


Bethânia Moreira FERNANDES*

AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E LIBERAÇÃO DE ÍONS HIDROXILA DOS CIMENTOS ENDODÔNTICOS


Vanessa Bernardes Sousa DINIZ**

ANTIMICROBIAL EVALUATION AND HYDROXYL ION LIBERATION FROM EDODONTIC CEMENT


Arnaldo SANT'ANNA JUNIOR***

 <https://orcid.org/0000-0002-9106-7862>


Guilherme Hiroshi YAMANARI****

 <https://orcid.org/0000-0002-0119-2660>

Carolina Simonetti LODI*****

 <https://orcid.org/0000-0002-3926-8392>

Gabriely Cristinni REZENDE*****

 <https://orcid.org/0000-0003-2203-4538>

Recebido em: 22 de Abril de 2019

Aprovado em: 03 de Dezembro de 2019

RESUMO

O tratamento endodôntico tem como um dos seus objetivos eliminar microrganismos presentes no sistema de canais radiculares através da ação física dos instrumentos e química das soluções irrigadoras e medicação intracanal. Entretanto, alguns microrganismos como *Enterococcus faecalis* podem resistir ao tratamento endodôntico. Assim, o uso de cimentos endodônticos com atividade antimicrobiana pode ajudar a eliminar microrganismos resistentes. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e pH dos cimentos endodônticos: Ah plus, Acroseal, Sealer 26 e Sealapex. Para o teste de atividade antimicrobiana, quatro placas de BHI Agar foram preparadas, 50ul do inóculo de *Enterococcus faecalis* foi adicionada por técnica de esgotamento, em seguida, os cimentos foram colocados em poços e o halo de inibição foi medido nos períodos experimentais (2, 7 e 14 dias). Para o teste de pH, tubos de polietileno foram cortados e preenchidos com os cimentos, em seguida, foram colocados em 5ml de água deionizada em mantidos a 37°C por 2, 7 e 14 dias, após cada período experimental, os pH foram mensurados com pHgâmetro. Os dados foram analisados usando modelo ANOVA e Shapiro-Wilk, com nível de significância de 5%. A comparação entre os materiais revelou que os cimentos Sealapex e Selaer 26 apresentaram os maiores valores de pH em todos os períodos avaliados, logo, apresentam maior ação antibacteriana também, seguidos do Acroseal e Ah Plus. Os cimentos promoveram significativo aumento de pH, mas nenhum foi capaz de eliminar completamente as bactérias. Concluímos com o presente estudo que o empenho de um cimento, para a finalidade de ação antimicrobiana, é atribuído a sua capacidade de manter o pH elevado no meio alcalino.

Descritores: Endodontia. Anti-infecciosos. Cimentos dentários. *Enterococcus faecalis*. Alcalinização.

ABSTRACT

The endodontic treatment aims to eliminate microorganisms which are present in root canal system through the physical action of tools and chemical irrigation solutions and intracanal medicaments. However, some microorganisms such as *Enterococcus faecalis* might resist to endodontic treatment. Thus, the use of endodontic cement with antimicrobial action may help to eliminate resistant microorganisms. The present study aims to evaluate the antimicrobial activity as well as the endodontic cement pH: Ah plus, Acroseal, Sealer 26 and Sealapex. Four BHI Agar plates were prepared for an antimicrobial activity test, 50ul of *Enterococcus faecalis* inoculum was added by using depletion technique, then the cements were placed in pits and the zone of inhibition was measured at experimental periods (2, 7 and 14 days). Polyethylene tubes were cut and filled with cements for the pH test, they were immersed with 5ml of deionized water and kept at 37°C for 2, 7 and 14 days, after each experimental period, the pH was measured with PH meter. Data was analyzed using ANOVA and Shapiro-Wilk models with 5% significance level. The comparison between materials revealed the cement Sealapex and Sealaer 26 presented higher pH values for all evaluated periods, thus they also present higher antibacterial action, followed by Acroseal and Ah Plus. The cements presented a significant rise of pH, but no one was able to completely eliminate the bacteria. With the present study we conclude that the cement performance, for the purpose of antimicrobial action is attributed to its potential of maintaining the pH high in alkaline environment.

Descriptors: Endodontics. Anti-infective. Dental cement. *Enterococcus faecalis*. Alkalinisation.

* Cirurgiã-dentista, Graduada em Odontologia pelo Centro Universitário de Santa Fé do Sul/SP – Unifunec, bethaniamf@hotmail.com

** Cirurgiã-dentista, Graduada em Odontologia pelo Centro Universitário de Santa Fé do Sul/SP – Unifunec, vanessanx17@hotmail.com

*** Doutor, Docente do Centro Universitário de Santa Fé do Sul/SP – Unifunec, asjr67@bol.com.br

**** Doutor, Docente do Centro Universitário de Santa Fé do Sul/SP – Unifunec, ghyamanari@hotmail.com

***** Doutora, Docente do Centro Universitário de Santa Fé do Sul/SP – Unifunec, carol_lodi@yahoo.com.br

***** Doutora, Docente do Centro Universitário de Santa Fé do Sul/SP – Unifunec, gabry.cristinni@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Microrganismos e seus subprodutos são considerados o principal fator etiológico das alterações pulpares e periapicais, assim, a desinfecção do sistema de canais radiculares é primordial para a cicatrização dos tecidos periapicais¹. Entretanto, mesmo com técnicas modernas de instrumentação, o emprego de substâncias irrigadoras e medicação intracanal, microrganismos podem sobreviver ao tratamento endodôntico².

Enterococcus faecalis é uma bactéria Gram positiva frequentemente encontrada em casos de insucesso do tratamento endodôntico^{3,4,5,6}, pois, após se alojarem nos túbulos dentinários do sistema de canais radiculares, é difícil remover essas espécies através de medicamentos do canal radicular⁷. Assim, cimentos endodônticos com atividade antimicrobiana podem impedir infecções residuais persistentes e entrada de micro-organismos pela cavidade oral, aumentando assim as chances de um resultado de tratamento endodôntico bem-sucedido¹.

Os cimentos endodônticos podem ser classificados de acordo com sua composição química, como selantes à base de óxido de zinco e eugenol, à base de hidróxido de cálcio, à base de ionômero de vidro, à base de resina epóxi e agregado de trióxido mineral (MTA)¹. Sealapex e Acroseal são cimentos à base de hidróxido de cálcio que têm demonstrado efetividade contra o biofilme de *Enterococcus faecalis*⁸ e acredita-se que sua dissociação em íons cálcio e hidroxila alcaliniza o ambiente, deixando-o desfavorável à proliferação bacteriana⁹. O AH Plus e Selares 26 são cimentos à base de resina epóxi que também demonstraram atividade antimicrobiana contra o *E. faecalis*^{8,10}.

O objetivo deste estudo *in vitro* é comparar a liberação de íons hidroxila e a eficácia antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* de quatro cimentos endodônticos: AH Plus, Acroseal, Sealapex e Sealer 26. A hipótese nula desse trabalho é que não existe diferenças estatísticas entre os cimentos endodônticos avaliados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os cimentos endodônticos selecionados para esse estudo foram: Sealapex®, Acroseal®, Sealer 26® e AH Plus®. Todos os espécimes utilizados neste estudo foram preparados seguindo-se as orientações do fabricante com relação às proporções pó/líquido.

2.1 Avaliação do pH

Para a avaliação do pH, os cimentos foram manipulados, inseridos em tubos de polietileno de 1mm X 10mm (diâmetro/comprimentos) com o auxílio de uma seringa de 1ml e

agulha 0,6x0,25mm, em seguida, cada tubo foi colocado em frascos contendo 5ml de água deionizada e levados à estufa a 37°C por 2, 7 e 14 dias. Após cada período experimental, o pH da solução com os cimentos era mensurado com pH previamente calibrado (Tecnonon Equipamento Especiais Ltda., Piracicaba, Brasil). O pH médio foi calculado para cada grupo e tempo experimental.

2.2 Teste de difusão em ágar

Todos os procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara de fluxo laminar (VecoBioseg 12 Ltda., Campinas, Brasil). Cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) foi reativada em 20ml de Brain Heart Infusion Agar (BHI) estéril (DifcoLaboratories Inc., Detroit, USA) e mantida em estufa 37° por 24 horas. Após o crescimento, uma fileira de colônia foi inoculada em 5,0ml de Brain Heart Infusion Caldo, em estufa a 37°C overnight. No dia seguinte, a densidade óptica foi medida com ajuda de espectrofotômetro (BioTekInstruments, Winooski, USA) a 550nm de comprimento de onda a 0,5 (aproximadamente 5×10^8 UFC/ml-1).

Em seguida, 100ul da cepa com a densidade óptica ajustada foram semeadas em 20ml de Brain Heart Infusion Agar (BHI) estéril e levadas para a estufa a 37°C por 2 horas para que as camadas de cepas secassem. Após a solidificação, foram feitos cinco poços de 0,6mm de diâmetro em cada placa, pela remoção do ágar em pontos equidistantes utilizando palha estéril e foram, imediatamente, preenchidos com os materiais. O teste foi realizado em 6 placas. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 2, 7 e 14 dias. Após os períodos de incubação, o diâmetro das zonas de inibição foi medido em milímetros com uma régua transparente. A média dos valores foram calculadas.

2.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA). A média e o desvio padrão serviram como parâmetro para todos os grupos. Os dados foram analisados usando modelo ANOVA e Shapiro-Wilk, com nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação do pH

A tabela 1 mostra a média do desvio padrão do pH nos períodos de 2, 7 e 14 dias dos cimentos avaliados. A comparação entre os materiais revelou que os cimentos Sealapex e Selaer 26 apresentaram os maiores valores de pH em todos os períodos avaliados, seguidos do Acroseal e Ah Plus. A comparação entre os períodos mostrou que a Ah Plus aumentou o pH após 14 dias.

Tabela 1 - Média e desvio padrão do pH dos diferentes grupos nos diferentes tempos

Materiais	2 dias	7 dias	14 dias
Ah Plus	6,4 ($\pm 0,3$) ^{A, a}	6,6 ($\pm 0,3$) ^{A, a}	7,2 ($\pm 0,4$) ^{A, b}
Acroseal	7,4 ($\pm 0,4$) ^{B, a}	7,6 ($\pm 0,2$) ^{B, a}	7,9 ($\pm 0,5$) ^{A, a}
Sealapex	9,0 ($\pm 0,4$) ^{C, a}	9,0 ($\pm 0,2$) ^{C, a}	9,2 ($\pm 0,8$) ^{B, a}
Sealer 26	8,7 ($\pm 0,4$) ^{C, a}	8,7 ($\pm 0,5$) ^{C, a}	8,7 ($\pm 0,3$) ^{B, a}

Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística entre os grupos

Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística entre os tempos

Fonte: Dos próprios autores

3.2 Teste de difusão em ágar

A tabela 2 mostra a média do desvio padrão do halo de inibição nos períodos de 2, 7 e 14 dias dos cimentos avaliados. A comparação entre os materiais revelou que o cimento Sealer 26 foi o cimento que apresentou o maior halo de inibição bacteriana nos períodos de 2 e 7 dias, seguido do Sealapex, Ah Plus e Acroseal. A comparação entre os períodos avaliados demonstrou que o Sealapex aumentou sua atividade antimicrobiana com o tempo.

Tabela 2 - Média e desvio padrão do halo de inibição bacteriana dos diferentes grupos nos diferentes tempos

Materiais	2 dias	7 dias	14 dias
Ah Plus	13,8 ($\pm 0,7$) ^{B, a}	14,2 ($\pm 0,7$) ^{B, a}	14,2 ($\pm 0,9$) ^{B, a}
Acroseal	12,4 ($\pm 0,4$) ^{A, a}	12,4 ($\pm 0,4$) ^{A, a}	12,4 ($\pm 0,4$) ^{A, a}
Sealapex	14,6 ($\pm 0,8$) ^{C, a}	15,8 ($\pm 1,4$) ^{B, b}	17,2 ($\pm 0,7$) ^{C, c}
Sealer 26	17,0 ($\pm 1,4$) ^{D, a}	17,6 ($\pm 1,7$) ^{C, a}	17,6 ($\pm 1,0$) ^{C, a}

Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística entre os grupos

Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística entre os tempos

Fonte: Dos próprios autores

4 DISCUSSÃO

Microrganismos como o *Enterococcus faecalis* são, comumente, associados aos casos de insucesso do tratamento endodôntico^{3,4,5,6}, devido a sua capacidade de se alojarem em túbulos dentitários do sistema de canais radiculares, o que dificulta a ação dos instrumentos e substâncias

usadas durante o tratamento endodôntico⁷. Assim, o uso de cimentos endodônticos com ação antimicrobiana pode reduzir a carga microbiana residual persistente e impedir a entrada de novos microrganismos pela cavidade oral¹.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a liberação de íons hidroxila e a eficácia antimicrobiana dos cimentos endodônticos AH Plus, Acroseal, Sealapex e Sealer 26. Os resultados mostraram que Sealer 26 e Sealapex apresentaram os maiores valores de halo de inibição e pH, seguidos do AH Plus e Acroseal, provando que os cimentos mostraram diferença estatística em ambas as metodologias avaliadas, portanto, a hipótese nula de que não haveria diferença entre os grupos foi rejeitada.

Diversas metodologias podem ser utilizadas para avaliar a ação antimicrobiana dos cimentos endodônticos, dentre elas o teste de difusão em ágar. O teste de difusão em ágar é um dos mais utilizados devido à facilidade da técnica e uso de poucos equipamentos. Entretanto, os resultados dependem da solubilidade dos materiais testados, por essa razão, o presente estudo também avaliou a difusão de íons hidroxila dos cimentos avaliados. Atualmente, existe um grande número de cimentos endodônticos disponíveis no mercado, mas o presente estudo avaliou quatro desses materiais: Sealer 26, Sealapex, AH plus e Acroseal.

Sealapex é um cimento endodôntico à base de hidróxido de cálcio que apresenta ação antibacteriana, imediatamente, após a manipulação e vários dias depois^{11,12} e esse desempenho é, parcialmente, atribuído à sua capacidade de manter o ambiente com um pH elevado por longos períodos de tempo¹³. No presente estudo, o Sealepex apresentou o valor de pH mantendo uma média estável em 9 e aumentou sua atividade antibiofilme contra *E. faecalis* com o tempo de 2, 4 e 7 dias e resultados semelhantes foram encontrados por¹².

O Sealer 26 foi o de melhor resultado com o índice em uma média de 17,4, já que a presença de hidróxido de cálcio em sua formulação promove liberação de íons cálcio e mantém a alcalinidade do meio por longos períodos de tempo¹³. Um estudo anterior demonstrou que o Sealer 26 não foi eficaz¹², assim como no presente estudo, onde o Sealer 26 teve um pH elevado (8,7) nos períodos 2 e 7 dias promovendo uma ação efetiva contra o *E. faecalis*.

O Acroseal é um cimento à base de hidróxido de cálcio e, no presente estudo, manteve uma média de 7,6. O Acroseal, em outros estudos, mostrou sua capacidade de selamento, atividade contra *Enterococcus faecalis* e adaptação às paredes do canal radicular. Entretanto, no presente estudo, foi o cimento de menor eficácia, provavelmente, devido ao seu pH próximo ao neutro.

O AH Plus é um cimento resinoso que manteve uma média de 6, melhorando apenas após 14 dias. No presente estudo, o AH Plus apresentou um halo de inibição bacteriana com

eficiência inferior aos outros cimentos, porém não ineficaz. Resultados contrários foram encontrados quanto à eficácia do AH Plus contra microrganismos orais^{10,14}. Os cimentos promoveram significativo aumento de pH e halos de inibição, mas nenhum foi capaz de eliminar, completamente, bactérias, estando de acordo com estudos anteriores¹².

5 CONCLUSÃO

O empenho de um cimento, para a finalidade de ação antimicrobiana, é atribuído a sua capacidade de manter o pH elevado no meio alcalino. A comparação entre os materiais revelou que os cimentos Sealapex e Selaer 26 apresentaram os maiores valores de pH em todos os períodos avaliados, logo também apresentam maior ação antibacteriana, seguidos do Acroseal e do Ah Plus. Os cimentos promoveram significativo aumento de pH, mas nenhum foi capaz de eliminar, completamente, as bactérias.

REFERÊNCIAS

- 1 Dalmia S, Gaikwad A, Samuel R, Aher G, Gulve M, Kolhe S. Antimicrobial efficacy of different endodontic sealers against *Enterococcus faecalis*: An In vitro Study. J Int Soc Prevent Community Dent [Internet]. 2018; 8(2):104-9. Disponível em: <http://www.jispcd.org/text.asp?2018/8/2/104/230911>
- 2 Arora R, Rawat P, Bhayya Dp. A comparative evaluation of antimicrobial efficacy of three endodontic sealers: Endoflas FS, AH plus and sealapex against *Enterococcus faecalis* – An in vitro study. IOSR J Dent Med Sci [Internet]. 2014;13(3):90-3. Disponível em: <http://www.iosrjournals.org/iosr-jdms/papers/Vol13-issue3/Version-4/R013349093.pdf>
- 3 Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J [Internet]. 1998;31(1):1-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9823122>
- 4 Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in Previously Root-Filled Canals in a Lithuanian Population. J Endod. [Internet]. 2000;26(10):593-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00004770-200010000-00004>
- 5 Haapasalo M, Udnaes T, Endal U. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. Endodontic Topics [Internet] 2003; 6(1):29-56. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2003.00041.x>.
- 6 Rôças IN, Siqueira Jr JF, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J Endod. [Internet] 2004;30(5):315-20. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00004770-200405000-00004>
- 7 Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med

- Oral Pathol Oral Radiol Endod. [Internet] 1998; 85(1):86-93. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(98\)90404-8](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(98)90404-8)
- 8 Rezende GC, Massunari L, Queiroz IO, Gomes Filho JE, Jacinto RC, Lodi CS, *et al.* Antimicrobial action of calcium hydroxide-based endodontic sealers after setting, against *E. faecalis* biofilm. Braz Oral Res. [Internet] 2016;30(1):E38. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0038>
- 9 Mickel AK, Nguyen TH, Chogle S. Antimicrobial Activity of Endodontic Sealers on *Enterococcus Faecalis*. J Endod. [Internet] 2003; 29(4):257-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00004770-200304000-00006>
- 10 Gomes BPPA, Pedrosa JA, Jacinto RC, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, De Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. Braz Dent J. [Internet]. 2004; 15(1):30-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-64402004000100006>.
- 11 Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. J Endod [Internet]. 2009; 35:1051-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.04.022>
- 12 Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FLCV, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. Int Endod J. [Internet] 2013;46(8):755-62. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iej.12055>
- 13 Duarte MAH, Ordinola-Zapata R, Bernardes RA, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, *et al.* Influence of calcium hydroxide association on the physical properties of AH Plus. J Endod. [Internet] 2010;36(6):1048-51. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.02.007>
- 14 Miyagak, D.C., de Carvalho, E.M., Robazza, C.R., Chavasco, J.K., Levorato, G.L. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of endodontic sealers. Braz Oral Res. [Internet]. 2006; 20(4):303-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-83242006000400004>