de doenças humanas devido principalmente à sua elevada resistência aos agentes antimicrobianos e seus inúmeros fatores de virulência recentemente mais estudados (PORTENIER et al., 2003; KAYA OGLU & ØRSTAVIK, 2004).

São cocos Gram positivos, arranjados aos pares ou em cadeias curtas, sendo dificilmente diferenciados microscopicamente de alguns estreptococos. São anaeróbios facultativos e crescem em temperatura de 35°C. Crescem sobre a superfície de ágar sangue como colônias tipicamente gama-hemolíticas e sobre a superfície do ágar M-*Enterococcus* como colônias puntiformes de cor vermelho escuro até arroxeadas. Os enterococos toleram bile de boi a 40% e podem hidrolisar esculina. Ainda, crescem na presença de cloreto de sódio a 6,5%. São distinguidos de bactérias do gênero *Staphylococcus* pela incapacidade de produção de catalase (HARTKE et al., 1998).

Seus fatores de virulência têm sido amplamente estudados. Produzem citolisinas com atividade sobre hemácias humanas, ovinas e de cavalo. A substância de agregação é uma proteína codificada por plasmídeos responsável pela aglutinação dos microrganismos para facilitar a troca entre plasmídeos. As estirpes de *E. faecalis* produzem feromonas, peptídeos capazes de amplificar a transferência de DNA plasmidial por estirpes em processo conjugativo e também de amplificar a resposta inflamatório durante o processo infeccioso (KAYA OGLU & ØRSTAVIK, 2004).

O ácido lipoteicóico é, além de adesina, um importante fator de virulência por induzir fator de necrose tumoral (TNF), modulando de forma agressiva a resposta imune. Produzem várias enzimas extracelulares como gelatinase e hialuronidase (KAYA OGLU & ØRSTAVIK, 2004).

O *E. faecalis* causa infecções nosocomiais do trato urinário (MORRISON e WENZEL, 1986), bacteremia (RICHARDS et al., 2000; VERGIS et al., 2001) e endocardite (OLAISON, 2002). Embora seja uma espécie presente nos processos infecciosos humanos, sua etiopatogenia nos processos infecciosos da cavidade oral vem sendo amplamente discutida (SEDGLEY et al., 2004).

Esta bactéria tem demonstrado habilidade para sobreviver sozinho no interior do canal radicular sem o suporte de outras bactérias. *E. faecalis* foi isolado em 38% dos dentes que apresentaram microrganismos recuperáveis, sugerindo que este é um importante agente no insucesso endodôntico. O fato do *E. faecalis* estar ausente ou em pequeno número em canais sem tratamento endodôntico, indica que essa bactéria pode penetrar no interior do canal durante o tratamento, sobreviver ao tratamento antimicrobiano e permanecer após a obturação (FABRICIUS et al., 1982).

A recuperação frequente do *E. faecalis* de canais radiculares com insucesso do tratamento endodôntico tem sido amplamente relatada (SUNDQVIST et al., 1998; PINHEIRO et al., 2003; RÖÇAS et al. 2003). Os *E. faecalis* estão presentes em canais radiculares não tratados endodônticamente e quando presentes eles usualmente compõem uma pequena porção da microbiota do canal radicular. Demonstram alta resistência a medicamentos usados durante o tratamento endodôntico e este é um dos poucos microrganismos que tem mostrado *in vitro* resistir ao efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio (WEIGER et al., 1995, EVANS et al., 2002).

Evans et al. (2002), verificaram que a resistência desse microrganismo ao hidróxido de cálcio está relacionada a uma bomba de próton.

O processo de sanificação em Endodontia tem sido pesquisado e discutido sob vários aspectos. É aceito que um dos fatores condicionantes, considerado como pré-requisito para a instalação da patologia pulpar e periapical é a presença de microrganismos (KAKEHASHI et al., 1965). Desta forma, a determinação e o conhecimento dos microrganismos predominantes nos canais radiculares infectados representam fator decisivo na escolha de um processo de controle microbiano.

Assim, devido aos microrganismos estarem envolvidos em casos de infecções secundárias ou persistentes associadas com lesões perirradiculares, o espectro da atividade antimicrobiana de medicamentos (curativo de demora), soluções irrigadoras e cimentos endodônticos, devem incluir estes microrganismos.

Mesmo assim, microrganismos presentes dentro de túbulos dentinários podem não ser afetados pelo preparo biomecânico, que consiste na ação física dos instrumentos e a ação química das soluções irrigadoras dentro do canal radicular.

O controle antimicrobiano do canal radicular é delegado a sanificação proporcionada pela fase do preparo biomecânico. Embora significativa redução de microrganismos tenha sido observada após a conclusão da limpeza e da

modelagem, alguns trabalhos demonstraram a necessidade da medicação intracanal entre sessões, com o objetivo de potencializar o processo de sanificação do sistema de túbulos dentinários (ASSED, 1993).

Com base nessas evidências, parece oportuno relatar que a presença de microrganismos durante o tratamento endodôntico pode não conduzir o tratamento ao fracasso, mas certamente sua ausência favorece o sucesso.

O hidróxido de cálcio é o curativo de demora mais empregado atualmente. Estrela et al. (1994) descreve duas atividades enzimáticas do hidróxido de cálcio. A primeira é a inibição de enzimas bacterianas, a partir da ação em nível de membrana citoplasmática, conduzindo ao efeito antimicrobiano, e a segunda, observada pela sua ação sobre a fosfatase alcalina, levando a formação de tecido mineralizado. Estas propriedades são decorrentes a seu elevado pH, com valores aproximados de 12,6, o que estabelece alta liberação de íons cálcio e de íons hidroxila. A literatura relata também a atividade do hidróxido de cálcio sobre o LPS bacteriano (SAFAVI; NICHOLS 1993; SAFAVI; NICHOLS 1994).

Entretanto, mesmo com a utilização do curativo de demora, é impossível a completa eliminação de microrganismos do sistema de canais radiculares (NAIR et al., 2005; NAIR, 2006; KIEVIT e IGLEWSKI, 2000).

É importante que, os materiais obturadores possuam atividade antimicrobiana para que na fase de obturação possam confinar e, se possível, eliminar os microrganismos que possivelmente permaneçam nos túbulos dentinários. Atualmente, o mercado odontológico disponibiliza uma grande gama de cimentos endodônticos.

Vários estudos na literatura revelam as propriedades antimicrobianas de vários cimentos disponíveis ao Endodontista no mercado.

Gomes et al., (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana dos cimentos Endofill, Endomethasone, Endomethasone N, Sealer 26 and AH-Plus contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces naeslundii*, pelos métodos do contato direto e de difusão sobre agar. Pelo contato direto, os cimentos não inibiram completamente os microrganismos testados. Os cimentos que apresentaram melhores zonas de inibição foram o Endofill seguido pelo Endomethasone e Endomethasone N.

Bodrumlu e Semiz (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana dos cimentos Endomethasone, Sultan, Sealapex, Diaket, Epiphany e AH 26 contra *E. faecalis* pelo

método da difusão sobre placas de agar Mueller-Hinton. Todos os cimentos revelaram zonas de inibição, sendo que Endomethasone e Sultan exibiram as melhores zonas de inibição.

Miyagak et al., (2006) avaliaram também *in vitro* a atividade antimicrobiana dos cimentos N-Rickert, Sealapex, AH Plus, MTA e cimento de Portland contra *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *Escherichia coli* pelo método da difusão. Os resultados revelaram que somente os cimentos AH Plus e N-Rickert apresentaram atividade sobre *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*. Os outros cimentos não produziram halos de inibição e *E. faecalis* revelou-se resistente contra todos os cimentos testados.

Tanomaru-Filho et al., (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana dos cimentos Sealer 26, Sealapex + óxido de zinco, óxido de zinco e eugenol, cimento de Portland cinza, cimento de Portland branco, MTA cinza, MTA branco e Pro Root cinza, contra estirpes ATCC de *Micrococcus luteus*, *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *C. albicans* e *E. faecalis*. Concluíram que todas as linhagens foram sensíveis aos materiais testados, com melhores halos de inibição para o Sealer 26, Sealapex + óxido de zinco e óxido de zinco e eugenol.

Yasuda et al., (2008) compararam *in vitro* a atividade antimicrobiana de um novo cimento endodôntico a base de resina com outros cinco cimentos frente à vários patógenos. Testaram o SuperBond Sealer, Sealapex, AH Plus, Roeko Seal, Canals N e Pro Root MTA frente a linhagens ATCC de *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*, *Streptococcus sanguinis* e uma cepa de *St. mutans*. Os resultados revelaram que Pro Root MTA não apresentou atividade e AH Plus demonstrou melhores halos de inibição frente às linhagens testadas. Entre os cimentos que apresentaram atividade, o SuperBond Sealer revelou menor eficiência antimicrobiana.

Queiroz et al., (2009) avaliaram *in vitro* a atividade antibacteriana dos cimentos óxido de zinco e eugenol, pasta Calen espessada com óxido de zinco, Sealapex e EndoRez frente a linhagens ATCC de *Kocuria rhizophila*, *E. faecalis*, *St. mutans*, *E. coli* e *S. aureus*. Os resultados revelaram que todos cimentos apresentaram eficiência numa ordem decrescente a partir do óxido de zinco e eugenol seguido pelos cimentos pasta Calen espessada com óxido de zinco, Sealapex e EndoRez.

A adição de antibióticos aos cimentos pode aumentar seus efeitos antimicrobianos e pode promover uma importante vantagem na redução da concentração de microrganismos necessários para favorecer a resposta do hospedeiro (HOELSCHER et al., 2006; BAER e MAKI, 2010).

Hoelscher et al, 2006, avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana de cinco antibióticos adicionados ao cimento endodôntico Kerr EWT, contra *E. faecalis*. Os antibióticos avaliados foram: amoxicilina, penicilina, clindamicina, metronidazol e doxiciclina. Os antibióticos foram adicionados separadamente ao cimento endodôntico Kerr EWT na relação de 10% do peso do cimento e espatulado de acordo com as especificações do fabricante. Discos de papel estéreis de 6 mm de diâmetro foram saturados com a mistura cimento-antibiótico e colocados diretamente sobre o Agar. Todas as placas foram incubadas por 48 horas e o diâmetro dos halos de inibição foi medido em milímetros. Os resultados obtidos mostraram que as combinações cimento-antibiótico contendo amoxicilina, penicilina, clindamicina e doxiciclina apresentaram uma diferença significativa na média das zonas de inibição comparadas ao cimento Kerr EWT puro. Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre a combinação metronidazol-cimento e o cimento Kerr EWT puro. Até esta data, a incorporação de antibióticos a cimentos endodônticos não havia sido relatada na literatura.

Baer e Maki, 2010, avaliaram a ação antimicrobiana dos cimentos endodônticos Pulp Canal Sealer EWT, AH Plus e RealSeal SE associados com amoxicilina frente ao *E. faecalis*. Estes estudos revelaram que a associação dos antibióticos potencializou a atividade antibacteriana dos cimentos endodônticos.

A ideia de acrescentar antibióticos aos cimentos parece ser pragmática em sua origem. O conceito de utilizar os cimentos como um depósito de antibióticos faz sentido, ao passo que permite a liberação do fármaco diretamente no sítio da iminente infecção (HENDRIKSA et al., 2004).

O primeiro relato de utilização de cimento carregado com antibióticos foi descrito por Buchholz e Engelbrecht em 1970, conforme afirma Klekamp et al., 1999. O interessante dessa técnica é a possibilidade de disponibilizar altas doses de antibióticos localmente, com baixa toxicidade sistêmica. Deve-se ressaltar que o sucesso da idéia depende do antibiótico escolhido, que deve ser guiado pela susceptibilidade dos microrganismos envolvidos, sejam eles empíricos ou comprovados (KLEKAMP et al., 1999).

Sabendo-se da importância do *Enterococcus faecalis* no fracasso endodôntico torna-se viável e oportuno a realização da presente pesquisa para se determinar a susceptibilidade *in vitro* de diferentes linhagens padrão ATCC a vários cimentos endodônticos associados aos antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina, já que, em linhas gerais, encontramos uma escassez de literatura pertinente sobre a temática da pesquisa.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

a) Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de cimentos endodônticos puros e associados a antibióticos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a susceptibilidade de linhagens padrão ATCC (American Type Culture Collection) de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 e 4083) frente aos cimentos MTA Fillapex, Sealapex, Sealer 26 e Endofill puros;
- b) Avaliar a susceptibilidade de linhagens padrão ATCC de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 e 4083) frente aos cimentos MTA Fillapex, Sealapex, Sealer 26 e Endofill associados aos antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina;
- c) Comparar os resultados obtidos através das diferentes metodologias utilizadas nos testes de avaliação da atividade antibacteriana dos cimentos puros e associados aos antibióticos.

3. Material e Métodos

AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DOS CIMENTOS PUROS E ASSOCIADOS AOS ANTIBIÓTICOS

Avaliação pelo método da difusão radial dos cimentos puros e associados aos antibióticos

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

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

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

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

total dos cimentos, os poços foram preenchidos através de seringas e as placas foram deixadas 2 horas em temperatura ambiente para pré-incubação. Após, foram incubadas em estufa a 37°C, sob condições atmosféricas adequadas por 24 horas. Os halos de inibição foram mensurados com auxílio de um paquímetro digital sob luz refletida. A mesma metodologia foi realizada com os cimentos sem os antibióticos. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

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

Material	Composição	Fabricante
MTA Fillapex	Resina salicilato, resina diluente, sílica nanoparticulada, óxido de bismuto, trióxido mineral agregado, pigmentos	Angelus, Londrina, PR, Brasil
Sealer 26	Pó: trióxido de bismuto, hidróxido de cálcio, hexametileno tetramina, dióxido de titânio Líquido: epóxi bisfenol	Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil
Endofill	Pó: óxido de zinco, resina hidrogenada, subcarbonato de bismuto, sulfato de bário, borato de sódio Líquido: eugenol e óleo de amêndoas	Desntply, Petrópolis, RJ, Brasil
Sealapex	20% óxido de cálcio, 29% trióxido de bismuto, 2,5% óxido de zinco, 3% partículas de silício, 2% dióxido de titânio, 1% estearato de zinco, 3% fosfato tricálcio, 39% de mixer de salicilato de isobutila + salicilato de metileno de metila + pigmento	SybronEndo, Glendora, CA, USA

Técnica dos discos de papel impregnados com os cimentos

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

A partir dessas placas, 5 colônias foram transferidas para um tubo contendo 5 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion Merck®) que foi incubado a 37°C “overnight”. A partir do crescimento, foi preparado em salina estéril o ajuste para a densidade ótica do padrão de turbidez da escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias mL⁻¹). Placas de Petri de 150 x 10 mm foram previamente preparadas com ágar BHI (Merck®) com espessura de 6 mm de ágar. Uma vez

ajustada à densidade do inóculo, a semeadura foi feita através de zaragatoa de algodão estéril na superfície das placas. As placas foram colocadas em estufa por 30 minutos para secagem da superfície do meio. Discos de papel estéreis de elevada gramatura foram impregnados com as combinações de cimento-antibiótico e somente com cimentos, conforme descrito na metodologia dos poços escavados. Após a impregnação, os discos foram colocados diretamente sobre a superfície do ágar com uma discreta pressão para que fiquem aderidos ao meio de cultura. Após, foram incubadas em estufa a 37°C, sob condições atmosféricas adequadas por 24 horas. Os halos de inibição foram mensurados com auxílio de um paquímetro digital sob luz refletida. Uma porção dos discos impregnados com os cimentos em estudo foi mantida numa câmara úmida em ambiente estéril por 24 horas e por 7, 15 e 60 dias para serem testados novamente frente às linhagens bacterianas. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

Avaliação pelo método do contato direto da bactéria com os cimentos puros e associados aos antibióticos

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

Tubos de Ependorf estéreis de 0,5 mL foram utilizados para o teste de contato direto. Todos os cimentos foram manipulados de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizados os cimentos puros e os cimentos adicionados de 0,5% do peso total com os antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina. Os tubos de Ependorf tiveram suas paredes internas totalmente revestidas com o mesmo volume dos cimentos manipulados. Os frascos de Ependorf utilizados nos testes 20 minutos após a manipulação foram considerados como cimentos recentemente preparados. Outros frascos revestidos foram mantidos por 24 horas e por 7, 15 e 60 dias em câmara úmida por 37°C, antes do teste.

Um volume de 10 microlitros da suspensão bacteriana de cada linhagem contendo $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias mL⁻¹ foi cuidadosamente inoculada na superfície do cimento recentemente preparado e sobre os cimentos das outras variáveis de tempo. Uma suspensão bacteriana foi inoculada em um tubo não revestido com os cimentos e serviu como controle. Os tubos foram incubados

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

Análise estatística

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

4. Resultados

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

Frente à linhagem em estudo utilizando os cimentos puros, somente Sealapex revelou pequeno halo de inibição com média de 7 mm. Quando da associação de amoxicilina e ciprofloxacina aos cimentos, MTA fillapex associado a amoxicilina revelou os melhores halos de inibição, com média de 30 mm (tabela 1).

Tabela 1. Avaliação pela técnica da difusão dos cimentos frescos puros e associados aos antibióticos sobre poços escavados na superfície do Brain Heart ágar frente a linhagem ATCC 29212 (medidas feitas pela média em mm de halo de inibição após 24h)

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

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

Frente à linhagem em estudo utilizando os cimentos puros, somente Sealapex revelou pequeno halo de inibição com média de 8 mm. Quando da associação de amoxicilina e ciprofloxacina aos cimentos, MTA fillapex associado a amoxicilina revelou os melhores halos de inibição, com média de 36 mm (tabela 2).

Tabela 2. Avaliação pela técnica da difusão dos cimentos frescos puros e associados aos antibióticos sobre poços escavados na superfície do Brain Heart ágar frente a linhagem ATCC 4083 (medidas feitas pela média em mm de halo de inibição após 24h)

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

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

Para o cimento puro fresco após a espatulação, somente Sealapex revelou halo de inibição frente a linhagem em estudo em todas as variáveis de tempo ($p < 0,05$). Quando associados aos antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina, todos os cimentos frescos foram potencializados pela ação das drogas em todas as variáveis

de tempo. Os cimentos MTA Fillapex, Endofill e Sealer associados à amoxicilina não mostraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), conforme dados da tabela 3. Na variável de 24 h, o MTA Fillapex+ amoxicilina também apresentou-se mais eficiente em relação aos outros cimentos ($p < 0,05$). Na variável 7 dias, Sealapex+amoxicilina revelou melhor desempenho em relação aos outros cimentos ($p < 0,05$). Na variável de 15 dias, Endofill e Sealapex associados a amoxicilina, revelaram melhor desempenho que os outros antibióticos ($p < 0,05$), sendo que os mesmos mostraram-se iguais estatisticamente na variável de 60 dias ($p < 0,05$). Em relação a associação dos cimentos frescos com ciprofloxacina, MTA Fillapex, Endofill e Sealapex, revelaram desempenho semelhante ($p < 0,05$), o mesmo acontecendo com a variável 24 horas. Na variável de 7 dias, a análise estatística revelou que os cimentos MTA Fillapex, Endofill e Sealapex, mostraram desempenho semelhante, o mesmo acontecendo na variável de 15 dias ($p < 0,05$). Na variável de 60 dias, MTA Fillapex e Sealapex, revelaram desempenho semelhante.

Tabela 3. Avaliação pela técnica da difusão dos cimentos puros e associados aos antibióticos impregnados em discos de papel na superfície do Brain Heart ágar frente a linhagem ATCC 29212 sob diferentes variáveis de tempo (medidas feitas pela média em mm de halo de inibição)

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

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

Para o cimento puro fresco após a espátulação, somente Sealapex revelou halo de inibição frente a linhagem em estudo em todas as variáveis de tempo. Quando associados aos antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina, todos os cimentos foram potencializados pela ação das drogas em todas as variáveis de tempo (tabela 4). Os cimentos MTA Fillapex, Endofill e Sealapex associados à amoxicilina não mostraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), conforme dados da tabela 4, o mesmo acontecendo na variável de 24 horas. Na variável de 7 dias, Sealapex+amoxicilina apresentou melhor desempenho em relação aos outros cimentos ($p < 0,05$), não ocorrendo diferença entre Endofill e Sealer. Na variável de 15 dias, Sealapex+amoxicilina revelou grande eficiência, estatisticamente

5. Discussão

Das linhagens de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e 4083 utilizadas nos experimentos

Foram utilizadas em nossa pesquisa, duas linhagens diferentes de *E. faecalis*, uma ATCC (American Type Culture Collection) 4083, originalmente isolada de infecção radicular de dente e outra ATCC 29212, originalmente isolada de infecção urinária. A recuperação frequente do *E. faecalis* de canais radiculares com insucesso do tratamento endodôntico tem sido amplamente relatada (Sundqvist et al., 1998; Pinheiro et al., 2003; Rôças et al. 2003). Essa bactéria também demonstra alta resistência a medicamentos usados durante o tratamento endodôntico e é um dos poucos microrganismos que tem mostrado resistir *in vitro* ao efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio (WEIGER et al., 1995, EVANS et al., 2002). Assim, justificamos a utilização dessas linhagens na presente pesquisa. Em nosso estudo, fica claro a discreta sensibilidade aumentada da linhagem ATCC 4083. Vários estudos que avaliam a atividade antimicrobiana de materiais endodônticos são encontrados na literatura, utilizando a linhagem ATCC 29212 (Çobankara et al., 2003; Eldeniz et al., 2006; Al-Hezaimi et al., 2006; Miyagak et al., 2006) e outros utilizando outra linhagem denominada ATCC 10541 (Leonardo et al., 2000; Tanomaru-Filho et al., 2007;). Nesta pesquisa em que, cimentos endodônticos foram testados puros e associados aos antibióticos, parece propício que a utilização de uma linhagem originalmente isolada de infecção radicular deva ser utilizada com o propósito de reproduzir resultados fidedignos.

Das metodologias utilizadas nos testes de atividade antibacteriana dos cimentos

Um dos desafios nas pesquisas endodônticas deve ser exatamente a implantação e padronização de protocolos para os testes *in vitro* e *in vivo* da efetividade de cimentos endodônticos. Um dos protocolos utilizados nesta pesquisa foi o teste de difusão das substâncias sobre a superfície do ágar pelos métodos dos poços escavados e preenchidos e pelos discos de papel impregnados com os cimentos. Esta metodologia vem sendo amplamente utilizada nas pesquisas com materiais endodônticos (ÇOBANKARA et al., 2003; ASGARY & KAMRANI, 2008; RIBEIRO et al., 2010; ZARRABI et al., 2009; TANOMARU-FILHO et al., 2007;

LEONARDO et al., 2000; MIYAGAK et al., 2006, HOELSCHER et al., 2006). No entanto, várias limitações devem ser observadas nos testes de difusão, como a falta de padronização da densidade do inoculo, que geralmente é feita pela turbidimetria referente à escala 0,5 de Mac Farland, meio de cultura adequado para os testes, viscosidade do ágar, condições de estocagem das placas favorecendo a desidratação e conseqüente baixo desempenho do ágar, número de testes por placa de cultura e tempo e temperatura adequados de incubação (PUMAROLA et al., 1992). Outra importante desvantagem dos testes de difusão é o fato de serem testes qualitativos, que revelam somente a sensibilidade da linhagem bacteriana expressa em milímetros de halo de inibição e assim, não poderem distinguir entre propriedades bactericida ou bacteriostática dos materiais testados (TOBIAS, 1988). Testes avaliando a concentração inibitória mínima (CIM) dos materiais por métodos de diluição, poderiam revelar a atividade bacteriostática ou bactericida dos materiais testados (AL-HEZAIMI et al., 2006). Também, os resultados dos testes de difusão não dependem somente da toxicidade do material para a linhagem testada, mas também da difusibilidade dos componentes antibacterianos através do meio de cultura utilizado (FRAGA et al., 1996). Sendo o ágar um meio altamente hidratado, somente materiais com boa solubilidade em água poderiam ser testados (FUSS et al., 1997) e ainda poderiam promover grandes zonas de inibição do microrganismo.

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

Dos resultados obtidos nos testes de difusão em poços escavados no ágar

Os resultados obtidos revelaram que o cimento Sealapex puro foi o único que demonstrou alguma atividade antibacteriana frente às duas linhagens de *E. faecalis* testadas. Estes achados já foram revelados por Bodrumlu e Semiz (2006) e por Yasuda et al., (2008), embora sejam discrepantes dos resultados encontrados por Miyagak et al., (2006).

Todos os cimentos tiveram sua eficiência potencializada pela adição dos antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina. A ideia de acrescentar antibióticos aos cimentos parece ser pragmática em sua origem. O conceito de utilizar os cimentos como um depósito de antibióticos faz sentido, ao passo que permite a liberação do fármaco diretamente no sítio da iminente infecção (HENDRIKSA et al., 2004). A eficiência de cimentos associados à amoxicilina já foi revelada por Hoelscher et al, 2006 e por Baer e Maki, 2010. Os cimentos adicionados da ciprofloxacina revelaram uma eficiência muito próxima, com pequena variação nos halos de inibição para as duas linhagens testadas. Isto não aconteceu com a adição da amoxicilina, cujos halos de inibição foram discrepantes. O MTA Fillapex e o Sealapex revelaram melhor atividade antibacterina contra a linhagem 4083. Esta linhagem é originalmente isolada de infecção de canal radicular e parece apresentar resultados mais fidedignos quando este tipo de estudo é realizado.

Dos resultados obtidos nos testes de difusão dos cimentos impregnados em discos de papel em diferentes variáveis de tempo

Os resultados obtidos revelaram que o cimento Sealapex puro foi o único que demonstrou atividade antibacteriana frente às duas linhagens de *E. faecalis* testadas nas diferentes variáveis de tempo. Estes achados já foram revelados por Bodrumlu e Semiz (2006) e por Yasuda et al., (2008), embora sejam discrepantes dos resultados encontrados por Miyagak et al., (2006). Todos os cimentos tiveram sua eficiência potencializada pela adição dos antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina. Sealapex revelou eficiência antibacteriana aumentada nas variáveis de tempo de 7, 15 e 60 dias. Isto talvez pelo fato de o cimento favorecer a liberação do antibiótico, mesmo por um longo período após a reação de presa.

Dos resultados obtidos nos testes de contato direto dos cimentos com a bactéria em diferentes variáveis de tempo

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

A adição de antibióticos aos cimentos já se mostrou eficiente em outras pesquisas realizadas (BAER & MAKI, 2010; HOELSCHER, et al., 2006). Avaliando os cimentos Pulp Canal Sealer, AH Plus e RealSeal SE associados à amoxicilina contra *E. faecalis*, Baer & Maki, 2010, demonstraram que todos estes cimentos frescos e após presa de um, três e sete dias, inibiram completamente o crescimento de *E. faecalis* pelo teste de contato direto. Hoelscher et al., 2006, também revelaram a ação inibitória sobre *E. faecalis* do cimento Kerr Pulp Canal Sealer EWTA associado aos antibióticos amoxicilina, penicilina, clindamicina, metronidazol e doxiciclina, sendo que os melhores halos de inibição foram obtidos com a associação com amoxicilina. A presente pesquisa também demonstra que os cimentos MTA Fillapex, Endofill, Sealer e Sealapex associados à amoxicilina inibem o crescimento de duas linhagens de *E. faecalis*, tanto imediatamente após a espatulação como em 60 dias após a reação de presa, sem diferença estatística ($p > 0,05$). Esta mesma ação dos cimentos foi revelada quando da associação com a ciprofloxacina. Os resultados obtidos nas três diferentes metodologias são semelhantes em relação à inibição do crescimento das linhagens estudadas.

Da sensibilidade do *E. faecalis* aos antibióticos

A susceptibilidade do *E. faecalis* isolados de infecções radiculares tem sido amplamente estudada. Alguns estudos revelam a elevada susceptibilidade desta linhagem à amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, benzilpenicilina, vancomicina e doxiciclina e diminuição de sensibilidade à eritromicina e azitromicina (PINHEIRO et al., 2003; PINHEIRO et al., 2004). Discrepante a estes resultados, Dahlén et al., 2000, demonstraram resistência do *E. faecalis* à benzilpenicilina, ampicilina,

clindamicina, metronidazol e tetraciclina e sensibilidade à eritromicina e vancomicina. As diferenças de sensibilidade da bactéria podem depender do tipo de linhagem ou cepa estudada.

Da justificativa para associação dos antibióticos aos cimentos

Por muito tempo, os antibióticos têm sido amplamente utilizados em odontologia. A aplicação local de um antibiótico carregado por um cimento seria, a melhor maneira, de introduzir antibiótico junto ao sítio endodôntico (MOHAMMADI & ABBOTT, 2009). É importante que, os materiais obturadores possuam atividade antimicrobiana para que na fase de obturação possam confinar e, se possível, eliminar os microrganismos que possivelmente permaneçam nos túbulos dentinários. Mas, se o cimento for adicionado de um antibiótico que possa potencializar sua ação bactericida após sua reação de presa, poderia ser de grande valia na terapia endodôntica inicial e na prevenção de um insucesso endodôntico. A adição de antibióticos aos cimentos já se mostrou eficiente *in vitro* em outras pesquisas realizadas (BAER & MAKI, 2010; HOELSCHER, et al., 2006).

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

O uso de antibióticos tópicos em medicina não é novo, mas até o presente momento, seu uso em odontologia tem sido muito limitado. O primeiro relato de utilização de cimento carregado com antibióticos foi descrito por Buchholz e Engelbrecht em 1970, conforme afirma Klekamp et al., 1999. O interessante dessa técnica é a possibilidade de disponibilizar altas doses de antibióticos localmente, com baixa toxicidade sistêmica. Deve-se ressaltar que o sucesso da idéia depende do antibiótico escolhido, que deve ser guiado pela susceptibilidade dos microrganismos envolvidos, sejam eles empíricos ou comprovados (KLEKAMP et al., 1999).

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

Mesmo assim, muitas questões ainda precisam de respostas quanto à utilização de antibióticos no sistema de canais radiculares. Por exemplo, o uso tópico da amoxicilina poderia promover uma resposta alérgica? Poderiam os cimentos combinados com antibióticos conduzir a uma eventual resistência bacteriana? Qual seria a reação periapical na presença de um antibiótico? Qual seria a toxicidade celular do antibiótico? O antibiótico sofreria interferência em seu mecanismo de ação pela presença da dentina? Os cimentos liberariam o antibiótico no sítio endodôntico mesmo após a reação de presa? Qual o efeito do antibiótico sobre a solubilidade, tempo de presa e escoamento do cimento?

Este estudo revelou que quando os cimentos MTA Fillapex, Endofill, Sealer e Sealapex são adicionados dos antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina, apresentam sua ação antibacteriana contra *E. faecalis* potencializada em ensaios *in vitro*. Esta ação antibacteriana foi revelada no cimento fresco após a espatulação e mesmo 60 dias após a reação de presa.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, P. V.; HUME, W. R.; PEARMAN, J. W. Antibiotics and endodontics. **Australian Dental J**, v. 35, 50–60, 1990.
- ALLEN, R. K.; NEWTON, C. W.; BROWN, C. E. A statistical analysis of surgical and nonsurgical endodontic retreatment cases. **J Endod**, v. 15, p. 261-266, 1989.
- AL-HEZAIMI, K.; AL-SHALAN, T. A.; HAGHSHBANDI, J.; OGLESBY, S.; SIMON, J. H. S.; ROTSTEIN, I. Antibacterial effect of two mineral trioxide aggregate (MTA) preparations against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus sanguis* in vitro. **J Endod**, v. 32, n. 11, p. 1053-1056, 2006.
- ASGARY, S.; KAMRANI, F. A. Antibacterial effects of five different root canal sealing materials. **Journal of Oral Science**, v. 50, n. 4, p. 469-474, 2008.
- ASSED, S. **Prevalência de microrganismos em canais radiculares de dentes humanos com reação periapical crônica. Efeito do preparo biomecânico e do curativo de demora. Imunofluorescência indireta e cultura.** Ribeirão Preto, 1993. 110 p. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-São Paulo.
- BAER, J.; MAKI, J. S. *In vitro* evaluation of the antimicrobial effect of three endodontic sealers mixed with amoxicillin. **J Endod**, v. 36, p. 1170-1173, 2010.
- ÇOBANKARA, F. K.; ALTINÖZ, H. C.; ERGANIS, O.; KAV, K.; BELLİ, S. In vitro antibacterial activities of root-canal sealers by using two different methods. **J Endod**, v. 30, n. 1, p. 57-60, 2004.
- BODRUMLU, E.; SEMİZ, M. Antibacterial activity of a new endodontic sealer against *Enterococcus faecalis*. **J Can Dent Assoc**, v. 72, p. 637-637c, 2006.
- DAHLEN, G.; SAMUELSSON, W.; MOLANDER, A.; REIT, C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. **Oral Microbiol Immunol**, v. 15, p. 309-312, 2000.
- ELDENİZ, A. U.; HADIMLI, H. H.; ATAĞLU, H.; ØRSTAVIK, D. Antibacterial effect of selected root-end filling materials. **J Endod**, v. 32, n. 4, p. 345-349, 2006.
- ESTRELA, C. et al. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. **J Appl Oral Sci**, v. 2, p. 29-36, 1994.
- EVANS, D. M. et al. Mechanism involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int Endod J**, v. 35, p. 221-228, 2002.
- FABRICIUS et al. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. **Scand J Dent Res**, v. 90, p. 200-206, 1982.

FRAGA, R. C.; SIQUEIRA JR, J. F.; DE UZEDA, M. In vitro evaluation of antibacterial effects of photo-cured glass ionomer liners and dentin bonding agents during setting. **J Prosthet Dent**, v. 76, 483–486, 1996.

FUSS, Z.; WEISS, E. I.; SHALHAV, M. Antibacterial activity of calcium hydroxide-containing endodontic sealers on *Enterococcus faecalis* in vitro. **Int Endod J**, v. 30, 397–402, 1997.

GOMES, B. P. F. A.; PEDROSO, J. A.; JACINTO, R. C.; VIANNA, M. E.; FERRAZ, C. C. R.; ZAIA, A. A.; SOUZA-FILHO, F. J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. **Braz Dent J**, v. 15, p. 30-35, 2004.

HARTKE, A.; GIARD, J. C.; LAPLACE, J. M.; AUFRAY, Y. Survival of *Enterococcus faecalis* in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis. **Appl Environ Microbiol**, v. 64, p. 4238-4245, 1998.

HENDRIKSA, J. G. E.; VAN HORNB, J. R.; VAN DER MEIA, H. C.; BUSSCHER, H. J. Backgrounds of antibiotic-loaded bone cement and prosthesis-related infection. **Biomaterials**, v. 25, p. 545-556, 2004.

HEPWORTH, M. J.; FRIEDMAN, S. Treatment outcome of surgical and non-surgical management of endodontic failures. **Journal of Canadian Dental Association**, v. 63, p. 364-371, 1997.

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

JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Clin Microbiol Rev**, v. 7, p. 462-478, 1994.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 20, p. 340-349, 1965.

KAYAOGLU, G.; ØRSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 15, p. 308-320, 2004.

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

KLEKAMP, J.; DAWSON, J. M.; HAAS, D. W.; de BOER, D.; CHRISTIE, M. The use of vancomycin and tobramycin in acrylic bone cement biomechanical effects and elution kinetics for use in joint arthroplasty. **J Arthroplasty**, v. 14, p. 339-346, 1999.

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

LEONARDO, M. R.; SILVA, L. A. B. da; TANOMARU-FILHO, M.; BONIFÁCIO, K. C.; ITO, I. Y. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. **J Endod**, v. 26, n. 7, p. 391-394, 2000.

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

MOHAMMADI, Z., ABBOTT, P. V. On the local applications of antibiotics and antibiotic based agents in endodontics and dental traumatology. **Int Endod J**, v. 42, 555–567, 2009.

MOLANDER, A.; REIT, C.; DAHLEN G.; KVIST, T. Microbiological status of rootfilled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**, v. 31, p. 1-7, 1998.

MORRISON, A. J. Jr; WENZEL, R. P.; Nosocomial urinary tract infections due to enterococcus. Ten years' experience at university hospital. **Arch Intern Med**, v. 146, p. 1549-1551, 1986.

NAIR, P. N. R. On the causes of persistente apical periodontitis: a review. **Int Endod J**, v. 39, p. 249-281, 2006.

NAIR, P. N. R.; HENRY, S.; CANO, V. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 99, p. 231-252, 2005.

OLAISON, L.; SCHADEWITZ, K. Enterococcal endocarditis in Sweden, 1995-1999: can shorter therapy with aminoglycosides be used? **Clin Infect Dis**, v. 34, p. 159-166, 2002.

PECIULIENE, V.; REYNAUD, A. H.; BALCIUNIENE, I.; HAAPASALO, M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. **Int Endod J**, v. 34, p. 429-434, 2001.

PINHEIRO, E. T.; GOMES, B. P. F. A.; DRUCKER, D .B.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUZA-FILHO, F .J. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. **Int Endod J**, v. 37, 756–763, 2004.

PINHEIRO, E. T.; GOMES, B. P. F. A.; FERRAZ, C. C. R.; TEIXEIRA, F. B.; ZAIA, A. A.; SOUZA-FILHO, F. J. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. **Oral Microbiol Immunol**, v. 18, 100–103, 2003.

PINHEIRO, E. T. **Estudo da microbiota de canais de dentes tratados endodônticamente associados à lesão periapicais e da suscetibilidade de *Enterococcus faecalis* a diferentes antimicrobianos.** Dissertação. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2005.

PINHEIRO, E. T. et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Int Endod J**, v. 36, p. 1-11, 2003.

PORTENIER, I.; WALTIMO, T. M. T.; HAAPASALO, M. *Enterococcus faecalis* – the root canal survivor and “star” in post-treatment disease. **Endodontics Topics**, v. 6, p. 135-159, 2003.

PUMAROLA, J.; BERASTEGUI, E.; BRAU, E.; CANALDA, C.; JIMENEZ DE ANTA, M. T. Antimicrobial activity of seven root canal sealers. Results of agar diffusion and agar dilution tests. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 74, 216–220, 1992.

QUEIROZ, A. M.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L. A. B.; ASSED, S.; SILVA, R. A. B.; ITO, I. Y. Antibacterial activity of root canal filling materials for primary teeth: zinc oxide and eugenol cement, Calen past thickened with zinc oxide, Sealapex and EndoREZ. **Braz Dent J**, v. 20, p. 290-296, 2009.

RIBEIRO, C. S.; SCELZA, M. F. Z.; HIRATA JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, L. M. B. de. The antimicrobial activity of gray-colored mineral trioxide aggregate (GMTA) and white-colored MTA (WMTA) under aerobic and anaerobic conditions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.109, n. 6, p. 109-112, 2010.

RICHARDS, M. J.; EDWARDS, J. R.; CULVER, D. H.; GAYNES, R. P. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United State. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 21; p. 510-515, 2000.

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA, J. F. JR.; SANTOS, K. R. N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J Endod**, v. 30, p. 315-320, 2003.

SAFAVI, K. E.; NICHOLS, F. C. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. **J Endod**, v. 20, p. 127-129, 1994.

SAFAVI, K. E.; NICHOLS, F. C. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. **J Endod**, v. 19, p. 76-78, 1993.

SEDGLEY, C. M.; LENNAN, S. L.; CLEWELL, B. D.; Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, p. 95-101, 2004.

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

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

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

TOBIAS, R. S. Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. **Int Endod J**, v. 21,155–160, 1988.

VERGIS, E. N.; HAYDEN, M. K.; CHOW, J. W.; SNYDMAN, D. R.; ZERVOS, M. J.; LINDEN, P. K.; WAGENER, M. M.; SCHMITT, B.; MUDER, R. R. Determinants of vancomycin resistance and mortality rates in enterococcal bacteremia. A prospective multicenter study. **Ann Intern Med**, v. 135, p. 484-492, 2001.

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

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

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

ZHANG, H.; SHEN, Y.; RUSE, N. D.; HAAPASALO, M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. **J Endod**, v. 35, n. 7, p. 1051-1055, 2009.