

## AÇÃO ANTIBACTERIANA DE UM CIMENTO ENDODÔNTICO A BASE DE ALUMINATO DE CÁLCIO

**Talita Luana de Andrade, Maiara, Ivone Regina de Oliveira, Newton Soares da Silva**

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento  
Av. Shishima Hifumi, 2911 São José dos Campos – SP  
andrade\_talita@hotmail.com

**Resumo-** A ação antimicrobiana de cimentos endodônticos é de extrema importância, pois visa eliminar remanescentes microbianos do preparo biomecânico e da medicação intracanal. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana de um cimento endodôntico a base de aluminato de cálcio frente aos microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. No teste bactericida usado, o aumento da biomassa (número de células) total de uma cultura bacteriana em crescimento em meio líquido pode ser monitorado por medidas da densidade óptica da cultura. Os resultados mostraram que o cimento avaliado apresentou atividade antimicrobiana contra a *S. aureus*, reduzindo em aproximadamente 50% o número de bactérias quando comparado ao meio na ausência do cimento. Por outro lado, favoreceu o crescimento da *E. coli*, a qual recobriu maior área da superfície da amostra.

**Palavras-chave:** cimento de aluminato de cálcio, atividade bactericida, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

**Área do Conhecimento:** Técnico

### Introdução

Desde sua introdução na endodontia como um material retro-obturador e selador de defeitos da raiz dental, o agregado de trióxido mineral (MTA) tem sido considerado como um material endodôntico revolucionário. Apesar disso, este material apresenta algumas propriedades limitantes necessitando de alterações em sua composição bem como desenvolvimento de novos materiais.

Neste contexto, um novo cimento endodôntico a base de cimento de aluminato de cálcio (ECAC) foi desenvolvido na Universidade Federal de São Carlos (PANDOLFELLI et al, 2007) visando preservar as propriedades positivas e aplicações clínicas do MTA permitindo que suas aplicações possam ser estendidas superando as desvantagens apresentadas pelo material original, por meio da adição de aditivos específicos.

O cimento de aluminato de cálcio é composto principalmente pelas fases  $\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$  e dialuminato de cálcio ( $\text{CaO} \cdot 2\text{Al}_2\text{O}_3$ ) as quais são responsáveis pelo seu processo de endurecimento hidráulico (PARKER; SHARP, 1982). A dissolução dessas fases em contato com a água promove a liberação dos íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  e  $\text{OH}^-$ , o que é seguido pela precipitação de hidratos de aluminato de cálcio (C-A-H) e hidróxido de alumínio (AH) devido a saturação da solução (Alt et al, 2003).

Estudos recentes têm mostrado que o ECAC possui propriedades intrínsecas tais como:

(i) curto tempo de pega quando apropriadamente combinado com  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  e (ii) capacidade de liberar íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{OH}^-$  alcalinizando o meio. Além disso, o desenvolvimento da composição do ECAC por meio da adição de aditivos específicos também superou algumas características negativas do MTA, resultando em melhor fluidez, melhores condições de manuseamento, maior resistência mecânica e reduzida porosidade, quando comparado ao MTA (Oliveira IR, 2010)

Entretanto, além dos requisitos físico-químicos, um cimento endodôntico deve preencher vários requisitos biológicos para serem considerados ideais. O ECAC apresentou-se como um material bioativo em um ambiente biológico simulado (Oliveira IR, 2010). Quando o material é colocado em contato com SBF, íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{OH}^-$  são liberados acentuando a supersaturação da solução o que pode induzir a precipitação de hidroxiapatita sobre a superfície das partículas.

Também foi avaliada a progressão de cultura de células osteogênicas expostas ao ECAC em comparação ao MTA. Durante a cultura primária, observou-se o arredondamento das bordas das amostras de cimento apenas para MTA. Embora ambos os cimentos tenham permitido a adesão, o espriamento e a proliferação celulares, as culturas crescidas em contato com ECAC exibiram valores maiores de número total de células em 3 e 7 dias, e de conteúdo de proteína total e atividade de fosfatase

alcalina em 10 dias. Os resultados indicam que a exposição ao ECAC permite o desenvolvimento de uma proporção maior de células em estágios mais avançados da diferenciação osteoblástica, quando comparado ao MTA (Raucci et al. 2010).

Outro fator biológico imprescindível é a ação antimicrobiana dos cimentos endodônticos, pois visa evitar contaminação durante a fase de manipulação, completar o efeito antimicrobiano da medicação intracanal e inibir o crescimento de microrganismos (J Cruz CW et al. 2001).

Assim, o presente estudo objetiva avaliar a ação antibacteriana de um cimento endodôntico a base de aluminato de cálcio (ECAC) usando microrganismos controle em testes de antibiograma: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

## Materiais e Métodos

O cimento hidráulico usado foi o cimento de aluminato de cálcio (Secar 71, Kerneos, França). A preparação do cimento endodôntico ECAC envolveu a adição de aditivos (dispersante, plastificante e radiopacificador) ao cimento de aluminato de cálcio seguida da homogeneização em moinho de bolas durante 1 hora.

Os aditivos usados foram: (a) um dispersante polimérico da família poliglicol (Bayer, 0,6%-p), (b) um aditivo para induzir plasticidade ao cimento ( $\text{CaCl}_2$ , Labsynth, 2,8%-p) e (c) um aditivo para fornecer radiopacidade ao cimento ( $\text{ZnO}$ , J.T. Baker, 25%-p). Os teores de aditivos (%-p) são em relação a massa de cimento.

Suspensões aquosas de ECAC (75%-p de sólidos) foram preparadas na presença de acelerador ( $\text{Li}_2\text{CO}_3\text{-CaO}$ , Synth, 0,4%-p) e usadas na preparação de pastilhas (0,8 mm de diâmetro x 0,2 mm de altura). A cura foi realizada a 37°C em uma estufa em ambiente saturado durante 1 hora. Após a cura, as pastilhas foram usadas nos testes bactericidas.

### Cepa bacteriana

Foram utilizadas cepas bacterianas padrão da linhagem *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### Cultivo Bacteriano

Partindo-se inicialmente de uma cultura estoque, foram preparadas, através de repique, culturas em tubos de vidro 18x18 mm (Pyrex®), contendo 10µL de solução bacteriana e 5mL de caldo BHI (Brain and Heart Infusion, Gibco) estéril. A cultura foi então incubada em estufa (Fanem®) a 37°C por um período de 3 a 4 horas, correspondente a fase exponencial, também chamada de fase *log* do crescimento bacteriano.

### Meio de cultura

Para o preparo de 100mL de solução de meio de cultura para as cepas bacterianas *E. coli* e *S. aureus*, foram diluídos 3,7 gramas de meio BHI (Brain and Heart Infusion, Gibco) em 100mL de água destilada e deixado sob agitação até que formasse uma mistura homogênea. Posteriormente, a solução foi autoclavada (121°C, 15 minutos) para esterilização e estocada em uma garrafa de vidro a 37°C.

### Repique das bactérias

Com o intuito de manter o estoque das bactérias *E. coli* e *S. aureus*, foram feitos repiques diariamente adicionando 10µL da suspensão em 5mL de BHI em um tubo e incubados em estufa à 37°C por 12 horas.

### Teste bactericida

O teste foi realizado para quantificar a ação bactericida das amostras de cimento e para isso, foram utilizadas as cepas bacterianas *E. coli* e *S. aureus*. Caldo BHI foram utilizados como controle. Sendo assim, 10µL de suspensão contendo a bactéria ( $\sim 2,3 \times 10^7$  bactérias/mL) foram adicionadas em cada uma das amostras de cimento previamente esterilizadas em uma placa de petri e deixadas na estufa à 37°C por 1h. Então, as amostras foram lavadas com 10mL de PBS (Tampão Salina Fosfato) a fim de remover as bactérias mortas e dispostas em placas de 24 poços com 1mL de caldo BHI, e incubadas por um período de 3-4h. Foram incubadas também alíquotas de PBS a fim de avaliar o crescimento bacteriano no mesmo. Após o período de incubação uma alíquota de 150µL da solução de cada poço foi retirada e levada para leitura utilizando o leitor espectrofotômetro SpectraCount® (Packard) com um filtro de 570nm.

### Microscopia Eletrônica de Varredura

Após interação das bactérias com as pastilhas de cimento conforme descrito acima, as amostras foram fixadas em solução contendo Paraformaldeído 4%, Glutaraldeído 2,5% em PBS por no mínimo 2 horas. Após este período, as amostras foram desidratadas em solução crescente de acetona (50 - 70 - 90 - 100%) com intervalo de 10 minutos em cada, sendo que a última de 30 minutos. Após este período, as amostras foram secas em solução de HMDS (Hexamethyldisilazane - Sigma-Aldrich Inc.) e metalizadas em um equipamento Emitech K550X. As análises foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss EVOMA10 no IP&D - UNIVAP.

### Resultados e Discussão

A fase técnica do tratamento endodôntico é concluída com a obturação do canal radicular. No entanto, o material obturador nem sempre se adere adequadamente às paredes dentinárias. Os possíveis espaços existentes no interior do canal radicular já obturado podem favorecer a proliferação de microrganismos (Leonardi et al 2009).

A complexidade e a variabilidade da morfologia dos canais radiculares tornam a tarefa de mantê-los livres de microrganismos bastante complexa. O sistema de canais radiculares é composto por um canal principal, o qual pode apresentar várias ramificações que variam de acordo com a posição ou características do elemento dentário (Leonardi et al 2009).

Assim, a ação antimicrobiana de cimentos endodônticos é de extrema importância, pois visa eliminar remanescentes microbianos do preparo biomecânico e da medicação intracanal.

Neste trabalho, a ação antibacteriana do ECAC foi avaliada por meio de medidas de densidade óptica. Neste método, o aumento da biomassa (número de células) total de uma cultura bacteriana em crescimento em meio líquido pode ser monitorado por medidas da densidade óptica da cultura. Por essa razão, alíquotas da cultura em crescimento foram retiradas em tempos determinados e mediu-se a absorvância da cultura em um comprimento de onda de 570nm. Cada medida obtida correspondeu à densidade óptica da cultura em um dado momento do crescimento. A absorvância aumenta proporcionalmente ao aumento do número de células na população. Desta forma foi possível construir gráficos representativos da eficácia das amostras frente ao crescimento bacteriano.

Os resultados quanto à densidade óptica para os diferentes meios avaliados na ausência ou na presença dos microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* são apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

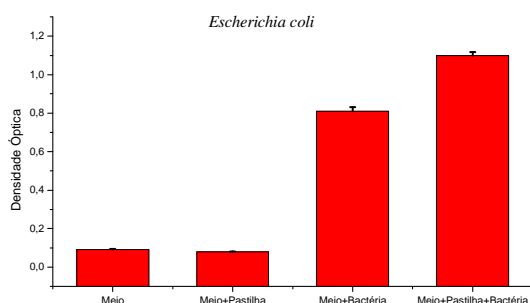


FIGURA 1: Densidade óptica em 3h de incubação dos grupos: controle negativo (ausência de crescimento) somente meio BHI e meio+pastilha de cimento; grupo controle positivo (crescimento

bacteriano) meio+bactéria; e grupo experimental meio+pastilha de cimento+bactéria *E. coli*.

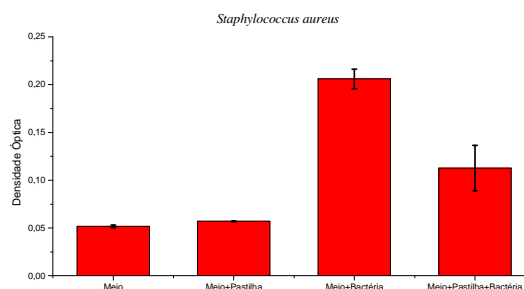


FIGURA 2: Densidade óptica em 3h de incubação dos grupos: controle negativo (ausência de crescimento) somente meio BHI e meio+pastilha de cimento; grupo controle positivo (crescimento bacteriano) meio+bactéria; e grupo experimental meio+pastilha de cimento+bactéria *S. aureus*.

A *Escherichia coli* é uma bactéria bacilar gram-negativa, que, juntamente com o *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) é a mais comum e uma das mais antigas bactérias simbiotes do homem.

*E. coli* assume a forma de um bacilo e pertence à família das Enterobacteriaceae. São aeróbias e anaeróbias facultativas. Não é uma bactéria comum da cavidade bucal, mas pode estar presente principalmente em indivíduos mais velhos ou clinicamente comprometidos (Leonardi et al 2009).

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria esférica (coccus) que aparece aos pares no exame microscópico, em cadeias curtas ou em cachos similares aos da uva ou em grupos. É um gram-positivo, sendo que algumas cepas produzem uma toxina protéica altamente termo-estável que causa a doença em humanos. A toxina é produto da multiplicação da bactéria nos alimentos deixados em temperaturas inadequadas.

*S. aureus* também é considerado um microrganismo incomum em cavidade bucal, mas, assim como a *E. coli*, tem sido amplamente usado em testes de antibiograma. Ambos são considerados microrganismos controle nestes testes (Leonardi et al 2009). nos quais é avaliado a resistência/sensibilidade de cepas de bactérias frente aos antibióticos.

Os resultados mostraram que o cimento endodôntico avaliado apresentou atividade antimicrobiana contra a *S. aureus*. Por outro lado, favoreceu o crescimento da *E. coli*.

Por meio das micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura também foi possível observar maior afinidade da *E. coli* com o cimento endodôntico, a qual ocupa totalmente a superfície da amostra, como apresentado nas

Figuras 3 e 4. Já, as micrografias obtidas na presença da *S. aureus* mostram que as bactérias não recobrem totalmente a superfície da amostra (Figura 5 e 6).

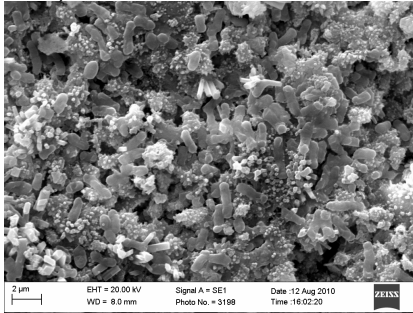


FIGURA 3: *Escherichia coli* em contato com um cimento endodôntico a base de aluminato de cálcio (ECAC).

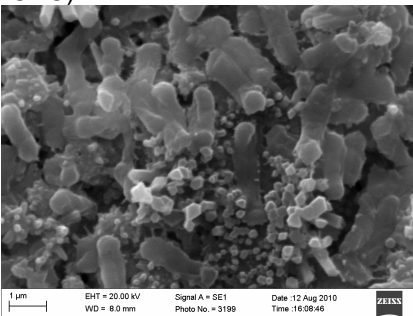


FIGURA 4: *Escherichia coli* em contato com um cimento endodôntico a base de aluminato de cálcio (ECAC). Maior aumento a fim destacar o contato da bactéria com a superfície da amostra. Ao fundo notamos o padrão de cristalização da amostra.

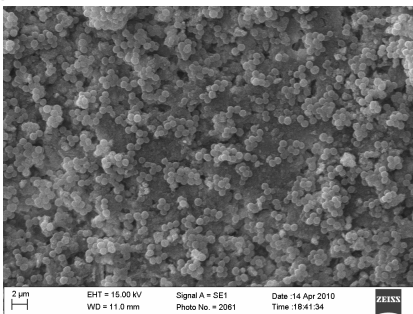


FIGURA 5: *Staphylococcus aureus* em contato com um cimento endodôntico a base de aluminato de cálcio (ECAC).

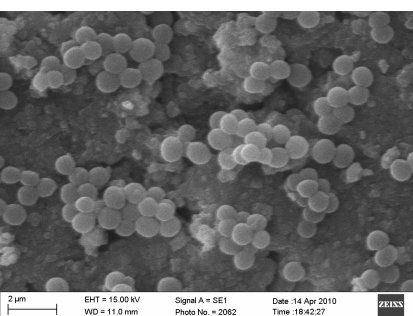


FIGURA 6: *Staphylococcus aureus* em contato com um cimento endodôntico a base de aluminato

de cálcio (ECAC). Maior aumento a fim destacar regiões da amostra livres de bactérias.

### Conclusões

O cimento endodôntico a base de aluminato de cálcio (ECAC) mostrou um comportamento oposto frente às bactérias avaliadas. Apresentou atividade antimicrobiana contra a *S. aureus* reduzindo em aproximadamente 50% o número de bactérias quando comparado ao meio na ausência do cimento. Por outro lado, favoreceu o crescimento da *E. coli*, a qual recobriu maior área da superfície da amostra.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro.

### Referências

- Pandolfelli VC, Oliveira IR, Rossetto HL, Jacobovitz M. Composição a base de cimento aluminoso para aplicações em endodontia e produto cimentício obtido. Registro de patente INPI 0704502-6. Universidade Federal de São Carlos, 2007.
- Parker KM, Sharp JH. Refractory calcium aluminate cements. *British Ceramic Transitions Journal*, 81, 35-42, 1982.
- Alt C, Wong L, Parr C. Measuring castable rheology by exothermic profile. *Refractories Applications and News*, 8, 15-8, 2003.
- Oliveira IR, Pandolfelli VC, Jacobovitz M. Chemical, physical and mechanical properties of a novel calcium aluminate endodontic cement. *International Endodontic Journal*, aceito para publicação, 2010.
- Oliveira IR, Pandolfelli VC. Propriedades e bioatividade de um cimento endodôntico a base de aluminato de cálcio. *Revista Cerâmica*, submetido, 2010.
- Raucci LMSC, Oliveira IR, Teixeira LN, Rosa AL, Oliveira PT, Jacobovitz, M. Effects of a Novel Calcium Aluminate Cement on the Early Events of the Progression of Osteogenic Cell Cultures. *Brazilian Dental Journal*, submetido, 2010.
- Cruz CW, Moura PPR, Habitante SM, Zollner N, Jorge AOC. Avaliação do efeito antibacteriano *in vitro* dos cimentos obturadores Rickert, N-Rickert e Sealer 26. *Revista Biociência*, 7 [1] 49-53, 2001.
- Leonardi DP, Battisti JC, Klimiont DT, Tomazinho PH, Filho FB, Haragushiku, GA, Tomazinho FSF. Avaliação *in vitro* da ação antimicrobiana de alguns cimentos endodônticos. *Revista Sul-Brasileira de Odontologia*, 6 [4] 367-373, 2009.