



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

FRANCISCA LÍVIA PARENTE VIANA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CIMENTOS OBTURADORES
ENDODÔNTICOS BIOCERÂMICOS FRENTE A *ENTEROCOCCUS FAECALIS* EM
BIOFILME – ESTUDO *IN VITRO*.**

FORTALEZA-CE

2019

FRANCISCA LÍVIA PARENTE VIANA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CIMENTOS OBTURADORES
ENDODÔNTICOS BIOCERÂMICOS FRENTE A *ENTEROCOCCUS FAECALIS* EM
BIOFILME – ESTUDO *IN VITRO*.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Carvalho de Vasconcelos.

Co-orientadora: Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos

FORTALEZA-CE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- V667a Viana, Francisca Livia Parente.
Atividade antimicrobiana de cimentos obturadores endodônticos biocerâmicos frente a *Enterococcus faecalis* em biofilme – estudo in vitro. / Francisca Livia Parente Viana. – 2019.
46 f.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Bruno Carvalho de Vasconcelos.
Coorientação: Profª. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos.
1. Endodontia. 2. Cimentos dentários. 3. Biofilmes. 4. *Enterococcus faecalis*. 5. Ação antimicrobiana. I.
Título.

CDD 617.6

FRANCISCA LÍVIA PARENTE VIANA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CIMENTOS OBTURADORES
ENDODÔNTICOS BIOCERÂMICOS FRENTE A *ENTEROCOCCUS FAECALIS* EM
BIOFILME – ESTUDO *IN VITRO*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em: 25/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bruno Carvalho de Vasconcelos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Monica Sampaio do Vale
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Elilton Cavalcante Pinheiro Júnior
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Dedico a Deus por confiar a mim esse grande desafio. À minha família por me apoiar nesta caminhada. Ao meu esposo pelo carinho e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a **Deus**, que em sua infinita bondade me deu forças para agir e vencer cada desafio desta caminhada, permitindo que eu ganhasse confiança em mim mesmo, acreditando na minha riqueza interior para que eu pudesse perceber que todo esse sonho se concretizaria.

A toda minha família, que sempre esteve ao meu lado e torceu pelo meu sucesso. Em especial aos meus pais, **João de Deus Viana** e **Sandra Maria Parente Viana**, por toda alegria, amor, carinho e apoio incondicional durante toda minha vida. As minhas irmãs, **Aline** e **Priscilla**, que amo muito e torcem pela minha felicidade. Aos meus sobrinhos, **João Gabriel** e **Maria Luiza**, pela alegria e paz transmitidas. Obrigado por acreditarem em meu potencial e me apoiarem sempre, vocês são a base de tudo, o que me torna ainda mais forte.

Ao meu esposo, **Marcelo Bonifácio da Silva Sampieri**, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, por dividir angústias e conquistas, por sempre me apoiar e incentivar. Obrigada por entender os momentos de ausência e sempre torcer pela minha realização profissional.

Em especial ao meu orientador, **Dr. Bruno Carvalho de Vasconcelos**, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e apoio. Obrigada pelos ensinamentos, dedicação e disponibilidade.

À minha co-orientadora, **Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin**, pela atenção, incentivo, apoio, conhecimento e disposição.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia por ter me proporcionado a realização do mestrado e por toda ajuda durante o decorrer do curso.

A minha dupla de pesquisa, **Amanda Mourão Ley**, pelo trabalho em conjunto desenvolvidos ao longo desta caminhada. Obrigada pelo apoio nos momentos difíceis e pelas palavras de incentivo.

Aos amigos de pós-graduação **Luciana Maria Arcanjo Frota**, **Bernardo Almeida de Aguiar**, **Maria Tayara Marques de Freitas**, **Nauyla Braga Mesquita** e todos os demais colegas do mestrado que somaram esforços nessa trajetória.

A servidora do laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*, **Ludimila Gomes Pinheiro**, que sempre esteve disponível para auxiliar durante a pesquisa laboratorial.

Por fim, agradeço aos demais amigos que de certa forma contribuíram na minha caminhada até aqui.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana de três cimentos obturadores endodônticos biocerâmicos contra biofilmes de duas cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 e ATCC 4083), comparando-os a um cimento resinoso. Foram avaliados os cimentos biocerâmicos BioRoot RCS, Bio-C Sealer e Sealer Plus BC e um cimento a base de resina epóxi-amina (AH Plus), empregado como padrão. Foram realizados testes de atividade antimicrobiana por contato direto e indireto. Para o teste por contato direto, os cimentos frescos foram aplicados sobre membranas de nitrocelulose (poros de 0,22 µm de tamanho e 13 mm de diâmetro) com biofilmes de *E. faecalis* crescidos por 48 horas. Para o teste por contato indireto, foram interpostas membranas de nitrocelulose estéreis entre os cimentos e as membranas com os biofilmes crescidos. O tempo de contato em ambas as condições foi de 30 minutos. Foi preparado grupo-controle negativo, nos quais os biofilmes não foram expostos a nenhum material. Após o tempo de contato, os cimentos foram removidos, e as membranas com os biofilmes transferidas para um frasco com solução salina estéril. Após uma série de diluições, a sobrevivência bacteriana foi determinada pela cultura bacteriana de cada diluição em placa com ágar BHI. As unidades formadoras de colônias foram contadas após incubação por 24 horas a 37° C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três ocasiões distintas. Para análise estatística foram empregados os testes de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls, ambos com significância estabelecida em 5,0%. Os resultados encontrados demonstraram atividade antimicrobiana dos cimentos Bio-C Sealer, Sealer Plus BC e BioRoot RCS, quando em condição de contato direto, que se apresentaram estatisticamente diferentes do grupo-controle ($P < 0,05$). Já em condição de contato indireto, apenas os cimentos Sealer Plus BC e AH Plus apresentaram diferença significativa ante ao controle ($P < 0,05$). Em função do exposto, considerando as condições do estudo, pôde-se concluir que os cimentos à base de biocerâmicas apresentaram ação antimicrobiana frente a biofilmes das duas cepas de *E. faecalis* testadas quando em condição de contato direto, todavia, apenas o cimento Sealer Plus BC foi efetivo quando em contato indireto.

Palavras-chave: Endodontia, Cimentos dentários, Biofilmes, *Enterococcus faecalis*, Ação antimicrobiana.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the antimicrobial activity of three bioceramic endodontic sealers against biofilms of two *Enterococcus faecalis* strains (ATCC 29212 and ATCC 4083), comparing them to a resin sealer. BioRoot RCS, Bio-C Sealer and Sealer Plus BC bioceramic sealers and an epoxy-amine resin (AH Plus) sealer, used as standard, were evaluated. Antimicrobial activity tests were performed by direct and indirect contact. For the direct contact test the fresh sealers were applied to nitrocellulose membranes (pores 0.22 µm in size and 13 mm in diameter) with *E. faecalis* biofilms grown for 48 hours. For the indirect contact test, sterile nitrocellulose membranes were interposed between the sealer and the membranes with the grown biofilms. The contact time in both conditions was 30 minutes. In all the tests a control group was prepared, in which the biofilm was not exposed to any material. After the time of contact the sealers were removed and the membranes with the biofilms transferred to a flask with sterile saline solution. A series of dilutions was performed and the bacterial survival was determined by the bacterial culture of each dilution using a plate with BHI agar. The colony forming units were counted after incubation for 24 hours at 37 ° C. All assays were performed in triplicate on three different occasions. For statistical analysis, the Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keuls tests were used, both with a significance of 5.0%. The results showed an antimicrobial activity of Bio-C Sealer, Sealer Plus BC and BioRoot RCS sealers, when in direct contact conditions, which were statistically different from the control group ($P < 0.05$). In the condition of indirect contact only Sealer Plus BC and AH Plus showed significant difference from the control group ($P < 0.05$). Considering of the above, and the conditions of the study, it was concluded that the bioceramic sealers presented antimicrobial action against bacterial biofilms of the two strains of *E. faecalis* tested when in direct contact condition, however, only sealer Sealer Plus BC was effective when in indirect contact.

Key words: Endodontics, Dental cements, Biofilms, *Enterococcus faecalis*, Antimicrobial action.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. HIPÓTESES.....	17
3.1 Hipótese nula	17
3.2 Hipótese alternativa	17
4. CAPÍTULO	18
4.1 Capítulo 1	18
5. CONCLUSÃO GERAL	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXO A – NORMAS PARA SUBMISSÃO NO JOURNAL OF ENDODONTICS.....	40

1. INTRODUÇÃO GERAL

O tratamento endodôntico tem por objetivo a máxima redução dos micro-organismos e seus subprodutos do interior dos canais radiculares e suas ramificações, a fim de evitar uma reinfecção subsequente. O preparo químico-mecânico e o uso de medicações intracanal reduzem significativamente o número de micro-organismos no interior dos canais radiculares, no entanto, é praticamente impossível sua completa eliminação em todos os casos (KAPRALOS *et al.*, 2018). Foi relatado que cerca de 35% da área do canal radicular é deixada intocada quando instrumentos rotatórios ou convencionais são utilizados (PETERS; SCHONENBERGER; LAIB, 2001). Assim, bactérias permanecem no sistema de canais radiculares (SCR) mesmo após o término do tratamento endodôntico, podendo afetar o reparo periapical (WALTIMO *et al.*, 2005; VERA *et al.*, 2012; KAPRALOS *et al.*, 2018). Casos clínicos aparentemente bem realizados que incorreram em fracasso têm sido associados, na maioria das vezes, a fatores microbianos (SIQUEIRA JR; ROÇAS, 2008). Fatores como a existência de interações microbianas, a expressão de fatores de virulência em número suficiente para causar lesão perirradicular, a localização estratégica dos micro-organismos no canal radicular, o microambiente endodôntico favorável, as defesas do hospedeiro que, ao mesmo tempo que tentam conter a infecção, acabam por produzir dano tecidual associado à lesão perirradicular, favorecem a persistência de infecção (SIQUEIRA JR; ROÇAS, 2008; RICUCCI; SIQUEIRA JR, 2008).

Alguns micro-organismos se aglomeram em biofilmes no SCR infectado, o que os deixam intrinsecamente mais resistentes aos antimicrobianos do que suas contrapartes planctônicas (UPADYA *et al.*, 2010). Uma das principais causas de falha no tratamento endodôntico é a infecção persistente (LOPES; SIQUEIRA JR, 2015). O *Enterococcus faecalis*, ou simplesmente *E. faecalis*, é frequentemente detectado nesse tipo de infecção e, além dele, os *Streptococcus* e *Staphylococcus spp.* (ANTUNES *et al.*, 2015). O *E. faecalis* foi relatado como o micro-organismo mais prevalente em canais radiculares infectados em casos de retratamento endodôntico com a presença de periodontite apical. Sua prevalência varia entre 24% e 77% (STUART *et al.*, 2006; ALSHWAIMI *et al.*, 2016). Ele tem a capacidade de resistir a elevados valores de pH mediados pelo hidróxido de cálcio quando empregado como medicação intracanal (EVANS *et al.*, 2002). Além disso, pode invadir profundamente os túbulos dentinários, os quais lhe permitem sobreviver à ação dos instrumentos, irrigantes e medicamentos utilizados durante o tratamento endodôntico (SUNDQVIST, 1992; ALSHWAIMI *et al.*, 2016). Adicionalmente, o *E. faecalis* tem a capacidade de entrar num

estado viável, mas não cultivável, quando exposto a condições ambientais desfavoráveis. Nessas condições, apesar da incapacidade de crescer, essas bactérias mantêm sua viabilidade e patogenicidade, possuindo a capacidade de recolonizar o SCR quando condições ideais são retomadas (SIQUEIRA JR, 2011). A aptidão para causar monoinfecção e sobreviver a longos períodos de privação nutricional, sem depender de nutrientes derivados do metabolismo de outras bactérias, é outra característica do *E. faecalis* (FIGDOR; DAVIES; SUNDQVIST, 2003). Todos esses aspectos ajudam a explicar a elevada prevalência desse micro-organismo nos casos de insucesso endodôntico.

Uma vez que a presença do *E. faecalis* está associada a infecções de dentes com periodontite apical, essa espécie tem sido utilizada em várias investigações sobre os efeitos antibacterianos dos procedimentos, materiais e substâncias utilizados no tratamento endodôntico (BARROS, 2013). A cepa de *E. faecalis* mais utilizada nos estudos *in vitro* é a ATCC 29212, com origem no trato geniturinário (SHAKYA *et al.*, 2016; JAFARI *et al.*, 2016; KANGARLOU *et al.*, 2016; COLLARES *et al.*, 2017; CHENG *et al.*, 2017). No entanto, a utilização de cepas isoladas do ambiente de interesse é fortemente recomendada para investigações dessa natureza, apesar de nem sempre os estudos incluírem estirpes clínicas. Barros *et al.* (2014) verificaram que existem diferenças nos padrões globais de suscetibilidade das cepas, o que dá ênfase à necessidade do uso de diferentes cepas clínicas implicadas em infecções, alvo de estudos.

Os cimentos endodônticos têm uma importante função no controle da infecção endodôntica, uma vez que são os responsáveis por sepultar as bactérias residuais nos túbulos dentinários e prevenir a entrada de fluidos ou novas bactérias nos canais radiculares (KAPRALOS *et al.*, 2018). A escolha de um cimento endodôntico com substancial atividade antimicrobiana pode ter a capacidade de reduzir a contagem de micro-organismos remanescentes, particularmente, em casos de necrose pulpar e periodontite apical (BARROS *et al.*, 2014). Lopes e Siqueira Jr (2015) enumeraram vários requisitos e características de um cimento endodôntico ideal, entre eles destacam-se: apresentar efeito antimicrobiano, promover um selamento hermético e ser biocompatível apresentam especial destaque. Características como apresentar boa adesão às paredes do canal, facilidade de manipulação e de remoção do canal radicular, radiopacidade e não provocar a alteração de cor do elemento dentário também são apontadas. Materiais seladores com essas propriedades podem favorecer o processo de sanificação, prevenindo a entrada ou saída de micro-organismos do SCR, melhorando as taxas de sucesso do tratamento endodôntico.

Um dos cimentos endodônticos mais amplamente utilizados atualmente é o AH Plus (Dentsply/De Trey GmbH, Konstanz, Alemanha), um cimento obturador à base de resina epóxi-amina com propriedades físico-químicas adequadas apresentado na forma de pasta/pasta. Exibe propriedades de selamento de longa duração, grande estabilidade dimensional (VERSIANI *et al.*, 2006; RESENDE *et al.*, 2009) e propriedades autoadesivas (SCHÄFER; ZANDBIGLARI, 2003; VERSIANI *et al.*, 2006). Também apresenta baixa solubilidade, adequada radiopacidade e leve expansão (RESENDE *et al.*, 2009), além de possuir ação antimicrobiana (CANDEIRO *et al.*, 2016; KAPRALOS *et al.*, 2018) e propriedades biológicas adequadas (ØRSTAVIK, 2005; VERSIANI *et al.*, 2006; RESENDE *et al.*, 2009; GARRIDO *et al.*, 2010). Em função de suas propriedades físico-químicas e biológicas, ele tem sido considerado o “padrão ouro” entre os cimentos (DE ALMEIDA *et al.*, 2000), assim, sendo sugerida sua comparação a novos materiais que venham a ser desenvolvidos.

Atualmente, vêm sendo comercializados cimentos endodônticos biocerâmicos. Esses cimentos têm como base silicatos e/ou fosfato de cálcio, o que atraiu considerável atenção por causa de suas propriedades físico-químicas e biológicas. Existem duas grandes vantagens associadas ao uso de materiais biocerâmicos: sua biocompatibilidade, o que impede a rejeição pelos tecidos periapicais; e a presença de fosfato de cálcio, estrutura cristalina semelhante à hidroxiapatita, capaz de melhorar a ligação físico-química entre o cimento e a dentina radicular (AL-HADDAD; AZIZ, 2016). Devido às suas excelentes propriedades, diversos produtos dessa natureza estão sendo lançados no mercado.

Recentemente, o cimento biocerâmico Bio-C Sealer (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil) foi lançado. Ele é preparado à base de silicatos de cálcio, sendo apresentado na forma de pasta pronta para uso, contida em uma bisnaga única para ser injetada no interior dos canais radiculares. Segundo o fabricante, esse cimento apresenta ação antibacteriana e bacteriostática devido à sua alta alcalinidade (pH 12,5); possui alta radiopacidade e não sofre contração ao tomar presa. Por ser um cimento endodôntico recém-lançado, até o presente não se encontram disponíveis na literatura estudos acerca de suas propriedades antimicrobianas.

Outro material recentemente introduzido no mercado, tendo como base o dissilicato e trissilicato de cálcio nanoparticulado, foi o Sealer Plus BC (MK Life Medical and Dental Products, Porto Alegre, RS, Brasil), apresentado em bisnaga pronto para uso. De acordo com o fabricante, esse cimento apresenta bioatividade, atividade bactericida (pH 12), adesão química à estrutura dental e apresenta expansão higroscópica, quando de sua presa (expande 0,2%),

vedando totalmente o canal. Apesar de recente, já apresenta avaliação disponível, nela, Mendes *et al.* (2018) observaram maior liberação de íons cálcio e pH por parte do Sealer Plus BC do que do cimento AH Plus. No mesmo estudo observaram menores valores de tempo de presa, escoamento e radiopacidade para o cimento biocerâmico quando comparados com o AH Plus.

Outro cimento biocerâmico disponível atualmente é o BioRoot RCS (Septodont, Saint Maur-des-Fosses, França), selador produzido com base no silicato tricálcico, apresentado na forma pó/líquido. De acordo com o fabricante, possui uma excelente adesividade, mantém o processo de vedação na presença de umidade, não mancha os dentes e possui grande fluidez. Além disso é radiopaco (SIBONI *et al.*, 2017), apresenta-se biocompatível (CAMPS *et al.*, 2015; SIBONI *et al.*, 2017), podendo induzir deposição de tecido duro (DIMITROVA-NAKOV *et al.*, 2015; PRÜLLAGE *et al.*, 2016; SIBONI *et al.*, 2017) e possui atividade antimicrobiana (ARIAS-MOLIZ; CAMILLERI, 2016).

Diversos estudos *in vitro* dedicaram-se a investigar a atividade antimicrobiana de cimentos obturadores endodônticos utilizando os mais variados métodos, a maioria deles incluem o teste de difusão em ágar (TDA) e o teste de contato direto (TCD) (LEONARDO *et al.*, 2000; KAYAOGU *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2009; ALSHWAIMI *et al.*, 2016; LOVATO *et al.*, 2011; CHENG *et al.*, 2017; COLLARES *et al.*, 2017; KAPRALOS *et al.*, 2018). Embora tanto TDA como TCD avaliem atividade antimicrobiana, o TCD demonstrou ser um teste quantitativo mais confiável e reproduzível, capaz de mostrar a atividade de componentes antibacterianos insolúveis (NAWAL *et al.*, 2011; ALSHWAIMI *et al.*, 2016). Esse teste consiste em um dos principais métodos de comparação dessa propriedade entre materiais endodônticos. Ele é capaz de simular o contato direto entre o material e os microrganismos em estudo, independentemente da solubilidade e difusão dos componentes antimicrobianos dos cimentos (WEISS; SHALHAV; FUSS, 1996). Zhang *et al.* (2009) propuseram uma alteração do método para a determinação do efeito bactericida, calculando-se as bactérias sobreviventes por meio da cultura bacteriana pelo método de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) após diferentes períodos de tempo de contato com o material. A informação sobre o efeito bactericida é clinicamente mais pertinente porque as bactérias residuais, que são inibidas pelo agente antimicrobiano, podem crescer novamente quando os efeitos inibitórios cessam (BARROS *et al.*, 2014). Seguindo o mesmo raciocínio, encontram-se na literatura estudos que sugerem o teste do contato indireto que buscava simular a inacessibilidade do cimento endodôntico aos micro-organismos diante de alguns fatores que dificultam esse

contato, testando a capacidade de penetração dos componentes antimicrobianos desses cimentos frente a uma barreira física (BARROS *et al.*, 2014).

Diante do exposto, torna-se evidente a importância da avaliação da capacidade antimicrobiana de materiais obturadores endodônticos, principalmente os mais recentemente desenvolvidos que têm chamado atenção da comunidade científica e dos especialistas. Em uma revisão sistemática, Zhang, Du e Peng (2015) relataram uma forte correlação de *E. faecalis* e infecções intrarradiculares persistentes em comparação com infecções primárias ou periodontite periapical crônica não tratadas. Desta forma, a relação dos materiais, principalmente os biocerâmicos que notadamente apresentam boas propriedades antimicrobianas, e estes microrganismos precisa ser estudada.

2. OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

- Avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana de cimentos obturadores endodônticos biocerâmicos contra biofilmes de *Enterococcus faecalis*.

2.2- Objetivos Específicos

- Avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana dos cimentos biocerâmicos Bio-C Sealer (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil), Sealer Plus BC (MK Life Medical and Dental Products, Porto Alegre, RS, Brasil) e BioRoot RCS (Septodont, Saint Maur-des-Fosses, França), comparando-os ao AH Plus (Dentsply/De Trey GmbH, Konstanz, Alemanha) e ao controle, quando em contato direto com biofilmes de *E. faecalis* (ATCC 29212 e ATCC 4083).

- Avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana dos mesmos materiais, quando em contato indireto com biofilmes de *E. faecalis* (ATCC 29212 e ATCC 4083).

3 HIPÓTESES

3.1 Hipótese Nula

Foi considerada como hipótese nula deste trabalho que os cimentos obturadores endodônticos biocerâmicos Bio-C Sealer, Sealer Plus BC e BioRoot RCS apresentaram ação antimicrobiana semelhantes entre si e ao cimento AH Plus e grupo-controle, contra os biofilmes formados das duas cepas de *Enterococcus faecalis*, independente do regime de contato.

3.2 Hipótese Alternativa

A hipótese alternativa deste trabalho foi que os cimentos obturadores endodônticos biocerâmicos testados tiveram ação antimicrobiana superior à do cimento AH Plus e a do grupo-controle contra os biofilmes formados das duas cepas de *Enterococcus faecalis*, em ambos os regimes de contato. Ainda, haverá diferença entre os cimentos avaliados e entre as cepas bacterianas empregadas.

4. CAPÍTULO

Esta Dissertação está baseada no Artigo 46, do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para trabalhos de conclusão de Mestrado e Doutorado (Dissertações e Teses) e permite a inserção de artigo(s) científico(s) de autoria ou coautoria do candidato.

Desta forma, a presente Dissertação é composta por um artigo científico redigido de acordo com as normas estabelecidas pela revista científica escolhida.

4.1 Capítulo 1

“Atividade Antimicrobiana de Cimentos Obturadores Endodônticos Biocerâmicos Frente a *Enterococcus faecalis* em Biofilme: Estudo *in vitro*” com título sugerido em Inglês
“Antimicrobial Activity of Bioceramic Endodontic Sealers Against *Enterococcus faecalis* in Biofilm: *in vitro* Study”

Este artigo seguiu as normas de publicação do periódico - *Journal of Endodontics* (ISSN 0099-2399).

Página de Título

Atividade Antimicrobiana de Cimentos Obturadores Endodônticos Biocerâmicos Frente a *Enterococcus faecalis* em Biofilme: Estudo *in vitro*.

Francisca Lívia Parente Viana DDS¹, Amanda Mourão Ley DDS¹, Iriana Carla Junqueira Zanin DDS, MSc, PhD^{1,2}, Bruno Carvalho de Vasconcelos DDS, MSc, PhD^{1,2}

¹ Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

² Curso de Odontologia de Sobral, Universidade Federal do Ceará, *Campus Sobral*, Sobral, CE, Brasil.

Palavras-chaves: Endodontia, Cimentos dentários, Biofilme bacteriano, *Enterococcus faecalis*, Ação antimicrobiana.

Título reduzido: Atividade antimicrobiana e Biocerâmicos.

Autor de correspondência:

Bruno Carvalho de Vasconcelos, DDS, MSc, PhD

Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

Rua Monsenhor Furtado 1273, Rodolfo Teófilo

CEP: 60430-355, Fortaleza, CE, Brasil

Email: bcv@ufc.br

RESUMO

Introdução: Avaliou-se, *in vitro*, a atividade antimicrobiana de quatro cimentos obturadores endodônticos contra biofilmes de duas cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCCs 29212 e 4083).

Métodos: Foram avaliados os cimentos biocerâmicos BioRoot RCS, Sealer Plus BC, Bio-C Sealer e o cimento resinoso AH Plus. Foi realizado teste por contato direto, no qual os cimentos foram aplicados sobre membranas de nitrocelulose contendo biofilmes de *E. faecalis*; para o contato indireto, foram interpostas membranas estéreis entre os cimentos e os biofilmes. Grupo-controle foi preparado empregando membrana com biofilme formado sem contato com qualquer material. Decorridos 30 minutos de exposição os cimentos foram removidos e as membranas transferidas para um frasco com solução salina estéril. Após uma série de diluições, a sobrevivência bacteriana foi determinada pela contagem de unidades formadoras de colônias após incubação por 24 horas a 37° C. Foram empregados os testes de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls com significância estabelecida em 5,0%. **Resultados:** De maneira geral, os resultados encontrados demonstraram atividade antimicrobiana para os cimentos, tendo os cimentos Bio-C Sealer, Sealer Plus BC e BioRoot RCS, quando em condição de contato direto, apresentando-se estatisticamente superiores ao controle ($P < 0,05$). Quando do contato indireto, apenas os cimentos Sealer Plus BC e AH Plus apresentaram diferença significativa ante ao controle ($P < 0,05$). **Conclusão:** Os cimentos à base de biocerâmicas apresentam ação antimicrobiana frente a biofilmes bacterianos das duas cepas de *E. faecalis* testadas quando em condição de contato direto, todavia, destes, apenas o cimento Sealer Plus BC apresentou ação significativa, quando em contato indireto.

Palavras-chave: Endodontia, Cimentos dentários, Biofilme bacteriano, *Enterococcus faecalis*, Ação antibacteriana.

INTRODUÇÃO

Alguns micro-organismos se aglomeram em biofilmes no sistema de canais radiculares (SCR) infectados, o que os deixam intrinsecamente mais resistentes aos antimicrobianos do que suas contrapartes planctônicas (1). Dentre estes, o *E. faecalis* é o microrganismo mais prevalente em canais radiculares infectados em casos de retratamento de periodontite apical, com prevalência entre 24% a 77% (2,3). Essa prevalência advém de sua capacidade de resistir a elevados valores de pH (4) e invadir profundamente os túbulos dentinários, característica que lhe permite sobreviver à ação dos instrumentos, irrigantes e medicamentos utilizados durante o tratamento endodôntico (3). Adicionalmente, o *E. faecalis* tem capacidade de entrar num estado viável, mas não cultivável, quando exposto a condições ambientais desfavoráveis, mantendo sua viabilidade e patogenicidade, possuindo a capacidade de recolonizar o SCR quando condições ideais são retomadas (5). Ainda, possui aptidão para causar monoinfecção e sobreviver a longos períodos de privação nutricional sem depender de nutrientes derivados do metabolismo de outras bactérias (6). Todos esses aspectos ajudam a explicar a elevada prevalência desse micro-organismo nos casos de insucesso do tratamento endodôntico.

Uma vez que a presença do *E. faecalis* está associada a infecções endodônticas persistentes, essa espécie tem sido utilizada em várias investigações sobre os efeitos antibacterianos dos procedimentos, materiais e substâncias utilizados no tratamento endodôntico (7). Vários estudos *in vitro* investigaram a atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos utilizando os mais variados métodos, a maioria deles incluem o teste de difusão em ágar (8,9) e o teste de contato direto (TCD) (3,9-11). No entanto, o TCD demonstrou ser um teste quantitativo mais confiável e reprodutível, capaz de evidenciar a atividade de componentes antibacterianos insolúveis por simular o contato direto entre o material e os microrganismos em estudo, independentemente da solubilidade e difusão dos componentes antimicrobianos dos cimentos (3,12). No entanto, em condição clínica, alguns fatores podem impedir o contato entre o cimento e as bactérias residuais, como a presença de smear layer ou de tecido dentinário. Neste sentido, para simular tal condição, sugeriu-se o teste de contato indireto por meio da restrição de contato no qual uma membrana é colocada entre o cimento e o biofilme, objetivando verificar a capacidade de penetração dos componentes antimicrobianos desses cimentos frente a uma barreira física (7). No entanto, existem poucos estudos que abordem a ação antimicrobiana dos cimentos endodônticos utilizando essa metodologia.

Os cimentos endodônticos têm uma importante função no controle da infecção endodôntica, uma vez que são os responsáveis por sepultar as bactérias residuais nos túbulos

dentinários e prevenir a entrada de fluidos ou novas bactérias nos canais radiculares (11). Um dos cimentos endodônticos mais amplamente utilizado ainda é o AH Plus (Dentsply/De Trey GmbH, Konstanz, Alemanha), um cimento obturador à base de resina epóxi-amina que apresenta propriedades de selamento de longa duração, grande estabilidade dimensional (13,14) e propriedades autoadesivas (13). Também apresenta baixa solubilidade, adequada radiopacidade e expansão durante a presa (14), além de possuir ação antimicrobiana (11,15) e propriedades biológicas adequadas (14,16). Devido às suas propriedades físico-química e biológicas o AH Plus tem sido considerado o “padrão ouro” entre os cimentos disponíveis (17), assim, sendo sugerida sua comparação a novos materiais que venham a ser desenvolvidos.

Atualmente, vêm sendo comercializados cimentos endodônticos com base em biocerâmicas. Esses cimentos têm como base silicatos e/ou fosfato de cálcio, o que atraiu considerável atenção por causa de suas propriedades físico-químicas e biológicas. Existem duas grandes vantagens associadas ao uso de materiais biocerâmicos: sua biocompatibilidade, o que impede a rejeição pelos tecidos periapicais; e a presença do fosfato de cálcio, por meio da qual forma-se uma estrutura cristalina semelhante à hidroxiapatita capaz de melhorar a ligação físico-química entre o cimento e a dentina radicular (18). Devido às suas excelentes propriedades, diversos produtos vêm sendo lançados no mercado.

Recentemente, o cimento biocerâmico Bio-C Sealer (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil) foi lançado. Ele é preparado à base de silicatos de cálcio, sendo apresentado na forma de pasta pronta para uso, contida em uma bisnaga única para ser injetada no interior dos canais radiculares. Segundo o fabricante, esse cimento apresenta ação antibacteriana e bacteriostática devido à sua alta alcalinidade (pH 12,5); possui alta radiopacidade e não sofre contração de presa. Por ser um cimento endodôntico recém-lançado, até o presente, não se encontram disponíveis na literatura estudos acerca de suas propriedades antimicrobianas.

Outro material recentemente introduzido no mercado tendo como base o dissilicato e trissilicato de cálcio nanoparticulado foi o Sealer Plus BC (MK Life Medical and Dental Products, Porto Alegre, RS, Brasil), apresentado em bisnaga pronto para uso. De acordo com o fabricante, esse cimento apresenta bioatividade, atividade bactericida (pH 12), adesão química à estrutura dental e apresenta expansão higroscópica quando de sua presa (expande 0,2%) vedando totalmente o canal. Apesar de recente, já apresenta avaliação disponível, nela, Mendes *et al.* (19) observaram maior liberação de íons cálcio e pH por parte do Sealer Plus BC do que do cimento AH Plus. No mesmo estudo, menores valores de tempo de presa, escoamento e

radiopacidade foram observados para o cimento biocerâmico quando comparados com o AH Plus.

Outro cimento biocerâmico disponível é o BioRoot RCS (Septodont, Saint Maur-des-Fosses, França), selador biocerâmico de canais radiculares com base no silicato tricálcico, apresentado na forma de pó/líquido. De acordo com o fabricante, possui uma excelente adesividade, mantém o processo de vedação na presença de umidade, não mancha os dentes, possui grande fluidez e é radiopaco (20). Além disso apresenta-se biocompatível (20,21), podendo induzir deposição de tecido duro (20,22) e possui atividade antimicrobiana (23).

Apesar das boas propriedades biológicas, torna-se evidente a importância da avaliação da capacidade antimicrobiana por parte de materiais obturadores endodônticos biocerâmicos, principalmente os mais recentemente desenvolvidos, frente a biofilmes de micro-organismos comumente encontrados no sistema de canais radiculares. Assim, tem-se o objetivo de avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana dos cimentos biocerâmicos BioRoot RCS, Sealer Plus BC, Bio-C Sealer, comparando-as a do cimento resinoso AH Plus contra biofilmes de duas cepas de *Enterococcus faecalis*. Considerar-se-á como hipótese nula que os cimentos obturadores endodônticos biocerâmicos não apresentarão diferenças de ação antimicrobiana entre si e em relação ao cimento AH Plus ou em função da variação da cepa microbiana.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cimentos endodônticos

Foram utilizados os cimentos obturadores biocerâmicos Bio-C Sealer (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil), Sealer Plus BC (MK Life Medical and Dental Products, Porto Alegre, RS, Brasil) e BioRoot RCS (Septodont, Saint Maur-des-Fosses, França), e o resinoso AH Plus (Dentsply/De Trey GmbH Konstanz, Alemanha), empregado como referência padrão; suas composições encontram-se descritas na Tabela 1. Os cimentos que necessitavam de manipulação foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes; os cimentos Bio-C Sealer e Sealer Plus BC apresentados na forma pronta para uso, receberam 30 µL de água destilada como forma de garantir a umidade necessária para sua presa (24).

Micro-organismos

Foram utilizadas duas cepas de bactérias gram-positivas e facultativas de *Enterococcus faecalis*: ATCC 29212 (cepa isolada do trato geniturinário) e ATCC 4083 (cepa isolada de canal radicular de dente necrosado). Os estoques bacterianos foram conservados em meio Brain Heart Infusion (BHI; Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) com glicerol a 20% em freezer -80° C. Para reativá-las foram realizados repiques para viabilização das cepas bacterianas. Foram inoculados 200 µL de cada cepa em frascos contendo 10 mL de caldo BHI, em duplicata e incubados à 37° C por 18 horas. A pureza da cultura foi verificada e o inóculo bacteriano foi padronizado para uma densidade óptica de 0,1 (620 nm), para uma turbidez equivalente a um crescimento de 1-2 x 10⁸ UFC/mL.

Atividade antimicrobiana sobre biofilmes formados em membrana – Teste de Contato Direto e Indireto

A formação de biofilmes foi induzida em membranas de nitrato de celulose de 13 mm de diâmetro e poros de 0,22 µm (Merck Millipore Ltd, Tullagreen, Cork, Islândia). As membranas foram colocadas sobre a superfície de placas petri contendo ágar BHI. Em seguida, alíquotas de 40 µL da suspensão bacteriana foram aplicadas às superfícies das membranas e as placas armazenadas durante 48 horas a 37° C.

Para o teste de contato direto material/biofilme, 0,15 g de cimento fresco foi colocado sobre o biofilme formado sobre as membranas. No contato indireto, antes da aplicação do cimento, foi posicionada uma nova membrana de nitrato de celulose estéril sobre os biofilmes formados e o cimento endodôntico foi aplicado sobre a mesma, ou seja, membrana de nitrocelulose foi interposta entre o biofilme e o cimento. Foram utilizadas três membranas para cada cimento, com três repetições em ocasiões distintas. O tempo de contato para ambos os testes foi de 30 minutos a 37° C (7). Após o período de contato, o cimento foi removido da superfície da membrana no contato direto. No contato indireto, a membrana de celulose com o cimento foi descartada. Em ambas as condições de contato, grupos-controle foram preparados utilizando uma membrana com biofilme formado sem qualquer contato com os materiais. As membranas foram transferidas para um frasco contendo 2 mL de solução salina estéril que foram levemente agitados para remover células fracamente aderidas. Em seguida foram transferidas para outro frasco contendo 2 mL de solução salina e agitados por vórtex durante 1 minuto (30 s + 15 s + 15 s) intercalado em banho de gelo. Foi realizada uma série de dez

diluições em solução salina e alíquotas de 10 µL de cada diluição foram plaqueadas em ágar BHI. As unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas após incubação por 24 horas a 37° C.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de ambas as avaliações foram tabulados e submetidos ao teste Shapiro-Wilks para determinação de sua normalidade, o qual apontou natureza não paramétrica. Desta forma, foram empregados a análise de variância de Kruskal-Wallis e o teste de comparações de Student-Newman-Keuls para análise entre os diferentes cimentos e o teste de Mann-Whitney na análise de cada cimento na comparação entre as cepas, todos com significância estabelecida em 5,0%.

RESULTADOS

A Tabela 2 apresenta os dados (mediana, valores mínimos e máximos) relativos à capacidade antimicrobiana ante os biofilmes das duas cepas de *E. Faecalis* oferecidos pelos cimentos quando em condição de contato direto. Os resultados obtidos demonstraram que todos os cimentos promoveram alguma redução das contagens bacterianas dos biofilmes de *E. faecalis*, todavia, nem todos apresentaram diferenças significantes em comparação com o grupo-controle. Os cimentos Bio-C Sealer, Sealer Plus BC e BioRoot RCS apresentaram ação significativamente maior que o grupo-controle ($P<0,05$); ainda, os cimentos Bio-C Sealer e BioRoot RCS apresentaram diferença significativa ante ao AH Plus, considerando a cepa com origem no trato geniturinário e o Bio-C Sealer quando considerada a cepa isolada de canal radicular ($P<0,05$).

Em relação ao contato indireto, as medianas, valores mínimos e máximos da atividade antimicrobiana encontram-se descritos na Tabela 3. Os cimentos Bio-C Sealer e Sealer Plus BC demonstraram ação significativamente maior que o grupo-controle contra o biofilme da cepa 29212, e os cimentos Sealer Plus BC e AH Plus contra o biofilme da cepa 4083 ($P<0,05$). Nesta condição apenas o cimento Sealer Plus BC ofereceu ação maior que o AH Plus contra o biofilme da cepa 29212 ($P<0,05$); não foram encontradas diferenças ante ao AH Plus quando o biofilme foi formado com a cepa 4083.

Comparando-se os resultados oferecidos pelos cimentos dentro das mesmas condições, variando-se as cepas, a análise estatística não encontrou diferença significativa nas comparações dos cimentos biocerâmicos ($P>0,05$), no entanto, o cimento AH Plus apresentou uma ação significativamente maior contra a cepa 4083 em ambas as condições de contato ($P<0,05$).

DISCUSSÃO

O uso de materiais obturadores com atividade antimicrobiana é essencial no auxílio à eliminação de micro-organismos que possam ter permanecido no interior dos canais radiculares após o tratamento endodôntico, seja por sua capacidade de matar células bacterianas e/ou por perturbar a biomassa do biofilme (7). Devido a isso, a proposta do presente estudo foi avaliar a ação antibiofilme dos cimentos obturadores endodônticos Bio-C Sealer, Sealer Plus BC, BioRoot RCS, cimentos desenvolvidos com a proposta de serem mais biológicos que têm chamado atenção do mercado e da comunidade científica. Comparou-se suas atividades a do AH Plus e a um controle por meio do teste de contato direto e indireto com biofilmes monoespécie formados de duas cepas de *Enterococcus faecalis*. Considerando os resultados encontrados, rejeitou-se a hipótese nula inicialmente sugerida, uma vez que alguns cimentos biocerâmicos apresentaram ação antimicrobiana diferente entre si e superiores a do cimento AH Plus e ao grupo-controle.

O *E. faecalis* é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, normalmente associada a infecções persistentes em dentes com periodontite apical. Devido a isso, essa espécie tem sido amplamente utilizada em investigações sobre os efeitos antibacterianos dos procedimentos, materiais e substâncias utilizados no tratamento endodôntico (7,9-11). A cepa de *E. faecalis* mais utilizada nos estudos *in vitro* é a ATCC 29212, com origem no trato geniturinário (8-10,25,26), no entanto, a utilização de cepas isoladas do ambiente endodôntico é fortemente recomendada para investigações desta natureza, visto que alguns autores sugerem a existência de diferenças nos padrões globais de suscetibilidade entre as cepas (7,27). Em função do exposto optou-se pela inclusão uma cepa isolada de canais radiculares necrosados (ATCC 4083). Entretanto, os resultados do presente estudo apontaram não haver diferenças significantes na resistência das cepas frente aos cimentos biocerâmicos – possivelmente pela sua maior ação antimicrobiana. Já para o cimento AH Plus foi observada ação significativamente maior contra a cepa endodôntica nas duas condições de contato. A variação da suscetibilidade entre as estirpes clínicas é corroborada por outros autores (7,28,29), podendo

ser fruto de diferenças genéticas entre as cepas que as predisponha a diferenças na susceptibilidade aos cimentos endodônticos.

Diversos estudos avaliam a capacidade antimicrobiana de materiais obturadores contra bactérias em sua forma planctônica, no entanto, considerando a importância dos biofilmes na doença endodôntica, é bastante apropriado avaliar a ação antibacteriana desses materiais ante os biofilmes (7). Diferentes metodologias têm sido sugeridas para a formação de biofilmes, o que mostra a inexistência de um método ideal que reproduza de forma fiel as condições encontradas *in vivo*. Wang, Shen e Haapasalo (27) utilizaram dentina humana como substrato em seu estudo; Faria Junior *et al.* (30), Rezende *et al.* (31) e Andolfatto *et al.* (32) avaliaram a atividade de cimentos contra biofilmes de *E. faecalis* formados em dentina de origem bovina; enquanto Barros *et al.* (7) e Kapralos *et al.* (11) utilizaram membranas de nitrocelulose. O uso de dentina como substrato tem a vantagem de se aproximar das condições clínicas, no entanto, o uso de membrana apresenta maior facilidade de padronização, controle e recuperação das células remanescentes dos biofilmes experimentais (7). No presente estudo, a formação do biofilme foi induzida em membranas de nitrocelulose estéreis como descrito em estudos anteriores (7,11).

Como método alternativo ao teste de difusão em ágar, o teste do contato direto (TCD) vem sendo utilizado no intuito de simular o contato direto entre o material e o biofilme. Já o teste indireto busca simular a inacessibilidade do cimento endodôntico aos microrganismos diante de alguns fatores que podem vir a dificultar esse contato, testando a capacidade de difusão dos componentes antimicrobianos desses cimentos frente a uma barreira física (7,11). No presente estudo foram realizados testes do contato direto e indireto, ambos com tempo de exposição de 30 minutos seguindo o protocolo sugerido por Kayaoglu *et al.* (33) e Barros *et al.* (7). Segundo os autores tal tempo de exposição justifica-se uma vez que a maioria dos cimentos endodônticos apresenta uma atividade antibacteriana insuficiente e de curta duração, que diminui significativamente após sua presa (8, 34-36).

Os resultados encontrados no presente estudo apontam para a existência de atividade antimicrobiana por parte dos cimentos biocerâmicos, tanto o que necessita de manipulação quanto os prontos para o uso, independente da condição de contato e da cepa bacteriana testada. Todavia, alterações em relação a essas condições parecem proporcionar diferentes intensidades nessa capacidade. No teste do contato direto, os cimentos biocerâmicos Bio-C Sealer, Sealer Plus BC e BioRoot RCS mostraram maior ação antimicrobiana, oferecendo resultados significativamente superior ao controle. Os cimentos Bio-C Sealer e BioRoot RCS

apresentaram ainda ação significativamente maior que o AH Plus, cimento com atividade antimicrobiana comprovada (7,14,16). Apesar de inexistirem estudos prévios com os cimentos Bio-C Sealer e Sealer Plus BC, sugere-se que os mesmos apresentem ação antibacteriana em função de sua alta alcalinidade, todavia, não pode ser afastada a existência de algum mecanismo adicional que incremente tal atividade. Já o BioRoot RCS tem sua atividade antimicrobiana comprovada também por Arias-Moliz e Camilleri (23). Nessa condição de contato, o cimento resinoso AH Plus não apresentou atividade antimicrobiana efetiva ao longo do período avaliado, fato encontrado também em estudos prévios (19,35). A baixa ação antimicrobiana proporcionada pelo cimento AH Plus pode ser justificada pela sua baixa capacidade de liberação de íons hidroxila, notadamente relacionada à solubilidade dos materiais.

Em relação ao teste de contato indireto, os resultados apontaram vantagem para os cimentos biocerâmicos prontos para uso. Infelizmente, não se encontram disponíveis estudos prévios com esses materiais nessas condições. Todavia, sabe-se que nestas a existência de uma barreira com capacidade de limitar o contato entre os materiais e o biofilme sugere a necessidade de agentes solúveis com capacidade de difundirem-se pela umidade do próprio material e do biofilme. Tal característica pode, então, ressaltar a influência de uma maior solubilidade ou simplesmente capacidade de difusão, fruto de sua composição à base de silicatos dependentes de umidade ou de um tempo de presa mais longo, ocorrências que isoladamente ou juntas poderiam proporcionar maior alcalinidade em curto prazo, justificando maior difusibilidade de íons hidroxila através da membrana. No caso específico do Sealer Plus BC, material que apresentou resultado mais expressivo, oferecendo diferença significativa ante o grupo controle independente da cepa ou condição de contato, pode-se sugerir que a presença adicional de hidróxido de cálcio em sua composição proporcione um incremento nessa alcalinidade a curto prazo, favorecendo a difusão dos íons e proporcionando maior efetividade.

Ao clínico interessa observar que materiais que apresentem elevada capacidade antimicrobiana, principalmente contra biofilmes, podem colaborar com a sanificação do SCR e com a manutenção da descontaminação alcançada durante o preparo químico-mecânico. Considerando tal observação, os cimentos biocerâmicos, principalmente os apresentados na forma pronto para o uso, como o Sealer Plus BC e o Bio-C Sealer, parecem possuir vantagens ante aos demais cimentos testados, incrementando ainda mais o hall de propriedades que contribuem com sua indicação de uso clínico na obturação do SCR.

CONCLUSÃO

Em função do exposto, considerando as limitações do presente estudo, pode-se concluir que, de maneira geral, os cimentos obturadores endodônticos biocerâmicos apresentam ação antibacteriana ante a biofilmes de *E. faecalis*, independente da cepa bacteriana testada; ainda, que a condição de contato influenciou nesta atividade, tendo o Sealer Plus BC sido único a apresentar diferença em relação ao controle em todas as condições testadas.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES). Os autores negam quaisquer conflitos de interesse relacionados a este estudo.

REFERÊNCIAS

1. UPADYA MH, KISHEN A. Influence of bacterial growth modes on the susceptibility to light-activated disinfection. *Int Endod J* 2010; 43:978-87.
2. ANTUNES HS, ROCAS IN, ALVES FR, SIQUEIRA JF JR. Total and specific bacterial levels in the apical root canal system of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J Endod* 2015;41:1037-42.
3. ALSHWAIMI E, BOGARI D, AJAJ R, AL-SHAHRANI S, ALMAS K, MAJEED A. In vitro antimicrobial effectiveness of root canal sealers against *Enterococcus faecalis*: a systematic review. *J Endod* 2016;42:1588-97.
4. EVANS M, DAVIES JK, SUNDQVIST G, FIGDOR D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002; 35(3):221-8.
5. SIQUEIRA JR, JF. Treatment of endodontic infections. 2011. 1st ed, Berlin, Germany: Quintessence Publishing Co. Ltd.
6. FIGDOR D, DAVIES JK, SUNDQVIST G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(4):234-9.
7. BARROS J, SILVA MG, RÔÇAS IN, GONÇALVES LS, ALVES FF, LOPES MA, *et al.* Antibiofilm effects of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *J Endod* 2014;40:1167-71.

8. SHAKYA VK, GUPTA P, TIKKU AP, PATHAK AK, CHANDRA A, YADAV RK, *et al.* An *in vitro* evaluation of antimicrobial efficacy and flow characteristics for AH Plus, MTA Fillapex, CRCS and Gutta flow 2 root canal sealer. *J Clin Diagn Res* 2016;10(8):ZC104-8.
9. COLLARES FM, LEITUNE VCB, PORTELLA FF, SANTOS PD, BALBINOT GS, DOS SANTOS LA, *et al.* Methacrylate-based root canal sealer containing chlorhexidine and atricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res* 2017; part B:00B:000–000.
10. CHENG X, QU T, MA C, XIANG D, YU Q, LIU X. Bioactive mono-dispersed nanospheres with long-term antibacterial effects for endodontic sealing. *J Mater Chem B Mater Biol Med* 2017;5(6):1195-204.
11. KAPRALOS V, KOUTROULIS A, ØRSTAVIK D, SUNDE PT, RUKKE HV. Antibacterial activity of endodontic sealers against planktonic bacteria and bacteria in biofilms. *J Endod* 2018;44(1):149-54.
12. WEISS EI, SHALHAV M, FUSS Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endod Dent Traumatol* 1996;12(4):179-84.
13. VERSIANI MA, CARVALHO-JUNIOR JR, PADILHA MIAF, LACEY S, PASCON EA, SOUSA-NETO MD. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus TM and Epiphany TM root canal sealants. *Int Endod J* 2006;39(6):464-71.
14. RESENDE LM, RACHED-JUNIOR FJ, VERSIANI MA, SOUZA-GABRIEL AE, MIRANDA CE, SILVA SOUSA YT, SOUSA NETO MD. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus, Epiphany, and Epiphany SE root canal sealers. *Int Endod J* 2009;42(9):785-93.
15. CANDEIRO GTM, MOURA-NETTO C, D'ALMEIDA-COUTO RS, AZAMBUJA-JUNIOR N, MARQUES MM, CAI S, GAVINI G. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. *Int Endod J* 2016;49:858-64.
16. GARRIDO AD, LIA RC, FRANCA SC, DA SILVA JF, ASTOLFI-FILHO S, SOUSA-NETO MD. Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on Copafiera multijuga oil-resin. *Int Endod J* 2010;43(4):283-91.
17. DE ALMEIDA WA, LEONARDO MR, TANOMARU FILHO M, SILVA LA. Evaluation of apical sealing of three endodontic sealers. *Int Endod J* 2000;33(4):25-7.
18. AL-HADDAD A, CHE AB AZIZ ZA. Bioceramic-Based Root Canal Sealers: A Review. *Int J Biomater* 2016; 2016:1-10.

19. MENDES AT, SILVA PB, SO BB, HASHIZUME LN, VIVAN RR, ROSA RA, DUARTE MAH, SO MVR. Evaluation of physicochemical properties of new calcium silicate-based sealer. *Braz Dent J* 2018;29(6):536-40.
20. SIBONI F, TADDEI P, ZAMPARINI F, PRATI C, GANDOLFI MG. Properties of BioRoot RCS, a tricalcium silicate endodontic sealer modified with povidone and polycarboxylate. *Int Endod J* 2017;50:120-36.
21. VOUZARA T, DIMOSIARI G, KOULAOUZIDOU EA, ECONOMIDES N. Cytotoxicity of a New Calcium Silicate Endodontic Sealer. *J Endod* 2018,44(5):849-52.
22. PRÜLLAGE RK, URBAN K, SCHÄFER E, DAMMASCHKE T. Material properties of a tricalcium silicate-containing, a mineral trioxide aggregate-containing, and an epoxy resin-based root canal sealer. *J Endod* 2016;42:784-8.
23. ARIAS-MOLIZ MT, CAMILLERI J. The effect of the final irrigant on the antimicrobial activity of root canal sealers. *J Dentist* 2016;52:30-6.
24. LOVATO KF, SEDGLEY CM. Antibacterial activity of Endosequence root repair material and ProRoot MTA against clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2011;37:1542-6.
25. KANGARLOU A, NESHANDAR R, MATINI N, DIANAT O. Antibacterial efficacy of AH Plus and AH26 sealers mixed with amoxicillin, triple antibiotic paste and nanosilver. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect* 2016;10(4):220-5.
26. SWIMBERGHE RCD, COENYE T, DE MOOR RJG, MEIRE MA. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *Int Endod J* 2018; nov:1-25.
27. WANG Z, SHEN Y, HAAPASALO M. Dentin Extends the Antibacterial Effect of Endodontic Sealers against *Enterococcus faecalis* Biofilms. *J Endod* 2014;40:505-8.
28. ZOLETTI GO, PEREIRA EM, SCHUENCK RP, TEIXEIRA LM, SIQUEIRA JF, JR., DOS SANTOS KR. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Res Microbiol* 2011;162,151-58.
29. DUGGAN JM, SEDGLEY CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007;33:815-18.
30. FARIA-JUNIOR NB, TANOMARU-FILHO M, BERBERT FLCV, GUERREIRO-TANOMARU JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J* 2013;46:755-62.

31. REZENDE GC, MASSUNARI L, QUEIROZ IOA, GOMES FILHO JE, JACINTO RC, LODI CS, DEZN JUNIOR E. Antimicrobial action of calcium hydroxide-based endodontic sealers after setting, against *E. faecalis* biofilm. *Braz Oral Res* 2016;30(1):e38:1-6.
32. ANDOLFATTO C, BONETTI-FILHO I, CARLOS IZ, GUERREIRO-TANOMARU JM, KUGA MC, TORMIN FBC, FARIA G. Cytocompatibility, physical properties, and Antibiofilm activity of endodontic sealers with amoxicillin. *Microsc Res Tech*. 2017;00:1-13.
33. KAYA OGLU G, ØRSTAVIK D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2005;15:308-20.
34. SIQUEIRA JR JF, FAVIERI A, GAHYVA SM, MORAES SR, LIMA KC, et al. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *J Endod* 2000;26(5):274-7.
35. KAYA OGLU G, ERTEN H, ALAC, AM T, ØRSTAVIK D. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2005;38:483–88.
36. BARROS J, SILVA MG, RODRIGUES MA, ALVES FRF, LOPES MA, PINA-VAZ I, SIQUEIRA JF JR. Antibacterial, physicochemical and mechanical properties of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *Int Endod J* 2014;47:725–34.
37. POGGIO C, DAGNA A, CECI M, MERAVINI MV, COLOMBO M, PIETROCOLA G. Solubility and pH of bioceramic root canal sealers: A comparative study. *J Clin Exp Dent* 2017;9(10):1189-94.

TABELAS

Tabela 1. Composição da pasta/pó e pasta/líquido dos cimentos.

	Pasta A / Pó	Pasta B / Líquido
Bio-C Sealer (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A)	Silicato de cálcio Aluminato de cálcio Óxido de cálcio Óxido de zircônia Óxido de ferro Dióxido de silício Agente de dispersão	
Sealer Plus BC (MK Life Medical and Dental Products)	Óxido de zircônio Silicato tri-cálcico Silicato di-cálcico Hidróxido de cálcio Propilenoglicol	
BioRoot RCS (Septodont)	Silicato de tricálcico Povidona Óxido de zircônio	Cloreto de cálcio Policarboxilato
AH Plus (Dentsply / De Trey GmbH)	Bisfenol-A Renina epóxica Bisfenol-F Renina epóxica Tungstato de cálcio Óxido de zircônio Sílica Pigmentos de óxido de ferro	Dibenzil-diamina Aminoadamantano Triciclo-decano-diamina Tungstato de cálcio Óxido de zircônio Sílica Óleo de silicone

Tabela 2. Medianas (valores mínimos e máximos) do crescimento bacteriano (UFC/mL) após contato direto com os biofilmes bacterianos.

Cimento	ATCC 29212	ATCC 4083
	Mediana (mín. - máx.)	Mediana (mín. - máx.)
AH Plus	9,53E+10 ^{bc,B} (5,10E+10 - 1,77E+11)	1,58E+09 ^{bc,A} (9,38E+08 - 1,70E+09)
Bio-C Sealer	1,03E+08 ^{a,A} (3,20E+07 - 1,23E+08)	4,15E+07 ^{a,A} (2,63E+07 - 1,06E+08)
Sealer Plus BC	1,37E+08 ^{ab,A} (1,15E+08 - 1,49E+08)	8,43E+07 ^{ab,A} (7,48E+07 - 1,36E+08)
BioRoot RCS	1,16E+08 ^{a,A} (5,70E+07 - 1,39E+08)	7,35E+07 ^{ab,A} (5,80E+07 - 9,75E+07)
Controle	7,85E+14 ^{c,A} (7,10E+14 - 9,65E+14)	4,08E+14 ^{c,A} (3,15E+14 - 1,45E+15)

^{a,b}Letras minúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significantes de acordo com os testes de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$) considerando cada cepa testada.

^{A,B}Letras maiúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significantes de acordo com o teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$) entre as cepas testadas.

Tabela 3. Medianas (valores mínimos e máximos) do crescimento bacteriano (UFC/mL) após contato indireto com os biofilmes bacterianos.

Cimento	ATCC 29212	ATCC 4083
	Mediana (mín. - máx.)	Mediana (mín. - máx.)
AH Plus	1,24E+10 ^{bc,B} (1,26E+09 - 1,42E+10)	1,21E+08 ^{ab,A} (1,19E+08 - 1,54E+08)
Bio-C Sealer	1,46E+08 ^{ab,A} (1,42E+08 - 2,41E+08)	1,42E+08 ^{abc,A} (1,38E+08 - 1,56E+08)
Sealer Plus BC	1,27E+08 ^{a,A} (1,21E+08 - 1,77E+08)	7,64E+07 ^{a,A} (7,50E+07 - 7,88E+07)
BioRoot RCS	2,15E+09 ^{abc,A} (1,47E+08 - 1,87E+10)	1,45E+08 ^{abc,A} (1,35E+08 - 1,72E+08)
Controle	8,78E+14 ^{c,A} (7,40E+14 - 1,21E+15)	4,32E+14 ^{c,A} (3,25E+14 - 6,08E+14)

^{a,b}Letras minúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significantes de acordo com os testes de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$) considerando cada cepa testada.

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes sobrescritas indicam diferenças significantes de acordo com o teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$) entre as cepas testadas.

5. CONCLUSÃO GERAL

Em função dos métodos aplicados e considerando os resultados deste estudo, pode-se concluir que:

- Os cimentos biocerâmicos Bio-C Sealer, Sealer Plus BC e BioRoot RCS apresentaram ação antimicrobiana efetiva quando em contato direto ante ambas as cepas; ainda, que os cimentos Bio-C Sealer e BioRoot RCS contra a cepa 29212 e o Bio-C ante a cepa 4083 apresentaram atividade superior a do AH Plus;
- Quando em condição de contato indireto, apenas os cimentos Sealer Plus BC e Bio-C Sealer ante a cepa 29212 e unicamente o Sealer Plus BC ante a cepa 4083 apresentaram atividade antimicrobiana significativa; ainda, que os cimentos biocerâmicos apresentaram atividade semelhante ao AH Plus à exceção do Sealer Plus BC ante a cepa 29212.

REFERÊNCIAS

- AL-HADDAD, A.; CHE AB AZIZ, Z.A. Bioceramic-Based Root Canal Sealers: A Review. **Int J Biomater**, v. 2016, p. 1-10, 2016.
- ALSHWAIMI, E.; BOGARI, D.; AJAJ, R.; AL-SHAHRANI, S.; ALMAS, K.; MAJEED, A. In vitro antimicrobial effectiveness of root canal sealers against *Enterococcus faecalis*: a systematic review. **J Endod**, v. 42, n. 11, p. 1588-1597, 2016.
- ANTUNES, H. S.; ROCAS, I. N.; ALVES, F. R.; *et al.* Total and specific bacterial levels in the apical root canal system of teeth with post-treatment apical periodontitis. **J Endod**, v. 41, p. 1037–1042, 2015.
- ARIAS-MOLIZ, M.T.; CAMILLERI, J. The effect of the final irrigant on the antimicrobial activity of root canal sealers. **J Dent**, v. 52, p. 30-36, 2016.
- BARROS, J. **Avaliação das propriedades antimicrobianas e imunológicas de um novo cimento endodôntico**. Porto. Tese [Doutoramento em medicina dentária] – Universidade do Porto; 2013.
- BARROS, J.; SILVA, M.G.; RÔÇAS, I.N.; GONÇALVES, L.S.; ALVES, F.F.; LOPES, M.A.; *et al.* Antibiofilm effects of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. **J Endod**, v. 40, p. 1167-1171, 2014.
- 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.
- CANDEIRO, G.T.M.; MOURA-NETTO, C.; D'ALMEIDA-COUTO, R.S.; AZAMBUJA-JUNIOR, N.; MARQUES, M.M.; CAI, S.; GAVINI, G. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. **Int Endod J**, v. 49, p. 858-864, 2016.
- CHENG, X.; QU, T.; MA, C.; XIANG, D.; YU, Q.; LIU, X. Bioactive mono-dispersed nanospheres with long-term antibacterial effects for endodontic sealing. **J Mater Chem B Mater Biol Med**, v. 5, n. 6, p. 1195-1204, 2017.
- COLLARES, F.M.; LEITUNE, V.C.B.; PORTELLA, F.F.; SANTOS, P.D.; BALBINOT, G.S.; DOS SANTOS, L.A.; *et al.* Methacrylate-based root canal sealer containing chlorhexidine and a-tricalcium phosphate. **J Biomed Mater Res**, part B, 2017.

- DE ALMEIDA, W.A.; LEONARDO, M.R.; TANOMARU FILHO, M.; SILVA, L.A. Evaluation of apical sealing of three endodontic sealers. **Int Endod J** v. 33, n. 4, p 25-27, 2000.
- DIMITROVA-NAKOV, S.; UZUNOGLU, E.; ARDILA-OSORIO, H.; *et al.* In vitro bioactivity of Bioroot RCS, via A4 mouse pulpal stem cells. **Dental Materials**, v. 31, p. 1290-1297, 2015.
- EVANS, M.; DAVIES, J.K.; SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int Endod J**, v. 35, n. 3, p. 221-228, 2002.
- FIGDOR, D.; DAVIES, J.K.; SUNDQVIST, G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. **Oral Microbiol Immunol**, v. 18, n. 4, p. 234-239, 2003.
- GARRIDO, A.D.; LIA, R.C.; FRANCA, S.C.; DA SILVA, J.F.; ASTOLFI-FILHO, S.; *et al.* Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on Copaifera multijuga oil-resin. **Int Endod J**, v. 43, n. 4, p. 283-291, 2010.
- GOMES-FILHO, J.E.; WATANABE, S.; LODI, C.S.; CINTRA, L.T.; NERY, M.J.; FILHO, J.A.; *et al.* Rat tissue reaction to MTA Fillapex. **Dent Traumatol** v. 28, n. 6, p. 452-456, 2012.
- JAFARI, F.; SAMADI; KAFIL, H.; JAFARI, S.; AGHAZADEH, M.; MOMENI, T. Antibacterial activity of MTA Fillapex and AH 26 root canal sealers at different time intervals. **Iran Endod J** v. 11, n. 3, p. 192-197, 2016.
- KAYAOGLU, G.; ØRSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Crit Rev Oral Biol Med** v. 15, p. 308-320, 2004.
- KANGARLOU, A.; NESHANDAR, R.; MATINI, N.; DIANAT, O. Antibacterial efficacy of AH Plus and AH26 sealers mixed with amoxicillin, triple antibiotic paste and nanosilver. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospect** v. 10, n. 4, p. 220-225, 2016.
- KAPRALOS, V.; KOUTROULIS, A.; ØRSTAVIK, D.; SUNDE, P.T.; RUKKE, H.V. Antibacterial activity of endodontic sealers against planktonic bacteria and bacteria in biofilms. **J Endod**, v. 44, n. 1, p. 149-154, 2018.
- LEONARDO, M.; DASILVA, L.; FILHO, M.; *et al.* In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. **J Endod**, v. 26, p. 391-394, 2000.
- LOPES, H.P.; SIQUEIRA JR, JF. **Endodontia – Biologia e Técnica**. 4ª Edição, 2015.

- LOVATO, K.F.; SEDGLEY, C.M. Antibacterial activity of Endosequence root repair material and ProRoot MTA against clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. **J Endod** v. 37, p. 1542-1546, 2011.
- MENDES, A.T.; SILVA, P.B.; SO, B.B.; HASHIZUME, L.N.; VIVAN, R.R.; ROSA, R.A.; DUARTE, M.A.H.; SO, M.V.R. Evaluation of physicochemical properties of new calcium silicate-based sealer. **Braz Dent J**, v. 29, n. 6, p. 536-540, 2018.
- NAWAL, R.R.; PARANDE, M.; SEHGAL, R.; *et al.* A comparative evaluation of antimicrobial efficacy and flow properties for Epiphany, Guttaflow and AH-Plus sealer. **Int Endod J** v. 44, p. 307-313, 2011.
- ØRSTAVIK, D.A.G. Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. **Endod Topics** v. 12, n. 1, p. 25-38, 2005.
- PETERS, O.A.; SCHONENBERGER, K.; LAIB, A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. **Int Endod J** v. 34, p. 221-230, 2001.
- PRÜLLAGE, R.K.; URBAN, K.; SCHÄFER, E.; DAMMASCHKE, T. Material properties of a tricalcium silicate-containing, a mineral trioxide aggregate-containing, and an epoxy resin-based root canal sealer. **J Endod** v. 42, p. 784-788, 2016.
- RESENDE, L.M.; RACHED-JUNIOR, F.J.; VERSIANI, M.A.; SOUZA-GABRIEL, A.E.; MIRANDA, C.E.; *et al.* A comparative study of physicochemical properties of AH Plus, Epiphany, and Epiphany SE root canal sealers. **Int Endod J** v. 42, n. 9, p. 785-793, 2009.
- RICUCCI, D.; SIQUEIRA JR, F. Anatomic and microbiologic challenges to achieving success with endodontic treatment: a case report. **J Endod** v. 34, n. 10, p. 1249-1254, 2008.
- SCHÄFER, E.; ZANDBIGLARI, T. Solubility of root-canal sealers in water and artificial saliva. **Int Endod J**, v. 36, n. 10, p. 660-669, 2003.
- SHAKYA, V.K.; GUPTA, P.; TIKKU, A.P.; PATHAK, A.K.; CHANDRA, A.; YADAV, R.K.; *et al.* An *in vitro* evaluation of antimicrobial efficacy and flow characteristics for AH Plus, MTA Fillapex, CRCS and Gutta flow 2 root canal sealer. **J Clin Diagn Res**, v. 10, n. 8, p. ZC104-ZC108, 2016.
- SIBONI, F.; TADDEI, P.; ZAMPARINI, F.; PRATI, C.; GANDOLFI, M.G. Properties of BioRoot RCS, a tricalcium silicate endodontic sealer modified with povidone and polycarboxylate. **Int Endod J**, v. 50, p. 120-136, 2017.

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

SIQUEIRA JR, JF. **Treatment of endodontic infections**; 2011. 1st ed, Berlin, Germany: Quintessence Publishing Co. Ltd.

STUART, C.H.; SCHWARTZ, S.A.; BEESON, T.J.; OWATZ, C.B. ‘‘*Enterococcus faecalis*’’: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **J Endod** v. 32, p. 93-98, 2006.

SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **J Endod** v. 18, p. 427-430, 1992.

UPADYA, M.H.; KISHEN, A. Influence of bacterial growth modes on the susceptibility to light-activated disinfection. **Int Endod J** v. 43, p. 978-987, 2010.

VERA, J.; SIQUEIRA JR, JF.; RICUCCI, D.; *et al.* One-versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. **J Endod** v. 38, p. 1040-1052, 2012.

VERSIANI, M.A.; CARVALHO-JUNIOR, J.R.; PADILHA, M.I.A.F.; *et al.* A comparative study of physicochemical properties of AH Plus TM and Epiphany TM root canal sealants. **Int Endod J** v. 39, n. 6, p. 464-471, 2006.

WALTIMO, T.; TROPE, M.; HAAPASALO, M.; *et al.* Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. **J Endod** v. 31, p. 863-866, 2005.

WEISS, E.I.; SHALHAV, M.; FUSS, Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. **Endod Dent Traumatol** v. 12, n. 4, p. 179-184, 1996.

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, p. 1051-1055, 2009.

ZHANG, C.; DU, J.; PENG, Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and persistent intraradicular infection compared with primary intraradicular infection: a systematic review. **J Endod** v. 41, p. 1207-1213, 2015.

ANEXO A – NORMAS PARA SUBMISSÃO NO JOURNAL OF ENDODONTICS

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Structured abstract

A structured abstract, by means of appropriate headings, should provide the context or background for the research and should state its purpose, basic procedures (selection of study subjects or laboratory animals, observational and analytical methods), main findings (giving specific effect sizes and their statistical significance, if possible), and principal conclusions. It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Abstract Headings

Introduction, Methods, Results, Conclusions

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those

individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

Original Research Article Guidelines

Title Page

The title describes the major emphasis of the paper. It must be as short as possible without loss of clarity. Avoid abbreviations in the title because this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (eg, use sodium hypochlorite rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at www.icmje.org). Include the manuscript title; the names and affiliations of all authors; and the name, affiliation, and full mailing address (including e-mail) of the corresponding author. This author will be responsible for proofreading page proofs and ordering reprints when applicable. Also highlight the contribution of each author in the cover letter.

Abstract

The Abstract concisely describes the purpose of the study in 250 or fewer words. It must be organized into sections: Introduction, Methods, Results, and Conclusions. The hypothesis is described in the Abstract Introduction. The Abstract describes the new contributions made by this study. The Abstract word limitation and its wide distribution (eg, PubMed) make it challenging to write clearly. This section is written last by many authors. Write the abstract in past tense because the study has been completed. Provide 3-5 keywords.

Introduction

The introduction briefly reviews the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address and the limitations of previous studies in the area. Clearly describe the purpose of the study, the tested hypothesis, and its scope. Many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals; therefore, do not perform extensive literature review or discuss the results of the study in this section.

Materials and Methods

The Materials and Methods section is intended to permit other investigators to repeat your experiments. There are 4 components to this section: (1) detailed description of the materials used and their components, (2) experimental design, (3) procedures employed, and (4) statistical tests used to analyze the results. Most manuscripts should cite prior studies that used similar methods and succinctly describe the essential aspects used in the present study. A "methods figure" will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then you must carefully describe the method and include validation experiments. If the study used a commercial product, the manuscript must either state that you followed manufacturer's protocol or specify any changes made to the protocol. If the study used an in vitro model to simulate a clinical outcome, describe either

experiments made to validate the model or previous literature that proved the clinical relevance of the model. The statistical analysis section must describe which tests were used to analyze which dependent measures; P values must be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis as a basis for sample size computation, dropouts from clinical trials, the effects of important confounding variables, and bivariate versus multivariate analysis.

Results

Only experimental results are appropriate in this section; do not include methods, discussion, or conclusions. Include only those data that are critical for the study, as defined by the aim(s). Do not include all available data without justification; any repetitive findings will be rejected from publication. All Figures, Charts, and Tables must be cited in the text in numerical order and include a brief description of the major findings. Consider using Supplemental Figures, Tables, or Video clips that will be published online. Supplemental material often is used to provide additional information or control experiments that support the results section (eg, microarray data).

Figures

There are 2 general types of figures: type 1 includes photographs, radiographs, or micrographs; type 2 includes graphs. Type 1: Include only essential figures and use composite figures containing several panels of photographs, if possible. Each panel must be clearly identified with a letter (eg, A, B, C), and the parts must be defined in the figure legend. A figure that contains many panels counts as 1 figure. Type 2: Graphs (ie, line drawings including bar graphs) that plot a dependent measure (on the Y axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). One example is a graph depicting pain scores over time. Use graphs when the overall trend of the results is more important than the exact numeric values of the results. A graph is a convenient way to report that an ibuprofen-treated group reported less pain than a placebo-treated group over the first 24 hours, but pain reported was the same for both groups over the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.

Tables

Tables are appropriate when it is critical to present exact numeric values; however, not all results need be placed in either a table or figure. Instead of a simple table, the results could state that there was no inhibition of growth from 0.001%-0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03%-3% NaOCl (N=5/group). If the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure.

Acknowledgments

All authors must affirm that they have no financial affiliation (eg, employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing arrangements, or honoraria), or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past 3 years. Disclose any potential conflict

of interest. Append a paragraph to the manuscript that fully discloses any financial or other interest that poses a conflict. Disclose all sources and attribute all grants, contracts, or donations that funded the study. Specific wording: "The authors deny any conflicts of interest related to this study."

References

The reference style can be learned from reading past issues of JOE. References are numbered in order of citation. Place text citation of the reference Arabic number in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits in the number of references for review articles.

Other Article Types and Guidelines

Manuscripts submitted to JOE that are not Original Articles must fall into one of the following categories. Abstract limit: 250 words. Note that word limits, listed by type, do not include figure legends or References. If you are not sure whether your manuscript falls within one of the categories listed or if you would like to request pre-approval to submit additional figures, contact the Editor at JEndodontics@uthscsa.edu.

CONSORT Randomized Clinical Trial

Must strictly adhere to the Consolidated Standards of Reporting Trials—CONSORT—minimum guidelines for publication of randomized clinical trials (<http://www.consort-statement.org>). Word limit: 3500. Headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Review Article

Either narrative articles or systemic reviews/meta-analyses. Case Report/Clinical Techniques articles, even when they include an extensive review of the literature, are categorized as Case Report/Clinical Techniques. Word limit: 3500. Headings: Abstract, Introduction, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Clinical Research

Prospective or retrospective studies of patients or patient records, research on biopsies excluding the use of human teeth for technique studies. Word limit: 3500. Headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Basic Research—Biology

Animal or culture studies of biological research on physiology, development, stem cell differentiation, inflammation, or pathology. Primary focus is on biology. Word limit: 2500. Headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Basic Research—Technology

Focus primarily on research related to techniques and materials used, or on potential clinical use, in endodontics. Word limit: 2500. Headings: Abstract, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 3. Maximum number of tables: 3.

Case Report/Clinical Techniques

Reports of an unusual clinical case or use of a cutting edge technology in a clinical case. Word limit: 2500. Headings: Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments. Maximum number of figures: 4. Maximum number of tables: 4.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not allowed in the reference list, but they may be mentioned in the text. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web References

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references are included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-endodontics>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by Arabic numerals in parentheses, numbered in the order in which they appear in the text. List: Number the references in the list in the order in which they appear in the text. List 3 authors then et al.

Examples:

Journal article:

1. Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun*. 2010;163:51–59.

Book:

2. Strunk W Jr, White EB. *The Elements of Style*, 4th ed. New York: Longman; 2000.

Chapter in an edited book:

3. Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, eds. *Introduction to the Electronic Age*. New York: E-Publishing; 2009:281–304.

Journal abbreviations source

Journal names are abbreviated according to Index medicus.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.