

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**

ANA LÍVIA GOMES CORNÉLIO



**CITOTOXICIDADE E AÇÃO ANTIMICROBIANA DO
CIMENTO PORTLAND ASSOCIADO A DIFERENTES
AGENTES RADIOPACIFICADORES**

Araraquara

2011

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

ANA LÍVIA GOMES CORNÉLIO

**CITOTOXICIDADE, AÇÃO ANTIMICROBIANA E AVALIAÇÃO DO pH
DO CIMENTO PORTLAND ASSOCIADO A DIFERENTES AGENTES
RADIOPACIFICADORES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro-Tanomaru

Araraquara

2011

ANA LÍVIA GOMES CORNÉLIO

**CITOTOXICIDADE, AÇÃO ANTIMICROBIANA E AVALIAÇÃO DO pH
DO CIMENTO PORTLAND ASSOCIADO A DIFERENTES AGENTES
RADIOPACIFICADORES**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Juliane Maria GuerreiroTanomaru

2º Examinador: Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal

3º Examinador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

DADOS CURRICULARES

ANA LÍVIA GOMES CORNÉLIO

NASCIMENTO	01.04.1986 – BAURU/SP
FILIAÇÃO	Fernando Albertini Cornélio Rita Maria Gomes Cornélio
2004-2007	Curso de Graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”(FOAr/UNESP)
2008-2010	Curso de Especialização em Endodontia na Faculdade de Odontologia de Araraquara UNESP/FAEPO
2009-2011	Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”(FOAr/UNESP)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente na minha vida, e tornar tudo possível; A minha família, pelo amor e apoio incondicional; Mãe, Pai, Fer e vó Ana, vocês são tudo pra mim, muito obrigada por existirem em minha vida!

A minha orientadora, profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, pela confiança, orientação e amizade durante a realização deste trabalho.

Ao departamento de odontologia restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, sempre disponíveis e acolhedores.

Ao programa de pós-graduação em Odontologia – área de Endodontia, coordenado pelo prof.Dr. Mário Tanomaru Filho, o qual foi fundamental para a concretização deste trabalho. Agradeço a amizade, paciência e exemplo que é pra todos nós.

Aos demais docentes da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP, Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert, Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho, Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo, Prof. Dr. Milton Carlos Kuga, Profa. Dra. Gisele Faria, pela convivência, ensinamentos e amizade, contribuindo assim pra minha formação e minha vida.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Sempre solícitos e com um sorriso a nos receber.

Aos funcionários da seção de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em especial a Mara, pela grande paciência, ajuda e disposição em todos os momentos que precisei. Aos amigos da pós-graduação Arieli, Adriana, Arnaldo, Arthurro, Carolina, Érika, Flávia,

Gisselle, Guilherme, Loise, Raqueli, Rafael, Regina, Roberta, Rodrigo, Rosymere, Sérgio. Com certeza cada um de vocês me marcou pelo jeito único de ser!

Cito três pessoas em especial, que são a Carolina, Raqueli e Loise. A Carol por ter sido desde a graduação minha companheira de estudos e da vida, agradeço a amizade diária e eterna! A Loise por ter sido uma mestra em ensinamentos, exemplo de vida e companheira em todos os momentos dessa conquista! Além de ter me acolhido em Brasília, onde realizamos uma parte fundamental desse trabalho; a amizade que conquistamos com certeza também será eterna! E a Raqueli, sempre pronta a ajudar, pude contar em um dos momentos que mais precisei!

A Universidade de Brasília (UnB), em especial o departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas desta universidade, que me acolheram e receberam de forma muito especial, aos funcionários do departamento, professores e alunos que ajudaram e se envolveram nesse projeto, em especial a aluna Mariana Campos da Paz.

Agradeço também ao Programa de Pós-graduação em Periodontia, pela permissão e disponibilidade ao laboratório de Biologia Molecular e Celular, fundamental pra realização deste. Em especial ao prof. Dr. Joni Augusto Cirelli e prof. Dr. Carlos Rossa Junior, além dos alunos que estavam sempre solícitos a nos dar uma mão.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos, já que sem o apoio financeiro não seria possível a concretização deste sonho.

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar a Deus. E a duas pessoas especiais em minha vida, minha mãe, companheira e cúmplice, Rita, que sempre me apoiou com todo o amor do mundo, e sempre está lá, todo fim de semana me acolhendo com um carinho eterno. E meu pai, Fernando, sempre orgulhoso, solícito e amoroso com os filhos.

Muito obrigada por mais um sonho concretizado! Vocês foram e são peças fundamentais nessa longa jornada que só se inicia!

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	14
PROPOSIÇÃO.....	23
CAPÍTULO 1.....	26
CAPÍTULO 2.....	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
REFERÊNCIAS.....	80

Resumo



Cornélio ALG. Citotoxicidade e ação antimicrobiana do cimento Portland associado a diferentes agentes radiopacificadores [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

RESUMO

A proposta deste estudo foi investigar a citotoxicidade, ação antimicrobiana e pH do cimento Portland puro (CP) e associações com agentes radiopacificadores: óxido de bismuto (CPBi), óxido de zircônio (CPZir), tungstato de cálcio (CPCa). Para avaliar o potencial citotóxico, foram empregadas linhagens celulares de fibroblastos do ligamento periodontal de camundongos (mPDL) e osteosarcoma de ratos (ROS 17/2.8). Ambas foram expostas por 24 horas a diferentes concentrações do CP fresco, CP associado com radiopacificadores e cimento de óxido de zinco eugenol. Peróxido de hidrogênio foi aplicado como controle positivo para apoptose. A viabilidade após incubação com os cimentos foi avaliada pela atividade da enzima desidrogenase mitocondrial. A morfologia celular foi analisada microscopicamente pelo corante violeta de cresilo, e o mecanismo de morte celular foi determinado pela metodologia de laranja de acridina/brometo de etídio. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA e Tukey post-test ($p < 0.01$). A correlação entre os dois tipos de morte celular e valores de pH foi estabelecido pela correlação linear de Pearson. O ensaio da enzima desidrogenase mitocondrial revelou um padrão significativo de morte celular apenas nas altas concentrações dos eluídos de cimento. CP puro

não foi citotóxico, mesmo na alta concentração de 100mg/ml. As imagens microscópicas mostraram que nenhuma das formulações de CP causaram danos as linhagens celulares. Análises estatísticas dos dados de apoptose/necrose demonstram que CP e CP mais agentes radiopacificadores promoveram morte por necrose estatisticamente significativa apenas em 100mg/ml. Os resultados mostraram que CP associado com óxido de bismuto, óxido de zircônio ou tungstato de cálcio não foram citotóxicos para mPDL ou ROS 17/2.8, e podem ser boas alternativas como agentes radiopacificadores. A ação antimicrobiana e o pH do cimento Portland e agentes radiopacificadores foram avaliadas. Para a ação antimicrobiana utilizamos a difusão em agar. Foram avaliados quanto à ação antimicrobiana: cimento Portland puro, e associações com agentes radiopacificadores (óxido de bismuto, óxido de zircônio e tungstato de cálcio) além do cimento óxido de zinco eugenol (ZOE), pela técnica do poço em duas camadas. Serão utilizadas as seguintes cepas: *Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida Albicans*. As imagens das placas bem iluminadas e com fundo na cor azul, contrastando com a coloração rósea das colônias vivas após o uso do gel de TTC foram digitalizadas e o diâmetro dos halos de inibição formados ao redor do poço foram mensurados com o auxílio do programa Image Tool (UTHSCSA Image Tool for Windows version 3.00). Os resultados foram expressos em médias. Já para a avaliação do pH, foram preparados 10 tubos padronizados preenchidos com os cimentos avaliados, num total de 50 tubos com os mesmos grupos. Após 12, 24, 48 e 72 horas, o pH foi avaliado com um pHmêtro Ultrabasic (Denver Instrument Company, Arvada, Colorado, USA). Os resultados obtidos foram submetidos a um teste de

normalidade, posteriormente submetidos ao teste estatístico paramétrico ANOVA para comparação dos diferentes grupos entre si e ao teste de comparações múltiplas de Tukey, com 5% de significância.

Palavras-chave: Endodontia, apoptose, *Enterococcus faecalis*, testes de citotoxicidade

Abstract

.....

Cornélio ALG. Cytotoxicity and antimicrobial activity of Portland cement with different radiopacifiers agents [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the cytotoxicity, antimicrobial and pH of pure Portland cement (PC), and associations with radiopacifier agents: bismuth oxide (CPBi), zirconium oxide (CPZir), calcium tungstate (CPCA). To assess the potential cytotoxicity, fibroblast cell lines from the periodontal ligament of mice (mPDL) and rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) were used. Both were exposed for 24 hours with different concentrations of fresh PC, PC associated with radiopacifiers and eugenol zinc oxide cement. Hydrogen peroxide was used as a positive control for apoptosis. The viability after incubation with the cements was evaluated by mitochondrial dehydrogenase enzyme activity. Cell morphology was examined microscopically by cresyl violet stain, and the mechanism of cell death was determined by the method of acridine orange / ethidium bromide. The data were statistically analyzed by ANOVA and Tukey post-test ($p < 0.01$). The correlation between the two types of cell death and pH values was established by Pearson linear correlation. The mitochondrial dehydrogenase enzyme assay revealed a significant pattern of cell death only at high concentrations of the eluted cement. Pure PC was not cytotoxic, even at high concentration of 100mg/ml. Microscopic images showed that none of the formulations of PC caused damage cell lines. Statistical analysis of apoptosis/necrosis data showed that PC and PC plus radiopacifiers agents promoted death by necrosis

statistically significant only at 100mg/ml. The results showed that PC associated with bismuth oxide, zirconium oxide or calcium tungstate were not toxic to ROS 17/2.8 or mPDL, and may be good alternatives as radiopacifier agents. The antimicrobial and pH of Portland cement and radiopacifier agents were evaluated. For antimicrobial activity agar diffusion was used. For antimicrobial activity, pure Portland cement, and associations with radiopacifier agents (bismuth oxide, zirconium oxide and calcium tungstate) were used as well as cement zinc oxide eugenol (ZOE) by means of the well method in two layers. The following strains were employed: *Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. The images of the cards and well lit with deep blue color, contrasting with the bright pink color of the colonies after the use of TTC gel. The diameter of inhibition zones formed around the well was measured using the Image Tool (UTHSCSA Image Tool for Windows version 3.00). Results were expressed as means. For the evaluation of pH, 10 standard tubes filled with the same sealers were prepared, resulting in a total of 50 tubes. After 12, 24, 48 and 72 hours, pH was measured with a pH Ultrabasic (Denver Instrument Company, Arvada, Colorado, USA). The results were submitted to a normality test, and then subjected to statistical parametric ANOVA test for comparison of different groups and to the multiple comparison Tukey test at 5% significance level.

Key-words: Endodontics, apoptosis, *Enterococcus faecalis*, cytotoxicity tests

Introdução

INTRODUÇÃO

O MTA (Agregado Trióxido Mineral) é um cimento amplamente utilizado na terapia endodôntica, já que tem sido considerado um material ideal para tratamento de perfurações, cirurgias pararendodônticas, além de outras indicações por apresentar excelentes propriedades biológicas e boas propriedades físicas e químicas.

Finas partículas de silicato tricálcio, tricálcio de alumínio, óxido tricálcio, óxido de bismuto e outros óxidos minerais constituem o pó do MTA que endurece quando reconstituído em água⁴⁰, ou seja, uma formulação bem semelhante ao cimento de Portland utilizado em engenharia civil. A partir da observação de que o principal componente do MTA é de fato o cimento Portland, vários estudos tem sido realizados com o intuito de demonstrar que as propriedades físico-químicas e biológicas dos cimentos MTA e Portland são semelhantes^{15,19,34}. Ambos apresentam boa resposta tecidual, capacidade seladora, além de não serem citotóxicos e genotóxicos^{10,32}. Duarte et al.¹² avaliaram o cimento Portland quanto à liberação de arsênio, o que poderia ser prejudicial aos tecidos, e verificaram que a liberação desse metal foi ínfima, sendo semelhante ao MTA. Esses resultados ainda foram reforçados por Ribeiro et al.³² que não verificaram genotoxicidade in vitro para o cimento Portland e o MTA. Portanto, a maior diferença entre esses materiais é o custo; sendo o cimento Portland uma alternativa economicamente mais viável.

O MTA satisfaz muito das propriedades ideais de um material para preenchimento de perfurações e obturações retrógradas. No entanto, a consistência granular desse material e seu lento tempo de presa dificultam seu uso. Para aumentar a plasticidade, facilitando o manuseio do material, e para diminuir seu tempo de presa, aditivos da indústria do cimento Portland (CP) foram acrescentados primeiro para o CP e depois para o MTA branco ².

Embora viável, o cimento de Portland não mostra radiopacidade suficiente para ser visualizado radiograficamente. Sendo assim, um agente radiopacificador deve ser adicionado em sua composição. Pesquisas estão sendo desenvolvidas para avaliar possíveis agentes radiopacificadores adicionados ao cimento Portland. Duarte et al.¹³, avaliaram diferentes agentes radiopacificadores (óxido de bismuto, óxido de zinco, subnitrito de bismuto, carbonato de bismuto, sulfato de bário, iodofórmio, tungstato de cálcio e óxido de zircônio) demonstrando maior radiopacidade que a dentina, com potencial para adição ao cimento Portland como agentes radiopacificadores. Entretanto, a possibilidade de interferência dos radiopacificadores com as propriedades químicas, biocompatibilidade, e propriedades físicas do cimento Portland devem ser investigadas.

Coomaraswamy et al.⁹, investigaram o efeito do radiopacificador óxido de bismuto (presente no cimento MTA), nas propriedades físicas do cimento Portland e puderam concluir que a adição deste radiopacificador, resultou na deterioração da estabilidade mecânica, pela introdução de falhas e aumento da porosidade. Os autores sugerem a investigação de alternativas para inclusão de um agente radiopacificador no cimento Portland, e os estudos nas propriedades físicas, químicas e biológicas que podem sofrer alteração.

De Deus et al.¹⁰ e Ribeiro et al.³² realizaram testes de biocompatibilidade do MTA e cimento Portland em linhagens celulares e os resultados indicaram nenhum potencial genotóxico e citotóxico respectivamente para estes cimentos.

Braz et al.⁴ avaliaram através do teste do cometa, a genotoxicidade em linfócitos primários humanos depois da exposição a alguns agentes radiopacificadores isoladamente e puderam concluir que todos os radiopacificadores estudados (sulfato de bário, óxido de zircônia e óxido de bismuto) não induziram nenhum dano ao DNA.

Rotineiramente, o teste utilizado para avaliar a citotoxicidade de novos materiais e cimentos endodônticos é o MTT (*3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide*)^{9,21}. Karimjee et al.²⁴ demonstraram que a citotoxicidade do MTA com diferentes veículos, do amálgama de prata e do cimento Fuji II foram avaliadas em cultura de células de ligamento periodontal por meio do MTT (ensaio da enzima desidrogenase mitocondrial) e também pelo ensaio enzimático da lactato desidrogenase mitocondrial. Independente do veículo com o qual o MTA foi associado, este material apresentou os melhores resultados de biocompatibilidade quando comparado aos cimentos resinosos/ionoméricos e amálgama de prata.

Gorduysus et al.¹⁷, estudaram o efeito citotóxico de quatro diferentes materiais endodônticos: ProRoot Agregado trióxido mineral, Diaket, Endion e CYMED 8410 nos fibroblastos do ligamento periodontal humano, comparando a citotoxicidade através do ensaio MTT, indução apoptótica e/ou necrose, e mecanismos apoptóticos. Os resultados sugeriram que o MTA é um material de preenchimento biocompatível. Entretanto, Diaket, Endion, e CYMED

8410 foram tóxicos para fibroblastos PDL in vitro. A principal forma de indução de morte celular por esses materiais de preenchimento foi determinada pela apoptose e/ou necrose.

Sabendo que o MTA é um material de difícil manipulação e inserção, Jafarnia et al.²³, avaliaram a citotoxicidade do MTA empregando vários aditivos com o intuito de melhorar as características de manuseio do MTA. Os aditivos testados incluíram água estéril, solução salina, 5% CaCl₂, Gel K-Y, 2% de lidocaína com 1:100.000 epinefrina (Xylocaina), e 3% de gel NaOCl. A viabilidade celular foi avaliada por teste MTT e calculada em porcentagem sobre o grupo controle. Para o MTA solidificado, não houve diferenças significantes quanto à viabilidade celular entre os vários aditivos por cada período testado. Para o MTA fresco, o gel 3% NaOCl foi o que demonstrou menor viabilidade celular que todos os outros grupos. MTA branco e cinza tiveram resultados similares. Este estudo mostrou que os vários aditivos não tiveram efeito na citotoxicidade do MTA quando ele torna-se solidificado.

Os testes de citotoxicidade em cultura de células têm se tornado um padrão para avaliação da biocompatibilidade de novos fármacos. Alguns são importantes indicadores de potencial carcinogênico, como o teste de aberrações cromossômicas e o de micronúcleos, testes capazes de comprovar danos permanentes no genoma¹³. Em geral esses são realizados após experimentos mais simples terem revelado danos iniciais nas moléculas de DNA ou alteração no metabolismo celular, por exemplo, o teste do cometa e o ensaio enzimático da succinato desidrogenase mitocondrial (MTT), respectivamente⁵.

Além de não demonstrarem citotoxicidade, os materiais endodônticos devem ter ação antimicrobiana, aliada a biocompatibilidade a fim

de evitar o crescimento de microrganismos viáveis que ainda possam estar presentes no processo de cicatrização perirradicular, quando se trata de materiais retrobturadores.

Enterococcus faecalis tem demonstrado ser altamente resistente no sistema de canais radiculares e pode desempenhar um papel importante em falhas endodônticas. Michel et al.³¹, avaliaram a atividade antimicrobiana de quatro cimentos endodônticos sobre *E. faecalis*: Sealapex, Roth 811, Kerr EWT e AH Plus e um disco de ampicilina como controle. As zonas de inibição foram medidas em 24 e 48h. Roth 811 mostrou a maior zona de inibição, seguido por Sealapex e Kerr EWT, enquanto AH-Plus não mostrou atividade antimicrobiana.

Sealapex é um material endodôntico com boas propriedades biológicas^{20,29}. A atividade antimicrobiana desse material tem sido relatada^{28,34}. Quando o Sealapex é utilizado como cimento endodôntico para retrobturação dos canais radiculares, o óxido de zinco é adicionado para melhorar a consistência do material e facilitar seu uso clínico²⁵. Outro material bastante estudado, é o Agregado trióxido mineral (MTA), que além de boa capacidade de vedação²⁶, apresentou atividade antimicrobiana em estudo realizado por Ribeiro et al.³³, onde testaram a hipótese de que a atividade antimicrobiana do MTA cinza e MTA branco, estão relacionadas com a indução de espécies reativas de oxigênio (ROS). Utilizaram *E. coli* mutante (AB2463-RecA13), triplo mutante (BW535) e silvestres (AB1157) no método de difusão em ágar *Müller-Hinton* (MHA). O dano causado ao DNA do plasmídeo na presença do cimento foi avaliado por meio de eletroforese em gel (0.8% agarose). Foi possível observar uma zona de inibição em condições aeróbias promovidas por ambos os cimentos em ambas as *E. coli* mutante, mas não na *E. coli* do tipo selvagem. Por

outro lado, ambos os cimentos não foram capazes de induzir qualquer inibição bacteriana em condições anaeróbias, sugerindo que a ação inibitória é um resultado da produção de ROS.

Já, Hasan et al.¹⁸ compararam a atividade antimicrobiana do NEC (cimento experimental novo), MTA (Agregado trióxido mineral) e cimento Portland em diferentes concentrações com cinco microrganismos diferentes no método de difusão em ágar e concluíram que o NEC criou uma zona de inibição maior que MTA e cimento Portland, sendo, portanto, um material com grande potencial de inibição do crescimento bacteriano. Além de MTA e cimento Portland, Tanomaru-filho et al.³⁷, compararam estes cimentos com outros utilizados rotineiramente como materiais retrobturadores: Sealer 26, Sealapex com óxido de zinco, óxido de zinco eugenol, portland branco e cinza, MTA-Angelus branco e cinza e MTA-ProRoot cinza, contra cinco cepas de microrganismos diferentes. Sealapex com óxido de zinco, óxido de zinco e eugenol e Sealer 26 apresentaram halos de inibição maior do que os cimentos a base de MTA e Portland. Com base na metodologia utilizada, pode-se concluir que todos os cimentos endodônticos, a base de MTA e Portland avaliados neste estudo possuem atividade antimicrobiana, em especial os cimentos endodônticos.

Outros dez cimentos endodônticos foram avaliados conforme a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar: (Apexit plus, Tubli Seal Xpress, Endoflas FS, Endomethasone, Endomethasone N, AH Plus, Epiphany, EndoRez, Ketac Endo, Roeko Seal) contra *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Endoflas FS apresentou as maiores halos de inibição contra *E. faecalis* e *Candida Albicans*. Todos os cimentos (exceto AH Plus, Epiphany e

Seal Roeko) demonstraram maior ação antimicrobiana nas primeiras 24 horas após a manipulação ³³.

Também estudando atividade antimicrobiana de materiais retrobturadores, Eldeniz et al.¹⁴, selecionaram o Amálgama, ProRoot MTA (Agregado trióxido mineral), IRM (Material restaurativo intermediário), Super Bond C & B, Geristore, Dyract, Clearfil APX composto com SE Bond, James Bond ou Protect. Foi utilizado o teste de contato direto (DCT) e as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. IRM e MTA ProRoot foram em geral, mais potentes inibidores do crescimento de bactérias do que os outros materiais testados.

A atividade antimicrobiana parece estar associada ao pH elevado. É conhecido que níveis de pH ao redor de 12.0 pode inibir alguns microrganismos, incluindo bactérias resistentes como *Enterococcus faecalis* ⁸. Além da atividade antimicrobiana, o pH alcalino favorece e estimula o processo de mineralização, ativando a fosfatase alcalina, favorecendo a deposição de tecido mineralizado. Para isso é importante que o material retrobturador apresente capacidade de alcalinização e liberação de íons cálcio ^{16,20,21}.

Bortoluzzi et al.^{1,2} avaliaram a influência da adição de 10% cloreto de cálcio (CaCl₂) indicado como acelerador do pH e liberação de íons cálcio de materiais comercialmente disponíveis: MTA ProRoot, MTA Branco e cimento Portland branco. A adição indicou aumento imediato do pH, embora os resultados foram muito semelhantes quando analisados nos demais intervalos. Os resultados revelaram que a adição de CaCl₂ ao MTA melhorou as propriedades físico-químicas desse material.

Já, Tanomaru-filho et al.⁴⁰ analisaram o pH e liberação de íons cálcio de materiais retrobturadores que contém hidróxido de cálcio e mineral trióxido agregado (MTA). O pH dos cimentos: Sealer 26 (S26), Agregado trióxido mineral branco (MTA), Endo CPM Sealer (CPM1), ENDO CPM Sealer numa consistência mais espessa (CPM 2), e o cimento de óxido de zinco eugenol (ZOE) foram avaliados. Em todos os períodos, o ZOE apresentou a menor liberação de íons hidroxila. Uma maior liberação de íons cálcio foi observada para CPM2, seguido por CPM1 em 14 dias e para S26, CPM1 e CPM2 aos 28 dias. Sealer 26, MTA e cimento Endo CPM na consistência normal ou espessa liberaram íons cálcio e hidroxila, demonstrando portanto que o cimento Endo CPM pode ser uma alternativa como material retrobturador.

A introdução dos cimentos endodônticos contendo hidróxido de cálcio e MTA, justifica o desenvolvimento de estudos sobre o efeito antimicrobiano e pH desses materiais e respectivos componentes, a fim de melhor compreender as propriedades dos cimentos e para determinar qual componente corresponde a qual efeito observado.

Assim, partindo de agentes radiopacificadores conhecidos e que já demonstraram resultados satisfatórios (quanto à radiopacidade), testes de citotoxicidade, ação antimicrobiana e pH podem identificar quais apresentam maior potencial biológico para utilização em humanos. Diante dessa problemática, o objetivo geral deste projeto é avaliar a citotoxicidade, ação antimicrobiana e pH do cimento Portland, agentes radiopacificadores e associações, além do cimento de óxido de zinco e eugenol (Endofill) como controle positivo.

Proposição



PROPOSIÇÃO

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Avaliar a citotoxicidade do cimento Portland e associações com diferentes agentes radiopacificadores em duas linhagens celulares: mPDL e ROS 17/2.8 através dos ensaios MTT, morfologia celular e detecção de apoptose/necrose por laranja de acridina/brometo de etídio.
2. Avaliar in vitro a ação antimicrobiana pelo método de difusão em ágar e avaliação do pH do cimento Portland e associações com diferentes agentes radiopacificadores.

**CITOTOXICIDADE DO CIMENTO PORTLAND
ASSOCIADO A DIFERENTES AGENTES
RADIOPACIFICADORES: UM ESTUDO DA MORTE
CELULAR***

Capítulo 1

.....

***Artigo aceito para publicação no periódico Journal of Endodontics**

RESUMO

O principal objetivo deste estudo foi investigar a citotoxicidade do cimento Portland (CP) sozinho ou associado ao óxido de bismuto (CPBi), óxido de zircônio (CPZir) e tungstato de cálcio (CPCa) em duas linhagens celulares.

Métodos: Células do ligamento peridontal murino (mPDL) e células de osteossarcoma de rato (ROS 17/2.8) foram expostos por 24 horas a concentrações específicas de eluídos do CP fresco e associações do CP com radiopacificadores. Tratamento com cimento de óxido de zinco e eugenol (ZOE) e peróxido de hidrogênio foram aplicados como controle positivo de citotoxicidade. A viabilidade celular após incubação com os cimentos foi avaliada por meio do ensaio enzimático da desidrogenase mitocondrial. A morfologia celular foi microscopicamente analisada pela coloração violeta de cresilo, e o mecanismo de morte celular foi determinada pela coloração com laranja de acridina/brometo de etídio. Todos os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA e Tukey post-hoc ($p < 0,01$). A correlação entre a morte celular por apoptose ou necrose e valores de pH foi estabelecido pelo coeficiente linear de Pearson. **Resultados:** O ensaio da enzima desidrogenase mitocondrial revelou taxa de morte celular significativa apenas em altas concentrações dos eluídos de cimento. O CP puro não foi citotóxico, mesmo na concentração de 100mg/ml. As imagens microscópicas mostraram que nenhuma das formulações CP causaram danos a quaisquer linhagens celulares. A análise estatística dos dados de apoptose/necrose demonstraram que CP e CP mais agentes radiopacificadores promoveram resultados significativos de morte celular por necrose na concentração de 100mg/ml. **Conclusões:** As células mPDL foram mais

sensíveis que ROS17/2.8. Os resultados mostraram que o CP associado ao óxido de bismuto, óxido de zircônio, ou tungstato de cálcio não são citotóxicos para mPDL ou ROS17/2.8. O óxido de zircônio e o tungstato de cálcio podem ser boas alternativas como agentes radiopacificadores.

Palavras-chave: cimento Portland, agentes radiopacificadores, citotoxicidade, apoptose

ABSTRACT

The main purpose of this study was to investigate the cytotoxicity of white Portland cement (PC) alone or associated with bismuth oxide (PCBi), zirconium oxide (PCZir) and calcium tungstate (PCCa) in two cell lineages. Methods: Murine periodontal ligament cells (mPDL) and rat osteosarcoma cells (ROS 17/2.8) were exposed for 24 hours to specific concentrations of fresh PC and PC associations with radiopacifiers. Zinc eugenol cement and hydrogen peroxide treatment were applied as cytotoxic positive controls. Cell viability after incubation with the cements was assessed by mitochondrial dehydrogenase enzymatic assay. Cell morphology was microscopically analyzed by cresyl violet staining, and the mechanism of cell death was determined by acridine orange/ethidium bromide methodology. All data were analyzed statistically by ANOVA and Tukey's post-test ($p < 0.05$). The correlation among cell death by apoptosis or necrosis and pH values was established by Pearson's linear coefficient. Results: The mitochondrial dehydrogenase enzymatic assay only revealed significant cell death rate at high concentrations of cement elutes. PC alone was not cytotoxic, even at 100mg/ml. Microscopic images showed that none of the PC formulations

caused damage to any cell lines. Statistical analysis of apoptosis/necrosis data demonstrated that PC and PC plus radiopacifying agents promoted significant necrosis cell death only at 100mg/ml. Conclusions: The mPDL cells were more sensitive than ROS17/2.8. The results showed that PC associated with bismuth oxide, zirconium oxide, or calcium tungstate is not cytotoxic to mPDL or ROS17/2.8. Zirconium oxide and calcium tungstate may be good alternatives as radiopacifying agents.

Key- words: *Portland cement, radiopacifying agent, cytotoxicity, and apoptosis.*

INTRODUÇÃO

O material retrobturador endodôntico ideal deve possuir propriedades físicas, químicas e biológicas específicas, tais como radiopacidade, estabilidade química, ação antibacteriana e biocompatibilidade. Esses materiais não devem ser citotóxicos, a fim de promover a cicatrização dos tecidos periapicais. No final dos anos 90, um novo cimento endodôntico, agregado trióxido mineral (MTA), foi desenvolvido na Universidade de Loma Linda. Estudos mais recentes têm mostrado que este material preenche os requisitos básicos de um material endodôntico e, por esta razão, o MTA tem sido considerado o material de escolha para preenchimento radicular (1). Além disso, o MTA tem sido utilizado com sucesso para reparação de perfurações radiculares e como agente de capeamento pulpar (2,3).

Embora a composição básica do MTA seja o cimento Portland (CP), é um material razoavelmente caro e apresenta dificuldade de manipulação (4). O uso do MTA têm sido muito limitado devido a seu longo tempo de presa,

inadequada resistência à compressão e seu pobre tempo de trabalho (5). Portanto, pesquisas continuam a desenvolver cimentos a base de Portland e cimentos endodônticos com baixo custo e propriedades ainda melhores que o MTA. Vários estudos foram realizados para demonstrar que não somente o MTA, mas também seu componente básico CP, possuem excelentes propriedades biológicas (6,7). Ambos os cimentos são capazes de promover resposta celular favorável à reparação de tecidos ósseos e dentais, incluindo o reforço da expressão gênica de importantes fatores osteogênicos, tais como proteínas morfogenéticas ósseas e síntese de proteínas colágenas (8-10). A única desvantagem do CP é a falta de radiopacidade. Assim, para desenvolver cimentos a base de CP ou cimentos endodônticos, a associação de um agente radiopacificador é um requisito para atender as normas ISO para materiais endodônticos.

Estudos anteriores (11,12) têm avaliado a radiopacidade do CP cinza e do CP branco associado ao óxido de bismuto (Bi_2O_3), óxido de zinco (ZnO), óxido de chumbo, subnitrito de bismuto, carbonato de bismuto $\text{Bi}_2(\text{CO}_3)_3$, sulfato de bário (BaSO_4), iodofórmio (CHI_3), tungstato de cálcio (CaWO_4) e óxido de zircônio (ZrO_2). Exceto para PC + BaSO_4 , todas as substâncias testadas apresentaram maior radiopacidade que a dentina, sendo, portanto, sugeridas como potenciais agentes radiopacificadores para formulações baseadas em CP. Embora estes estudos tenham demonstrado que todas essas substâncias são capazes de promover radiopacidade satisfatória, os potenciais de interferência com propriedades químicas, físicas e biológicas do CP devem ser investigadas. Quanto à biocompatibilidade, produtos de degradação e substâncias de eluição para cimentos endodônticos podem ter acesso aos tecidos periodontais de

várias formas (13) e afetar o processo de cura em função da sua citotoxicidade. Compostos citotóxicos dos materiais retrobturadores podem influenciar na viabilidade das células perirradiculares e causar a morte celular por apoptose ou necrose. Enquanto a necrose é um processo irreversível, causado pelo efeito destrutivo das células letalmente danificadas, a apoptose pode ser desencadeada por diversas causas. Um dos maiores indutores de apoptose são os danos irreparáveis ao DNA, aberrações no metabolismo celular, os glicocorticóides, os radicais livres e o influxo de cálcio (14). A apoptose é caracterizada pela sucção da superfície celular, condensação e clivagem do DNA cromossomal e de expressão dos fatores de reconhecimento para fagocitose que finalmente eliminam as células apoptóticas sem inflamação (15). É um processo ubíquo de morte celular, que representa uma forma de suicídio celular. Apoptose está normalmente envolvida nos órgãos e desenvolvimento dos tecidos e também na progressão das doenças bucais (14). Portanto, é importante analisar o mecanismo de morte celular que os materiais odontológicos citotóxicos podem induzir.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito citotóxico de três diferentes agentes radiopacificadores associados ao CP branco em duas linhagens de células, células do ligamento peridontal murino (mPDL) e células de osteossarcoma de rato (ROS 17/2.8). Após a exposição a concentrações específicas de eluidos do cimento fresco, a viabilidade celular foi avaliada por teste MTT. A morfologia celular foi microscopicamente analisada pelo corante violeta de cresilo o tipo de morte celular por necrose ou apoptose foi quantificada pela metodologia de coloração dupla laranja de acridina / brometo de etídio.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem celular e condições de cultura

Duas linhagens celulares, fibroblastos de murino da linhagem mPDL imortalizados pelo vírus 40 antígeno T grande (cedido por Dr. Martha Somerman, Universidade de Washington, Seattle, WA) e ROS 17/2.8, foram cultivados como monocamadas em frascos T-75 (Corning, Cidade de União, CA) contendo meio RPMI 1640(Gibco BRL, Gaithersburg, MD) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina (100IU/ml), e estreptomicina (100µg/ml). As células foram subcultivadas duas vezes por semana a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂. As células aderidas numa fase logarítmica de desenvolvimento foram destacadas pela mistura de tripsina/ácido etilenodiaminotetracético (0.25%) a 37°C por 2 minutos (todas as fontes de cultura por Gibco BRL, Gaithersburg, MD). As células coletadas foram passadas em placas de 24 poços (Corning), numa densidade de 3x10⁴ células por poço, determinado através de hemocítômetro. As células foram então, incubadas nas mesmas condições descritas acima por 24 horas, para obter o crescimento exponencial antes da exposição aos eluídos de cimentos, quando o meio de cultura das células aderidas for trocado por 1mL das amostras de eluídos dos cimentos ou somente meio de cultura (controle) e incubados por mais 24 horas. Todos os experimentos ocorreram em triplicata.

Preparo dos materiais a serem testados

Vários materiais foram testados: CP branco (Votorantim, SP, Brasil), CP branco associado com óxido de bismuto, CP branco associado com óxido de zircônio, CP branco associado ao tungstato de cálcio e cimento de óxido de zinco eugenol (ZOE, como controle citotóxico). Os agentes radiopacificadores (Sigma Aldrich, St Louis, MO) foram adicionados ao CP numa proporção de 20% por peso. Todos os cimentos foram preparados pela mistura de 1g (pó): 320 µl do veículo (Água MilliQ) em placas de vidro estéreis. Após o preparo, 12.5g de cada material teste foi pesado e colocado em tubos Falcon de 50 ml (BD Company, Franklin Lakes, NJ) e expostos a luz UV por 15 minutos com a finalidade de prevenir a contaminação bacteriana. Os tubos Falcon contendo a amostra dos cimentos foram preenchidos com 25 ml de meio RPMI e incubados por 2 horas à 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂ para obter soluções estoque de eluídos do cimento fresco (500 mg do cimento preparado/mL de RPMI). Posteriormente, outras diluições de eluídos dos cimentos foram preparadas em RPMI para ser usado em diferentes ensaios (solução estoque: 1/5, 1/50, 1/500, 1/5000). Nos experimentos de morfologia e apoptose/necrose, três concentrações de eluídos foram selecionadas para exposição das células de acordo com a relação dose/resposta revelada pelo ensaio enzimático da desidrogenase mitocondrial: 1, 10 e 100 mg/ml.

Ensaio MTT

Esse ensaio é baseado na habilidade da enzima mitocondrial em converter o sal que tem a cor amarela e é solúvel em água 3-(4,5-*dimethyl-thiazoyl*)-2,5-*diphenyl-tetrazolium bromide* (MTT; Sigma Chemicals, St Louis, MO) em compostos coloridos de formazan, cuja absorbância é proporcional a quantidade de células vivas. Após 24 horas em cultura celular com os eluídos dos cimentos (0.1, 1, 10, 100 e 500mg/ml) e controles, o meio foi trocado por RPMI contendo 0.55 mg/ml de MTT e as placas foram incubadas por 4 horas. Depois disso, cada poço foi lavado com 1 ml de tampão fosfato (PBS 1X) e 500 µl de álcool isopropílico acifado (HCl: isopropyl alcohol, 0.04N) foi adicionado ao extrato para solubilizar o formazan. A densidade óptica (OD) 590nm foi mensurada em leitor de microplacas automático (ELx800; Instrumentos Bio-Tek, Winooski, VT). As planilhas foram importadas para o Excel (Office 2007; Microsoft Corporation, Redmond, WA) e os dados submetidos a análises estatísticas.

Análise morfológica por microscopia óptica

Após a exposição aos eluídos dos cimentos nas concentrações de 1, 10 e 100 mg/ml, as células aderentes foram lavadas com PBS e fixadas diretamente nos poços das placas de cultura por 10 minutos com 2% de formaldeído em tampão fosfato e mantidas por 5 minutos com 0.2% de violeta de Cresilo em etanol 20%. As células foram analisadas e fotografadas imediatamente após o preparo utilizando um microscópio invertido Axiovert 100 em 40x (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Detecção de Apoptose e Necrose

A fim de avaliar a frequência de cada mecanismo de morte celular, mPDL e ROS 17/2.8 foram tratadas com peróxido de Hidrogênio- H_2O_2 (1mmol/L) por 1 hora a 37°C, 95% umidade, e 5% CO_2 (controle positivo para apoptose). As células dos diferentes grupos testados e controles foram coletadas individualmente, centrifugadas e suspensas em PBS1X. Vinte microlitros da suspensão celular (10^5 - 10^6 células) foram coradas com a solução de laranja de acridina (100 g/mL)/ brometo de etídio (100 g/ml) 1:1 por 5 minutos. As células ($n=300$ por linhagem de células/ grupo de eluídos do cimento ou controles) foram então examinadas usando um microscópio de fluorescência (barrier filter O 530 NM, objetiva de 40x; Olympus, Center Valley, PA). O número de células apoptóticas, necróticas e vivas foi determinado de acordo com critérios previamente estabelecidos (16). O corante laranja de acridina penetra nas células vivas e mortas, resultando na emissão de fluorescência verde por intercalar na dupla fita de DNA, e fluorescência vermelha após a ligação com RNA fita simples. O brometo de etídio emite fluorescência vermelha após intercalar no DNA de células com membrana celular alterada. Assim, quatro etapas de células podem ser identificados por este teste (Fig. 1): Células vivas, com núcleo uniformemente verde (Fig. 1A, E); apoptose precoce (membrana celular ainda está preservada, mas a condensação da cromatina e um núcleo irregular verde são visíveis) (Fig. 1B, F); apoptose tardia (brometo de etídio penetra através das membranas celulares alteradas e o núcleo cora em laranja, enquanto que a fragmentação ou a condensação da cromatina ainda é observada) (Fig. 1C, G); e necrose (núcleo celular corado uniforme de laranja / vermelho) (Fig. 1D, H). O pH de cada eluído do cimento foi medido antes da

incubação das células para este ensaio (Monitor pH, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

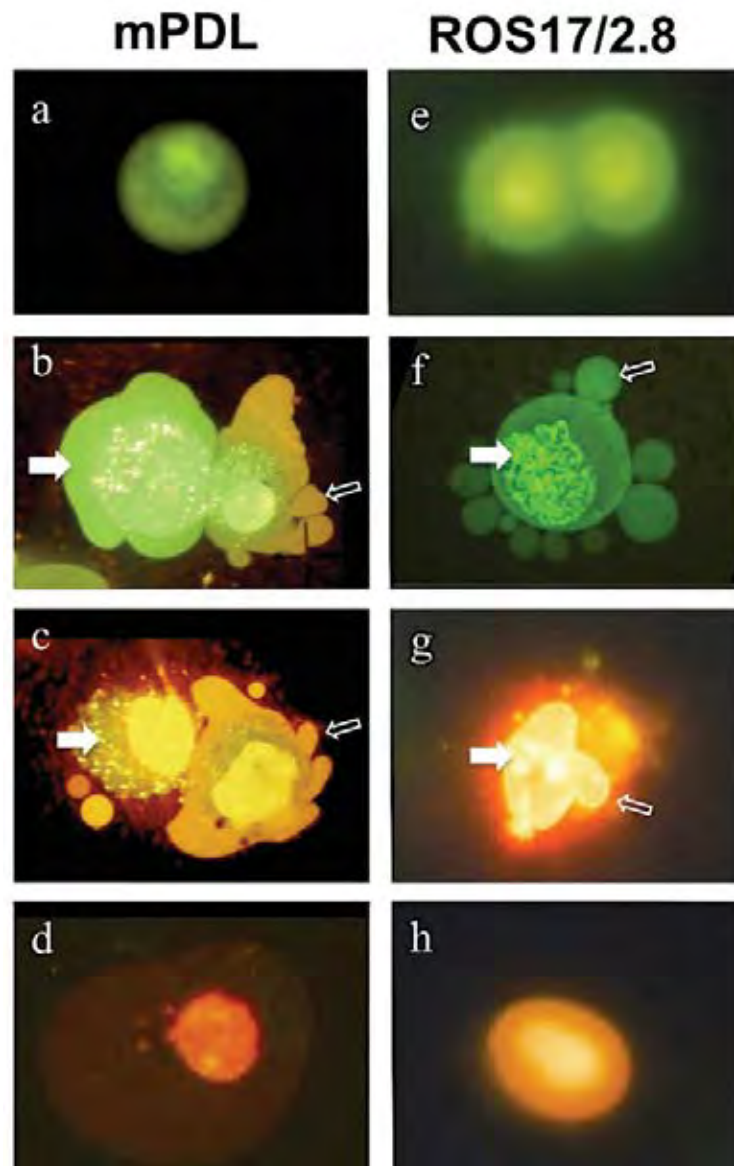


Fig. 1. Microscopia de fluorescência das células mPDL e ROS 17/2.8 coradas com laranja de acridina e brometo de etídio. mPDL: (A) células viáveis; (B,C) células apoptóticas; (D) célula necrótica. ROS 17/2.8: (E) células viáveis; (F,G) células apoptóticas; (H) célula necrótica. Setas abertas indicam corpos apoptóticos e setas preenchidas indicam condensação da cromatina. Imagens de células viáveis e necróticas são do grupo CP. Imagens de apoptose recente

(B,F) são do tratamento com H₂O₂ (controle positivo para apoptose) e imagens de apoptose tardia (C,G) são do tratamento com ZOE.

Análises estatísticas

Ambos os resultados do MTT e dados da coloração com laranja de acridina/ brometo de etídio foram avaliados por análise de variância (ANOVA). As diferenças das médias entre todos os grupos tratados foram comparadas pelo teste de TUKEY HSD Teste *Post-Hoc*. A associação entre os valores de pH e frequência de cada mecanismo de morte celular foi estabelecido por correlação linear de Pearson. As diferenças foram consideradas significativas em $p < .05$.

RESULTADOS

Viabilidade celular

Os testes de viabilidade celular para mPDL e ROS 17/2.8, mostraram uma taxa de sobrevivência (taxa de viabilidade % = OD da amostra testada x 100/OD do controle) mais de 100% para o grupo de eluído do CP puro mesmo na alta concentração de 100 mg/ml enquanto os resultados de CP/agentes radiopacificadores indicaram uma diminuição dose-dependente das células, nas maiores concentrações de 100 e 500 mg/ml. Os grupos expostos ao cimento ZOE apresentaram um decaimento significativo de sobrevivência a partir de 10 mg/ml, especialmente para mPDLs (Fig. 2).

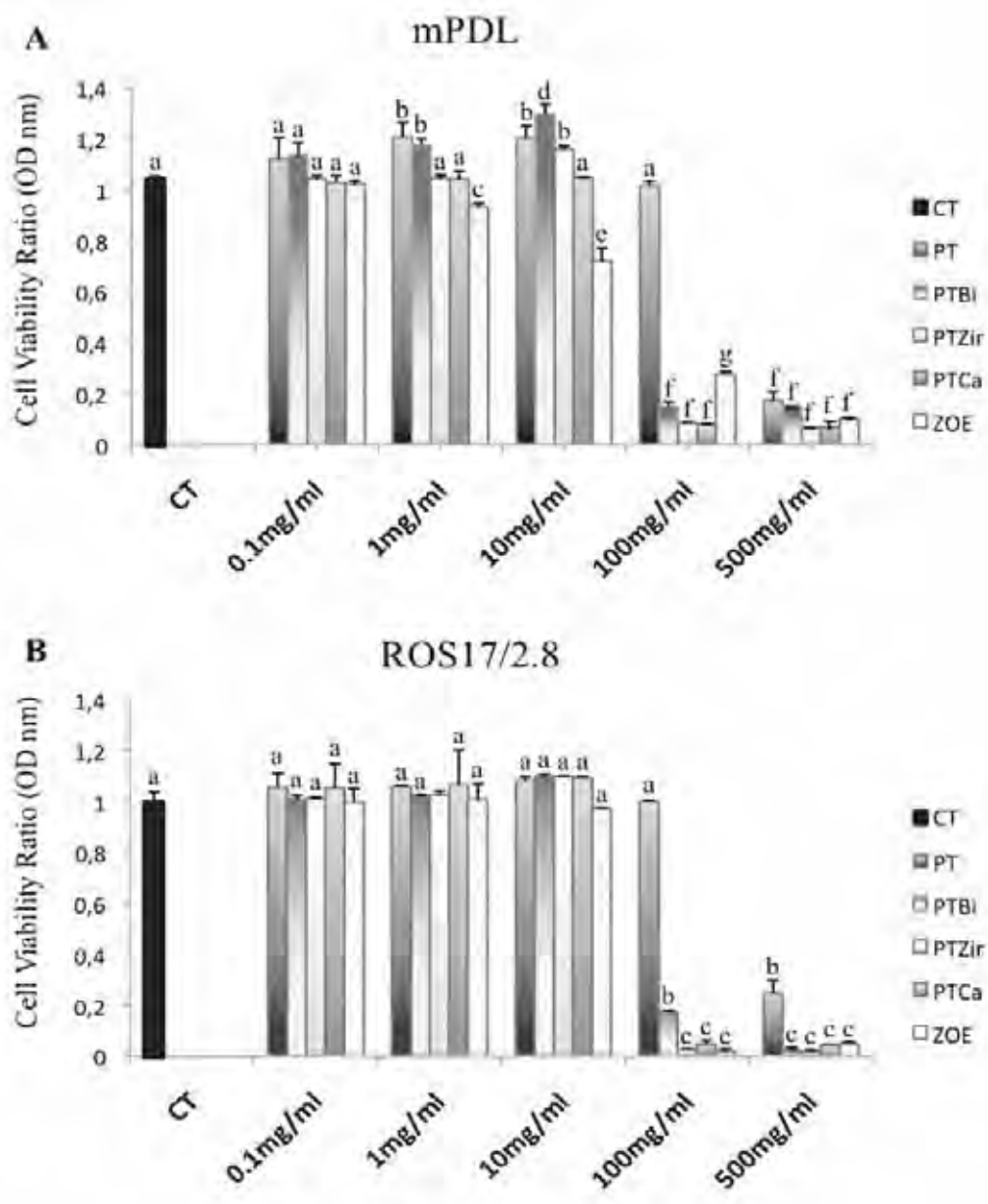


FIG. 2. OD das linhagens celulares viáveis de mPDL e ROS17/2.8 após serem cultivadas com os eluídos dos cimentos. Imagens de dois experimentos independentes representando os resultados obtidos em triplicata para cada grupo mostrado. Células sem nenhum eluído do cimento, representa o grupo controle (CT), eluído do CP (PT), CP mais óxido de bismuto (PTBi), CP mais óxido de zircônio (PTZir), CP mais tungstato de cálcio (PTCa) e eluídos do cimento óxido de zinco eugenol (ZOE). Média +/- SEM (n=3). Barras com

diferentes letras representam diferenças significantes entre todos os tratamentos com os eluídos do cimento e grupo controle. ANOVA, Tukey ($p < .05$).

Análise morfológica

Ambas as linhagens celulares dos controles mostraram formas poligonais que, dependendo da confluência da cultura celular, pareciam ligeiramente alongadas, com projeções citoplasmáticas ligando uma célula a outra (Fig.3). O núcleo celular se mostrou com formato esférico ou ovóide, com a cromatina fina e ligeiramente granular, e presença de um ou mais nucléolos. Quando as células foram tratadas com CP sozinho ou CP/agentes radiopacificadores até a concentração de 10 mg/mL não houve diferença nas características morfológicas em relação ao controle. Na concentração de 100 mg / mL, as células sugeriram aspecto necrótico, como a perda da permeabilidade da membrana plasmática, podendo ser visto junto com células viáveis. Por outro lado, as células mPDL do grupo ZOE em 10 mg/mL e ROS 17/2.8 em 100 mg/mL mostrou características morfológicas relacionadas à apoptose, como condensação da cromatina, perda do volume citoplasmático, presença de vacúolos e mudanças na simetria da membrana.

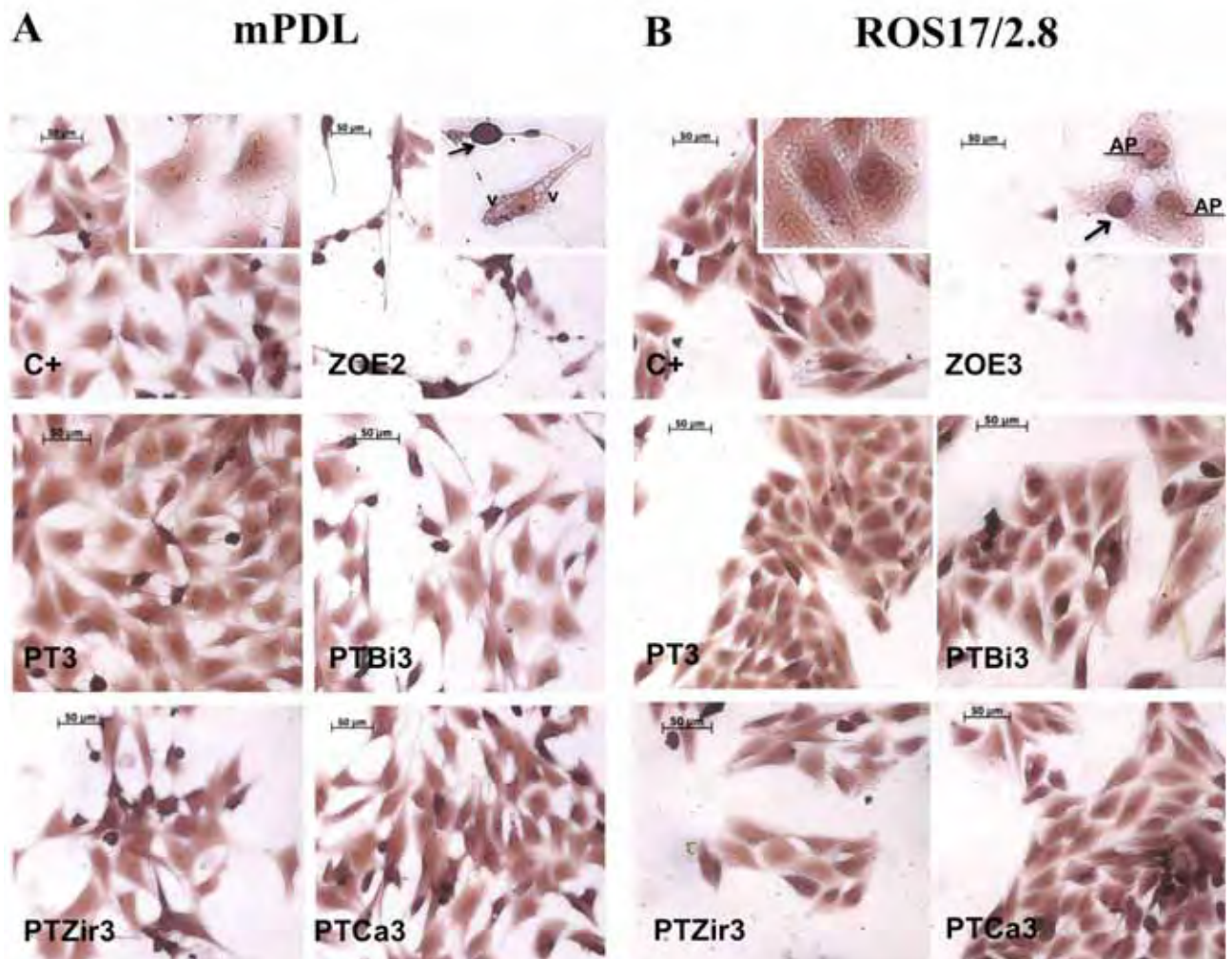


FIG. 3. Micrografia representativa das células mPDL e ROS 17/2.8 coradas com violeta de cresilo. Células não-tratadas (C+), Células tratadas CP 100 mg/ml (PT3), Células tratadas com CP mais óxido de zircônio 100 mg/ml (PTZir3), Células tratadas com ZOE 10 mg/ml (ZOE2), Células tratadas com CP mais óxido de bismuto 100mg/ml (PTBi3), Células tratadas com CP mais tungstato de Cálcio 100mg/ml (PTCa3), Células tratadas com ZOE 100 mg/ml (ZOE3), vacúolos (v), células com condensação da cromatina e perda do volume citoplasmático (setas), formação de corpos apoptóticos (AP). Barra= 50 µm.

Detecção de apoptose e necrose

As análises estatísticas ANOVA e teste de Tukey para os dados de apoptose e necrose (Fig.4) demonstraram que o CP e associações do CP/agentes radiopacificadores promoveram diferença estatística somente na morte celular por necrose das células mPDL e ROS 17/2.8 nas maiores concentrações de 100 mg/ml, comparado com o grupo controle negativo (células sem tratamento). Essa predominância de morte celular por necrose foi associada a elevados valores de pH, ($\text{pH} > 10$), segundo correlação linear ($r = 0,9$). Não houve correlação entre os valores de pH e morte celular por apoptose. De acordo com esta análise, a morte celular por apoptose foi estatisticamente significativa apenas no grupo ZOE, que mostrou médias diferentes do controle negativo mas similar aos do grupo controle citotóxico (tratamento H_2O_2).

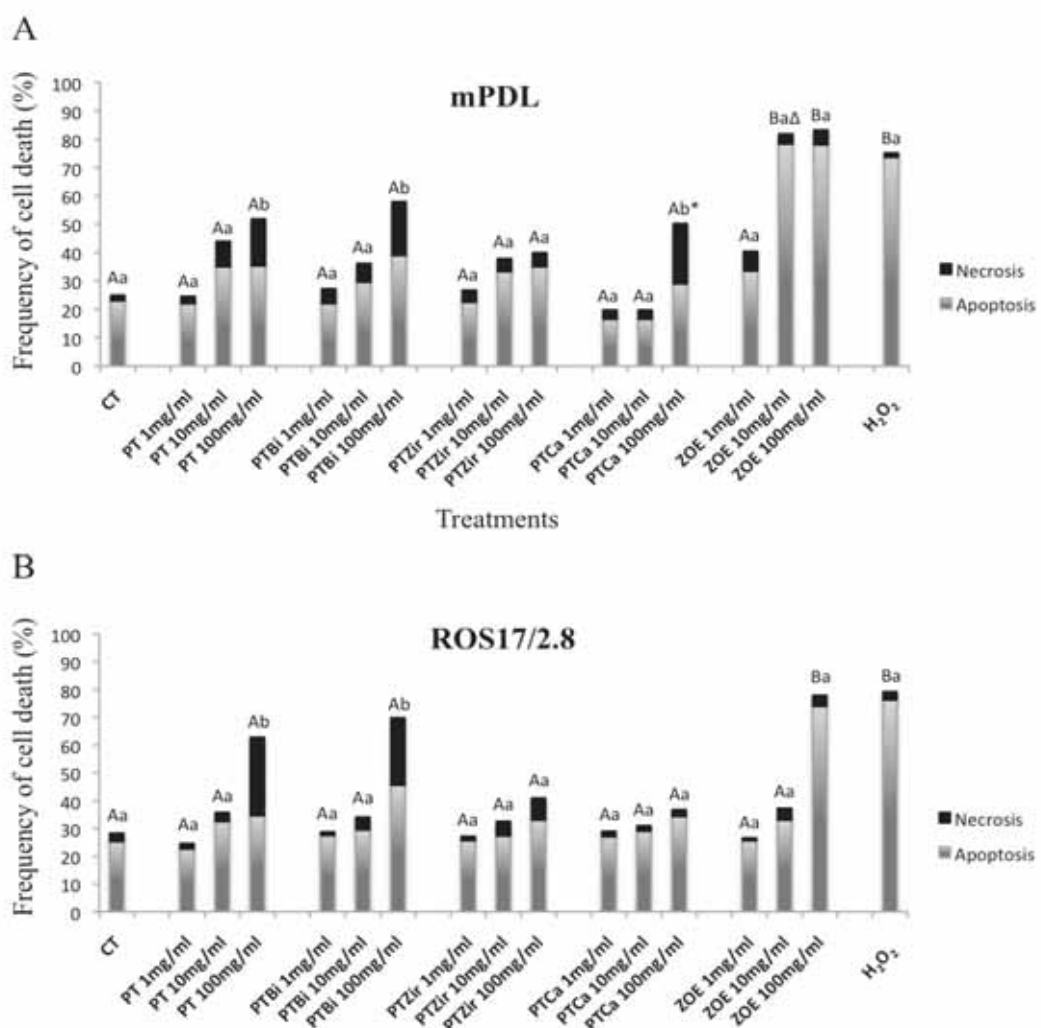


FIG. 4. Teste da coloração com laranja de acridina/brometo de etídio com as linhagens celulares mPDL e ROS 17/2.8. Frequência da morte celular por apoptose (cinza) e necrose (preto). CT é o grupo controle negativo para apoptose/necrose (células cultivadas somente no RPMI); PT, cimento Portland; PTBi, CP associado com óxido de bismuto; PTZir, CP com óxido de zircônio; PTCa, CP com tungstato de cálcio; ZOE, tratamento com cimento de óxido de zinco eugenol (todos com 1, 10 e 100 mg/ml, respectivamente). H₂O₂: Peróxido de hidrogênio (controle positivo para apoptose). Médias com diferentes letras representam diferenças estatísticas significantes em comparação com os respectivos grupos controle. (“A” e “B” para apoptose e “a” e “b” para necrose, os diferentes símbolos representam diferenças estatísticas entre o mesmo tratamento para as duas linhagens celulares, necrose “*” e apoptose “Δ”; p < .05).

Concentration	Elute-media pH				
	PT	PTBi	PTZir	PTCa	ZOE
1mg/ml	8.7	8.7	8.7	8.3	8.3
10mg/ml	9.0	8.8	8.9	8.8	8.3
100mg/ml	12.1	11.9	9.9	10.3	8.5

Tabela 1. pH dos eluídos dos cimentos

DISCUSSÃO

Dentro da revolução científica e tecnológica nos últimos anos, os cimentos endodônticos a base de CP, estão conquistando seu espaço entre suas diversas indicações: cimento obturador endodôntico (17), cimento retrobturador (cirurgia parendodôntica) (18), perfurações radiculares (19), entre outros. Embora vários estudos tenham mostrado que o CP é biocompatível, apresentando uma capacidade adequada de mineralização e do potencial para ser utilizado como material endodôntico (20), CP em si, apresenta baixa radiopacidade comparado ao osso adjacente e estruturas dentais (21). Por esta razão, uma substância radiopacificadora deve ser associada à fórmula do CP. Dependendo da proporção do radiopacificador adicionado ao CP, este pode afetar negativamente as constantes do material, reduzir a resistência à compressão e, conseqüentemente, modificar as suas propriedades biológicas (22,23). Por exemplo, o radiopacificador óxido de bismuto (componente do MTA) pode ser genotóxico, dependendo da concentração. Óxido de bismuto apresentou resultados positivos no teste de aberrações cromossômicas para genotoxicidade em células de mamíferos cultivadas (24). De acordo com estes achados, a associação de CP com radiopacificadores devem ser submetidos a testes de biocompatibilidade, a fim de analisar possíveis efeitos citotóxicos para os tecidos periapicais (25). A maioria dos estudos focados na avaliação das propriedades biológicas para os cimentos a base de Portland foram realizados com o cimento tomado presa. Alguns estudos têm mostrado diferenças significativas na toxicidade quando comparados cimentos endodônticos frescos com os mesmos cimentos após a presa. Cimentos endodônticos duais

demonstraram pouco ou nenhum efeito citotóxico após a presa. Os mesmos cimentos, quando testados como misturas frescas, apresentaram níveis elevados de citotoxicidade (26). No presente trabalho, a citotoxicidade de três agentes radiopacificadores associados com o CP foram avaliados através da exposição das células aos eluídos de cimento fresco. Duas linhagens de células foram escolhidas, uma vez que as células provenientes de tecidos diferentes podem apresentar comportamentos distintos quando expostos a testes citotóxicos (27). Além disso, experimentos envolvendo o uso dos fibroblastos do ligamento periodontal (mPDL) e osteoblastos (ROS17/2.8) foram considerados relevantes para este estudo, já que são da mesma linhagem das células que *in vivo* entram em contato direto com cimentos endodônticos. Além disso, essas são as células envolvidas na cicatrização de tecidos perirradiculares após o tratamento endodôntico.

A taxa de viabilidade celular foi determinada por ensaio enzimático da desidrogenase mitocondrial. O MTT é um teste padrão para avaliar a citotoxicidade de novos fármacos e tem sido rotineiramente usado para testar materiais dentários e cimentos endodônticos em sistemas de cultura de células (28-30). Os resultados do teste MTT demonstraram que todos os eluídos do CP permitiram uma taxa de sobrevivência igual ou superior a 100% para as células mPDL e ROS17/2.8 em concentrações de 0,1, 1 e 10 mg/ml, quando comparado ao grupo controle. Somente a partir de 100 mg/ml, os eluídos de CP/radiopacificadores promoveram uma significativa taxa de mortalidade celular. Isso já era esperado devido à constatação de que em 100 mg/ml, o pH da maioria dos eluídos de CP/radiopacificadores tinham aumentado. As células tratadas com CP puro, apresentaram uma taxa de sobrevivência próxima de 100%

em relação ao grupo controle, mesmo em 100 mg/ml, sugerindo que, de fato, a adição de um agente radiopacificador pode de alguma forma alterar as propriedades do cimento. Isto é consistente com um estudo recente, em que a associação de óxido de bismuto ao cimento de silicato dicálcico mostrou um possível efeito citotóxico sobre células da polpa dentária (31). O número de células pulpares cultivadas na superfície do cimento de silicato dicálcio foram superiores ao cimento silicato dicálcio/óxido de bismuto e MTA branco em todos os tempos de cultura. Desde que os componentes do cálcio sejam a maioria na composição do cimento de Portland, a intensa atividade da desidrogenase mitocondrial observada nos grupos de células expostos ao cimento Portland puro (100 mg/ml) está relacionado a uma elevada concentração de íons Ca^{2+} nos eluídos, com consequente atividade residual das enzimas desidrogenase mitocondrial. É bem estabelecido que Ca^{2+} marcadamente ativa e estende a cinética da enzima desidrogenase mitocondrial (32). Estudos adicionais são necessários para elucidar essa hipótese.

O estudo microscópico da morfologia e o ensaio de coloração de apoptose/necrose foram realizados para identificar o tipo de morte celular que ocorreu com as duas linhagens celulares, bem como a obtenção de dados qualitativos. A regulação da apoptose tem sido observada como consequência de drogas citotóxicas e patologias incluindo o câncer (14). Além disso, agentes citotóxicos, tais como metais, podem levar ao estresse oxidativo e induzir a apoptose. Outro possível indutor de apoptose é o estresse do retículo endoplasmático promovido pela sobrecarga de Ca^{2+} (33). Assim, testes de detecção de apoptose são de grande importância quando se considera o uso de metais como radiopacificadores em formulações de cimento endodôntico ou

quando são testados a biocompatibilidade de novos cimentos a base de cálcio. Quanto à análise morfológica, a maioria das células mPDL e ROS17/2.8 tratadas com diferentes concentrações de eluídos do CP/agentes radiopacificadores apresentaram morfologia normal, assim como forma poligonal, núcleo esférico, volume citoplasmático normal e projeções que vinculem uma célula a outra. Algumas células com morfologia consistente com necrose também foram observadas nos eluídos do CP, mas em geral as imagens foram muito similares ao grupo controle (fig.3). Nas células mPDL tratadas com ZOE em 10 mg/ml e ROS17/2.8 em 100 mg/ml, as imagens microscópicas das células sugeriram aspecto apoptótico relacionado, em particular, a retração de células, membrana celular alterada, vacúolos anormais e condensação do núcleo.

Dando sequência aos estudos de citotoxicidade e para definir claramente a frequência de cada mecanismo de morte celular, as células foram submetidas a coloração dupla de laranja de acridina/brometo de etídio e submetidos a análise por microscópio de fluorescência por examinador cego. De acordo com os dados estatísticos, os eluídos de CP puro, CP/óxido de bismuto e CP/ tungstato de cálcio promoveram apenas morte significativa por necrose nas maiores concentrações. Várias investigações que utilizaram o MTA cinza, MTA branco e outros cimentos a base de CP em modelos de animais tem reportado a presença de tecidos necróticos ou periapicais. A presença de necrose tem sido atribuída ao alto valor de pH promovido através de materiais dentais e até mesmo para estimulação da produção de citocinas (34). Este estudo demonstrou pela primeira vez que altos valores de pH ($\text{pH} > 10$) observado para diferentes eluídos de CP foram fortemente ($r=0.9$) relacionados ao tipo de morte celular por necrose nos dois sistemas de cultura celulares. O pH elevado destes eluídos

parece ter induzido estresse bioquímico e um rompimento na membrana citoplasmática pH-dependente, em particular as células mPDL. A linhagem de células osteogênicas ROS 17/2.8 demonstrou ser mais resistente a valores de pH maiores do que mPDL, de acordo com os resultados do CP/tungstato de cálcio na concentração de 100 mg/ml (Fig. 4). Os índices de apoptose e necrose, em concentrações iguais ou inferiores a 10 mg/ml para todos os grupos de CP testados foram semelhantes às taxas dos grupos controle não-tratados, mostrando que as associações CP/agentes radiopacificadores avaliados neste estudo podem ser considerados não-citotóxicos para ambas as linhagens celulares. Os eluídos de cimento ZOE confirmaram citotoxicidade para mPDL e ROS 17/2.8 de forma dose-dependente. A citotoxicidade do ZOE foi causada possivelmente pela geração de espécies reativas de oxigênio e radicais livres de eugenol (35). Esses resultados apresentados neste estudo estão de acordo com outros que avaliaram a genotoxicidade de radiopacificadores individualmente (36).

Embora o MTA apresente uma biocompatibilidade adequada, é considerado um material caro e com dificuldade de manuseio (4). Portanto, as pesquisas focando o desenvolvimento de um cimento endodôntico mais razoável, a base de CP têm sido interessante. Uma das desvantagens do uso do CP na odontologia é sua falta de radiopacidade; um importante componente na escolha de uma nova fórmula de um cimento a base de CP é o melhor agente radiopacificador. Considerando os resultados do ensaio MTT, análise morfológica e detecção de apoptose/necrose, foi demonstrado neste estudo que todas as combinações de cimento CP/ agentes radiopacificadores mostraram não-citotóxicos as células mPDL e ROS17/2.8. Em adição, a associação de

óxido de zircônio com CP como agente radiopacificador mostrou os melhores resultados de biocompatibilidade a ambas as linhagens celulares.

CONCLUSÕES

Esse estudo demonstrou que as associações do CP com óxido de bismuto, óxido de zircônio e tungstato de cálcio podem ser consideradas biocompatíveis às linhagens celulares periodontais e osteogênicas de acordo com os resultados dos vários ensaios. A respeito da biocompatibilidade, não apenas óxido de bismuto, mas também tungstato de cálcio e óxido de zircônio podem ser excelentes alternativas como agentes radiopacificadores para cimentos endodônticos a base de CP.

REFERÊNCIAS

1. Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKennedy DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. J Endod 1997;23:225-8.
2. Holland R, Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabe PF, Junior ED. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. J Endod 2001;27:281-4.

3. Hatibovic-Kofman S, Raimundo L, Chong L, Moreno J, Zheng L. Mineral trioxide aggregate in endodontic treatment for immature teeth. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2006;1:2094- 7.
4. Mooney GC and North S. The current opinions and use of MTA for apical barrier formation of non-vital immature permanent incisors by consultants in pediatric dentistry in the UK. *Dental Traumatology* 2008;24:65-9.
5. Camilleri J. Evaluation of selected properties of mineral trioxide aggregate sealer cement. *J Endod* 2009;35(10):1412-7.
6. Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kodowaki T, Takashi S. The effect of mineral trioxide Aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. *J Endod* 2008;34:1057-60.
7. Ribeiro DA, Duarte MA, Matsumoto MA, Marques ME, Salvadori DM. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *J Endod* 2005;31(8):605-7.
8. Tani-Ishii N, Hamada N, Watanabe K, Tujimoto Y, Teranaka T, Umemoto T. Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide. *J Endod* 2007;33:836-9.
9. Perinpanayagam H, Al-Rabeah E. Osteoblasts interact with MTA surfaces and express Runx2. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:590-96.
10. BrzoviC V, Miletic I, Zeljezic D, Mladinic M, Kasuba V, Ramic S, Anic I. In vitro genotoxicity of root canal sealers. *Int Endod J* 2009;42:253–63.

11. Duarte MAH, El-Kadre GDO, Vivan RR, Tanomaru JMG, Tanomaru Filho M, Moraes IG. Radiopacity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod* 2009;35:737-40.
12. Bortoluzzi EA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Duarte MA. Radiographic effect of different radiopacifiers on a potential retrograde filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108(4):628-32.
13. Huang TH, Ding SJ, Hsu TZ, Lee ZD and Kao CT. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:767–771.
14. Nikitakis NG, Sauk JJ, Papanicolaou SI. The role of apoptosis in oral disease: Mechanisms; aberrations in neoplastic, autoimmune, infectious, hematologic, and developmental diseases; and therapeutic opportunities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:476-90.
15. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. Review. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:663-669.
16. Takahashi A, Matsumoto H, Yuki K, Yasumoto J, Kajiwara A, Aoki M, Furusawa Y, Ohnishi K, Ohnishi T. High-let radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of p53 status, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;60:591-4.
17. Gandolfi MG, Perut F, Ciapetti G, Mongiorgi R, Prati C. New Portland cement-based materials for endodontics mixed with articaine solution: a study of cellular response. *J Endod* 2008;34(1):39-44.
18. Bortoluzzi E, Broon N, Bramante C, Garcia R, de Moraes I, Bernardineli N. Sealing Ability of MTA and Radiopaque Portland Cement With or Without Calcium Chloride for Root-End Filling. *J Endod* 2009;32(9):897-900.

19. Hashem AAR, Hassanien EE. ProRoot MTA, MTA-Angelus and IRM Used to Repair Large Furcation Perforations: Sealability Study, *J Endod* 2008;34(1):59-61.
20. Camilleri J. The physical properties of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J* 2008;41:151-7.
21. Tanomaru-Filho M, Da Silva GF, Duarte MAH, et al. Radiopacity evaluation of root-end filling materials by digitization of images. *J Appl Oral Sci* 2008;16:376-9.
22. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radiopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod* 2007;33:295-8.
23. Saliba E, Abbassi-Ghadi S, Vowles R, Camilleri J, Hooper S, Camilleri J. Evaluation of the strength and radiopacity of Portland cement with varying additions of bismuth oxide. *Int Endod J* 2009;42:322-8.
24. Asakura K, Satoh H, Chiba M, Okamoto M, Zerizawa K, Nakano M, Omae K. Genotoxic studies of heavy metals: Lead, Bismuth, Indium, Silver and Antimony. *J Occup Health* 2009;51:498-512.
25. Lodiene G, Morisbak E, Bruzell E, Ørstavik D. Toxicity evaluation of root canal sealers in vitro. *Int Endod J* 2008;41:72-77.
26. Camps J, About I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers: A new method. *J Endod* 2003;29(9):583-586.
27. Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* 2000;26(5):288-91.

28. Gordoysus M, Avcu N, Gordoysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F, Ural Au. Cytotoxic effects of four different endodontic materials in human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* 2007;33(12):1450-4.
29. Donadio M, Jin Jiang, Jianing He, Yu-Hsiung Wang, Safavi KE, Qiang Zhu. Cytotoxicity evaluation of Activ GP and Resilon sealers in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:74-78.
30. Jafarnia B, Jiang J, He J, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Evaluation of citotoxicity of MTA employing various additives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107(5):739-44.
31. Chiang TY and Ding SJ. Comparative physicochemical and biocompatible properties of radiopaque dicalcium silicate cement and mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2010;36(10): 1683-7.
32. Contreras L and Satrustegui J. Calcium Signaling in Brain Mitochondria: Interplay of malate aspartate NADH shuttle and calcium uniporter/mitochondrial dehydrogenase pathways. *J Biol Chem* 2009;284:7091-99.
33. Franco R and Cidlowski JA. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 2009;16:1303-14.
34. Tabarsi B, Parirokh M, Eghbal MJ, Haghdoost AA, Torabzadeh H, Asgary S. A comparative study of dental pulp response to several pulpotomy agents. *Int Endod J* 2010;43:565-571.
35. Atsumi T, Iwakura I, Fujisawa S, Ueha T. Reactive oxygen species generation and photo-cytotoxicity of eugenol in solutions of various pH. *Biomaterials* 2001;22:1459-66.

36. Ribeiro DA, Carlin V, Fracalossi ACC, Oyama LM. Radiopacifiers do not induce genetic damage in murine fibroblasts: an in vitro study. *Int Endod J* 2009;42:987-91

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E AVALIAÇÃO
DO pH DO CIMENTO PORTLAND E ASSOCIAÇÕES COM
AGENTES RADIOPACIFICADORES***

Capítulo 2

.....

***Artigo a ser submetido no periódico Journal of Applied Oral Science**

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro*, a atividade antimicrobiana e alteração de pH proporcionado por cinco materiais retrobturadores: Portland (CP), CP + óxido de bismuto, CP + óxido de zircônio, CP + tungstato de cálcio e cimento de óxido de zinco eugenol (ZOE). **Métodos:** A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo teste de difusão em ágar sobre as cepas: *Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomona aeruginos*, *Candida albicans*. Após o período de incubação a 37°C, os halos de inibição do crescimento bacteriano foram observados e mensurados. Para a avaliação do pH amostras dos materiais ($n=10$) foram colocadas em tubos de polietileno e imersas em 10 ml de água destilada. Após 12, 24, 48 e 72 horas, o pH foi determinado através de pHmetro. **Resultados:** Todas as espécies microbianas usadas neste estudo foram inibidas pelos cimentos retrobturadores avaliados. Para o pH, os resultados mostraram que todos os radiopacificadores testados promoveram aumento do pH de forma semelhante ao cimento Portland puro, e que a adição de diferentes agentes radiopacificadores não influenciaram nesta propriedade. Em todo o período experimental, ZOE obteve os menores valores de pH. **Conclusão:** Todos os agentes radiopacificadores utilizados (óxido de bismuto, tungstato de cálcio, óxido de zircônio) adicionados ao cimento de Portland, não interferiram na atividade antimicrobiana e no pH quando comparados ao cimento Portland puro.

Palavras chave: atividade antimicrobiana, pH, agentes radiopacificadores

ABSTRACT

Objective: The objective of this study was to evaluate *in vitro* antimicrobial activity and pH change of five root-end filling cements: Portland cement (PC), PC + bismuth oxide, PC + zirconium oxide, PC + calcium tungstate and eugenol zinc oxide cement (ZOE). **Methods:** Antimicrobial activity was evaluated by agar diffusion test on strains: *Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*. After incubation at 37°C, the inhibition of bacterial growth was observed and measured. For evaluating pH, the materials samples (n=10) were placed in polyethylene tubes and immersed in 10 ml of distilled water. After 12, 24, 48 and 72 hours, pH was determined by pH meter. **Results:** All microbial species used in this study were inhibited by the evaluated end filling cements. For pH, the results showed that all tested radiopacifying agents caused an increase in pH similar to pure Portland cement, and the addition of different radiopacifying agents did not influence this property. Throughout the experimental period, ZOE achieved the lowest pH values. **Conclusion:** All the radiopacifying agents used (bismuth oxide, calcium tungstate, zirconium oxide) added to Portland cement did not affect the antimicrobial activity and pH when compared with pure Portland cement.

Key words: Antimicrobial activity, pH, radiopacifying agents

INTRODUÇÃO

Materiais retrobturadores ideais devem apresentar propriedades adequadas quanto à capacidade de adesão e selamento do sistema de canais radiculares; estabilidade dimensional mesmo na presença de umidade e radiopacidade. Também tem grande importância sua ação indutora de reparação, atuação antimicrobiana, aliada a biocompatibilidade. Todas essas características contribuem para o sucesso da cirurgia parodontológica ^{4,35,43}

Desde sua introdução como material retrobturador em 1993, o uso do MTA têm ampliado suas aplicações como material indutor de reparo ósseo ^{31,46,47} sendo importante para esta atuação a presença de óxido de cálcio e promoção de pH alcalino ^{14,39}. Segundo Holland et al. ^{22,23} o material apresenta mecanismos similares de ação em relação ao hidróxido de cálcio, entretanto, a manipulação e colocação do MTA em cavidades retrógradas é um processo tecnicamente desafiador, além de seu elevado custo.

Pesquisas estão sendo desenvolvidas com o cimento Portland como alternativa para o MTA ^{13,36}. Porém este cimento não apresenta radiopacidade, sendo necessária a adição de um agente radiopacificador a sua fórmula. O radiopacificador presente no MTA (óxido de bismuto) não tem sido considerado o ideal, segundo Coomaraswamy et al.⁹, este radiopacificador pode promover deterioração da estabilidade mecânica e aumento da porosidade. Outros autores sugerem que as propriedades biológicas do cimento Portland podem ser prejudicadas quando acrescido de óxido de bismuto ^{2,38}. Assim, agentes radiopacificadores alternativos para o cimento Portland tem sido investigados. Óxido de bismuto, óxido de zinco, óxido de chumbo, subnitrito de

bismuto, carbonato de bismuto, sulfato de bário, iodofórmio, tungstato de cálcio e óxido de zircônio foram adicionados ao cimento Portland e um teste de radiopacidade foi realizado. Todas as substâncias apresentaram maior radiopacidade que a dentina, com potencial a ser adicionado ao cimento Portland como agente radiopacificador de acordo com Duarte et al.¹⁵. Bortoluzzi et al.⁷ também estudando possíveis agentes radiopacificadores, analisaram o óxido de bismuto, sulfato de bário, iodofórmio e óxido de zircônio. Os Resultados demonstraram que todos os agentes, exceto sulfato de bário e cimento Portland puro apresentaram radiopacidade suficiente pra ser adicionado. Porém, além do teste de radiopacidade, Cornélio et al.¹⁰, avaliaram alguns agentes radiopacificadores associados ao cimento Portland quanto a citotoxicidade em 2 linhagens celulares através do teste MTT, morfologia celular e detecção de apoptose/necrose. Esse estudo demonstrou que as associações do cimento Portland com óxido de bismuto, óxido de zircônio e tungstato de cálcio podem ser consideradas biocompatíveis as linhagens celulares de acordo com as metodologias empregadas.

Dentre as propriedades biológicas que os cimentos seladores devem apresentar estão o poder antimicrobiano e a capacidade de indução de tecido mineralizado. Estas propriedades têm relação direta com a presença de hidróxido de cálcio na composição dos cimentos.

A condição necessária para um cimento agir como antimicrobiano depende da sua ionização, liberação de íons hidroxila¹⁶, causando um aumento no pH. Um pH maior que 9.0 pode de forma reversível ou irreversivelmente inativar as enzimas da membrana celular do microrganismo, resultando numa perda da atividade biológica³, isto é, o pH alcalino de uma substância ou

cimento torna-se extremamente letal as bactérias presentes nas infecções endodônticas.

Essa propriedade (pH alcalino) tanto para o MTA quanto para o cimento Portland já têm sido relatada por diversos autores que relatam atividade antimicrobiana para os materiais ^{12,17,24}. Desta forma, estas propriedades justificam a necessidade de avaliação da alteração de pH e atividade antimicrobiana do cimento Portland quando associado a agentes radiopacificadores. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e pH do cimento Portland isolado e associado a agentes radiopacificadores (óxido de bismuto, tungstato de cálcio e óxido de zircônio).

MATERIAL E MÉTODOS

A. Teste de difusão em ágar

Os seguintes cimentos e associações serão investigados: cimento de Portland puro (PC, Votorantim, SP, Brasil) e associações, sendo 80% PC + 20% agentes radiopacificadores (Sigma Aldrich, St Louis, MO). A solução salina fisiológica esterilizada foi empregada como controle negativo. Todos os cimentos foram preparados pela mistura de 1g do pó com 320µl do veículo (água MilliQ) em placas de vidro estéreis.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de difusão em ágar pelo método de poço.

No quadro 1 estão apresentadas as cepas que foram utilizadas no estudo, sendo procedentes da *American Type Culture Collection* (ATCC), sendo uma cepa de campo.

Quadro 1 – Cepas que foram utilizadas como indicadoras da atividade antimicrobiana, procedência e morfotipo

Microrganismos	Origem	Morfotipo
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	cg+
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	cg+
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	cg+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	bg-
<i>Candida Albicans</i>	ATCC10231	levedura

Os inóculos foram obtidos pela semeadura das cepas indicadoras em caldo apropriado, de acordo com as características fisiológicas, e incubados a 37°C por 24 horas.

Os testes pelo método de poço foram realizados em triplicata, em placas com camada dupla, ou seja, com camada base e camada “seed” de meios de cultura adequados. A camada base foi obtida com 12 mL de meio de cultura esterilizado e resfriado até cerca de 50° C em placas de Petri de 15 x 150 mm esterilizadas. Após solidificação, foram adicionados 8 mL de camada “seed”, que foi obtida pela adição de inóculo na concentração final de 10⁶ ufc/mL de meio de cultura resfriado até cerca de 50°C.

Após solidificação da camada “seed”, os poços foram confeccionados pela remoção de ágar, com canudos de alumínio de 4 mm de diâmetro esterilizados, a cerca de 15 mm das bordas das placas e em pontos equidistantes. O cimento e agentes radiopacificadores estudados foram aplicados em cada um dos poços em quantidade suficiente para preenchimento.

As placas foram mantidas à temperatura ambiente por duas horas, para pré-difusão do material, e depois incubadas a 37°C por 24 horas.

Decorrido o período de incubação, foram adicionadas alíquotas de 5 ml de gel de TTC preparado com ágar (Difco) a 1,0% com 0,05% de cloreto de trifetil-tetrazóico (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) para coloração das células viáveis e otimização da leitura do halo de inibição. Após a solidificação, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos.

As imagens das placas bem iluminadas e com fundo na cor azul, contrastando com a coloração rósea das colônias vivas após o uso do gel de TTC foram digitalizadas e o diâmetro dos halos de inibição formados ao redor do poço foram mensurados com o auxílio do programa Image Tool (UTHSCSA Image Tool for Windows version 3.00).

Os resultados foram expressos em médias e desvio padrão.

B. Avaliação do pH

Para a avaliação do pH, foram preparados 10 tubos padronizados para cada material testado. 50 tubos de cloreto de polivinil medindo 10 mm de comprimento e 1.5 mm de diâmetro foram preenchidos com os cimentos avaliados. Os grupos foram: cimento Portland puro (PC, Votorantim, SP, Brasil) e associações: Portland + óxido de Bismuto; Portland + óxido de Zircônio; Portland

+ Tungstato de Cálcio (todos, Sigma Aldrich, St Louis, MO) e o cimento de óxido de zinco Eugenol (ZOE).

Imediatamente após a manipulação dos materiais e preenchimento dos tubos, ambas as extremidades do tubo foram limpas e os mesmos foram radiografados para avaliação do preenchimento. Em seguida foram colocados em frascos com tampa (JProlab, São José dos Pinhais, PR, Brasil) contendo 10 mL de água destilada pH neutro (pH aferido previamente = 6,5) e mantidos a 37°C. Após 12, 24, 48 e 72 horas, o pH foi avaliado com um pHmêtro DMPH-2 (Digimed, São Paulo, SP, Brasil). Este aparelho foi calibrado previamente com soluções tampões com os pH de 4, 7 e 10 e foram também utilizados para verificar a calibragem do aparelho durante todo o experimento. A temperatura da sala em que foram feitas as medições foi mantida em 25°C por meio de ar condicionado. O pH de um tubo vazio contendo somente água destilada foi mensurado em todos os períodos avaliados.

Os resultados obtidos foram submetidos a um teste de normalidade, posteriormente submetidos ao teste estatístico paramétrico ANOVA para comparação dos diferentes grupos entre si e ao teste de comparações múltiplas de Tukey, com 5% de significância.

RESULTADOS

A. Teste de difusão em ágar

Os resultados mostraram que todas as espécies microbianas usadas neste estudo foram inibidas pelos cimentos retrobturadores avaliados. A composição e procedência dos materiais utilizados em ambos os experimentos

estão apresentados na tabela 1. Os valores das médias e desvio padrão observado para atividade antimicrobiana para cada cimento, estão apresentados na tabela 2.

Tabela 1. Composição e procedimentos dos materiais utilizados

Material	Composição	Indústria
Portland	Silicato tricálcio, silicato dicálcio, ferro-aluminato de cálcio, sulfato de cálcio, aluminato tricálcio, carbonato de cálcio, óxido de magnésio, óxido de cálcio	Votorantim, SP, Brazil
Óxido de bismuto	Óxido de bismuto	Sigma Aldrich, St Louis, MO
Óxido de zircônio	Óxido de zircônio	Sigma Aldrich, St Louis, MO
Tungstato de cálcio	Tungstato de cálcio	Sigma Aldrich, St Louis, MO
Óxido de Zinco Eugenol	Pó: ZnO Líquido: C ₁₀ H ₁₂ O ₂	S.S.White Art. Dent. Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil

	CP	CP + Bi	CP + OZir	CP + TungCa	ZOE
<i>E.faecalis</i>	9±0	8±0	8±0	8±0	10±0
<i>P.aeruginosa</i>	12±0	12.3±0.57	10.6±2.30	11±1.73	24.6±1.15
<i>C.albicans</i>	23.6±1.15	24±1	22.3±0.57	22.3±0.57	25.6±2.08
<i>S.mutans</i>	11±0	10.6±0.57	10.6±0.57	10.3±0.57	12±1
<i>M.luteus</i>	31.6±0.57	31.3±0.57	30±1	30±1	34.3±1.15

Tabela 2. Média e desvio padrão da atividade antimicrobiana

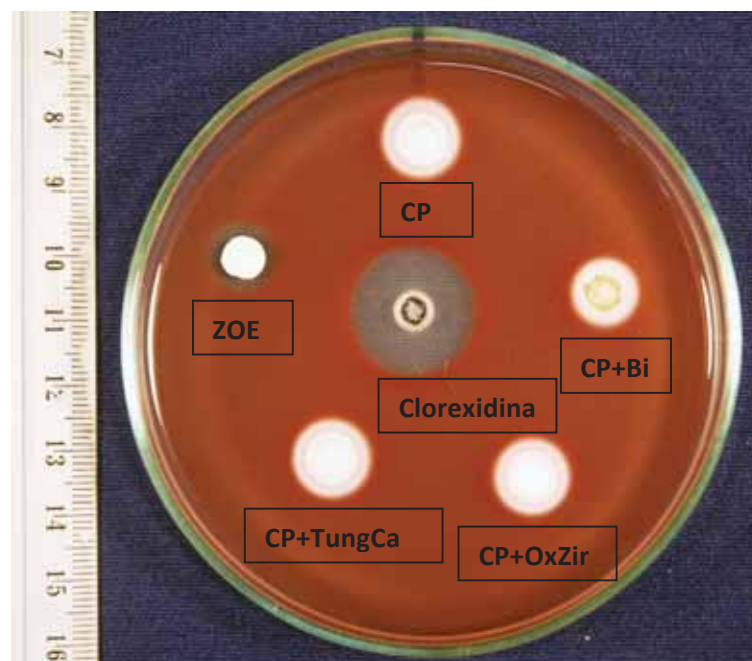


Figura 1- Halos de inibição dos materiais testados sobre *Enterococcus Faecalis*.

Grupos: CP (Cimento Portland); CP+Bi (Cimento Portland + óxido de bismuto); CP+OxZir (Cimento Portland + óxido de zircônio); CP+TungCa

(Cimento Portland + Tungstato de cálcio); ZOE(Cimento de óxido de zinco eugenol)

B. Avaliação do pH

Os valores das médias e desvio padrão observado para o pH para cada cimento, em cada período, estão apresentados na tabela 3. Os resultados mostraram que todos os radiopacificadores testados promoveram aumento do pH de forma semelhante ao cimento Portland puro, e que a adição de diferentes agentes radiopacificadores não influenciaram nesta propriedade. Em todo o período experimental, ZOE obteve os menores valores de pH. A figura 2 mostra a liberação de íons hidroxila de acordo com o tempo.

Grupos/ Tempo	CP	CP +Bi	CP + OZir	CP + TungCa	ZOE
12h	10.24±0.05 ^A	10.20±0.21 ^A	10.21±0.12 ^A	10.23±0.07 ^A	7.484±0.41 ^B
24h	10.20±0.08 ^A	10.21±0.17 ^A	10.20±0.13 ^A	10.24±0.06 ^A	7.444±0.34 ^B
48h	10.23±0.08 ^A	10.30±0.15 ^A	10.22±0.14 ^A	10.26±0.08 ^A	7.346±0.31 ^B
72h	10.22±0.08 ^A	10.28±0.17 ^A	10.21±0.13 ^A	10.23±0.10 ^A	7.325±0.30 ^B

Tabela 3. Média e desvio padrão da liberação de íons hidroxila- pH

Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa teste Tukey (p<0.05)



Figura 2- Valores médios do pH para os cimentos avaliados nos diferentes períodos de tempo.

DISCUSSÃO

O método de difusão em ágar (ADT) é um dos métodos mais utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana de materiais odontológicos^{1,25,34,49}. Este método possibilita avaliação de diferentes concentrações de materiais (cimentos, medicação intracanal, soluções irrigadoras, entre outros), contra um grande número de cepas bacterianas. Os microrganismos selecionados têm sido associados aos casos de infecção persistente ou resistência ao tratamento²⁶. Sundqvist et al.⁴² encontrou *E. faecalis* como uma monoinfecção em 34% dos casos de dentes com tratamentos endodônticos e periodontite apical persistente. Waltimo et al.⁴⁸, demonstrou que *C. albicans* foi resistente em 7% dos casos de periodontite apical. Entretanto, algumas limitações pra essa técnica são notadas, como, propriedades físico-químicas do material testado, velocidade e taxa de difusão^{11,20}; quantidade do

antimicrobiano em teste, natureza do meio de cultura, composição, pH e espessura do meio ³². Além disso, o teste de difusão em ágar requer cuidadosa padronização da densidade do inóculo, conteúdo de meio, viscosidade do ágar, número e tamanho dos espécimes contidos em cada placa ^{18,19}. Outras desvantagens deste método incluem a necessidade de avaliar substâncias difundidas no ágar e a dificuldade de avaliar zonas de inibição do crescimento microbiano, ⁴¹ além do que, essa técnica é relativamente insensível e semi-quantitativa e não distingue propriedades bacteriostáticas e bactericidas dos materiais ⁴⁵.

A pré-incubação por um período de 2 horas permite a difusão de substâncias em ágar gel, produzindo zonas de inibição para o crescimento microbiano ²⁸. Cloreto de trifeniltetrazólio, adicionado ao meio de cultura, age como um indicador da reação metabólica de oxidação-redução no crescimento dos microrganismos. Portanto, somente microrganismos viáveis ou aqueles que cresceram no meio de cultura, mudam para a coloração vermelha ⁵, facilitando a observação das zonas de inibição.

Nossos resultados demonstraram que todos os materiais testados promoveram atividade antimicrobiana promovendo zonas de inibição de todas as cepas avaliadas. As amostras de cimento Portland acrescido de agentes radiopacificadores não demonstraram diferenças entre si e entre o cimento Portland puro, confirmando assim, que nenhum dos agentes radiopacificadores estudados influenciou esta propriedade. Neste estudo, o cimento de óxido de zinco eugenol foi utilizado como controle positivo da atividade antimicrobiana de todas as cepas testadas. A ação antibacteriana desse cimento é provavelmente relatada devido à presença do eugenol ²⁷. O eugenol é bactericida em

concentrações relativamente elevadas sendo capaz de induzir a morte celular e inibir o crescimento celular e respiração, mesmo em menores concentrações. Contudo, pode inibir a quimiotaxia das células brancas, a síntese de prostaglandinas e atividade nervosa^{29,40}.

Materiais a base de cimento Portland constituem-se basicamente de óxidos de cálcio, que quando misturados com água, formam o hidróxido de cálcio, induzindo um aumento do pH pela dissociação dos íons cálcio e hidroxila como demonstrado por Duarte et al.¹⁴.

Para todas as amostras de cimento Portland puro e cimento Portland acrescido de agentes radiopacificadores, o pH se manteve alcalino em todos os períodos analisados (12, 24, 48 e 72 horas), não havendo diferença estatística entre as amostras, demonstrando que nenhum dos radiopacificadores influenciaram nesta propriedade do cimento Portland. Camileri et al.⁸ também encontrou resultados semelhantes para o pH do cimento Portland acrescido com diferentes agentes radiopacificadores, como sulfato de bário (BaSO₄), ouro (Au) e Prata/Estanho (Ag/Sn), mostrando que nenhum desses interferiu na capacidade alcalina do cimento Portland puro.

A alcalinidade do cimento Portland puro já tem sido relatada por diversos autores^{6,14,39}. É conhecido que níveis de pH em torno de 12.0 inibem a atividade de muitos microrganismos, incluindo bactérias resistentes como *Enterococcus faecalis*³⁰. Embora os halos de inibição tenham sido menores, encontramos atividade antimicrobiana de todos os cimentos testados contra *E. Faecalis*, corroborando com estudo de Estrela et al.¹⁷. Entretanto, diversos autores relatam não ter encontrado nenhuma atividade antimicrobiana frente a cimentos a base de Portland e MTA na presença do *E. Faecalis*^{37,40}. Essa

divergência de resultados pode ser explicada pela dificuldade em se obter uma padronização adequada da técnica.

CONCLUSÃO

Considerando a metodologia empregada e os resultados obtidos, pode-se concluir que os agentes radiopacificadores utilizados (óxido de bismuto, tungstato de cálcio, óxido de zircônio) adicionados ao cimento de Portland, não interferiram na atividade antimicrobiana e no pH quando comparados ao cimento Portland puro.

REFERÊNCIAS

1. Al-Khatib ZZ, Baum RH, Morse DR, Yesilsoy C, Bhambhani S, Furst ML. The antimicrobial effect of various endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990;70:784-90.
2. Asakura K, Satoh H, Chiba M, Okamoto M, Zerizawa K, Nakano M, Omae K. Genotoxic studies of heavy metals: Lead, Bismuth, Indium, Silver and Antimony. *J Occup Health* 2009;51:498-512.
3. Asgary S, Kamrabi FA. Antibacterial effects of five different root canal sealing materials. *J Oral Sci* 2008;50(4): 469-74
4. Barbosa SV, Araki K, Spångberg LSW. Citotoxicity of some modified root canal sealers and their leachable components. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Surg* 1993;75:357-61.

5. Begue WJ, Kline RM. The use of tetrazolium salts in bioautographic procedures. *J Chromatogr* 1972;64:182-4.
6. Bortoluzzi E.A., Broon N.J., Bramante C.M., Felipe W.T., Tanomaru-filho M, Esberard RB. The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *J Endod* 2009;35(4):550-54.
7. Bortoluzzi EA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Duarte MA. Radiographic effect of different radiopacifiers on a potential retrograde filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108(4):628-32.
8. Camileri, J. et al. Evaluation of the physical properties of an endodontic Portland cement incorporating alternative radiopacifiers used as root-end filling material. *Int Endod J* 2010;43(2):231-40.
9. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radiopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod* 2007;33:295-8.
10. Cornélio ALG, Salles LP, da Paz MC, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: A cell death study. *J Endod* 2011;37(2):203-10.
11. Çobankara F K, Altino H C, Erganis O. In Vitro Antibacterial Activities of Root-Canal Sealers By Using Two Different Methods. *J Endod* 2004;30(1):57-60.

12. De Deus G, Petruccelli V, Gurgel Filho E, Coutinho Filho, T. MTA versus Portland cement as repair material for furcal perforations: a laboratory study using a polymicrobial leakage model. *Int Endod J* 2006;39:293-6.
13. De Deus, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J* 2005;38(9):604-9.
14. Duarte MA, Demarchi ACO, Yamashita JC, et al. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;36:610–5.
15. Duarte MAH, El-Kadre GDO, Vivan RR, Tanomaru JMG, Tanomaru Filho M, Moraes IG. Radiopacity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod* 2009;35:737-40.
16. Estrela, C et al. Mechanism of action of Calcium and hydroxyl ions of Calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J* 1995;6(2): 85-90.
17. Estrela C, Bammann LL, Estrela CRA, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J* 2000;11:3-9
18. Estrela C, Bammann LL; Pimenta FC, et al. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J* 2001;34:341-45.
19. Estrela C, Estrela C R Z, Moura J, Bammann LL. Testing calcium hydroxide antimicrobial potential by different methods. *J Dent Res* 2000;79:529 (IADR Abstract 3081).

20. Fraga RC, Siqueira Jr JF, de Uzeda M. In vitro evaluation of antibacterial effects of photo-cured glass ionomer liners and dentin bonding agents during setting. *J Prosthet Dent* 1996;76:483–6.
21. Fuss Z, Weiss EI, Shalhav M. Antibacterial activity of calcium hydroxide-containing endodontic sealers on *Enterococcus faecalis* in vitro. *Int Endod J* 1997;30:397–402.
22. Holland R, Souza V, Nery MJ, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide. *J Endod* 1999;25:161–6.
23. Holland R, Souza V, Nery MJ, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland Cement and calcium hydroxide. *Braz Dent J* 2001;12:3–8.
24. Jacobovitz M, Vianna ME, Pandolfelli VC, Oliveira IR, Rossetto HL, Gomes BP. Root canal filling with cements based on mineral aggregates: a in vitro analysis of bacterial microleakage. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108:140-4.
25. Kaplan AE, Picca M, Gonzalez MI, Macchi RL, Molgatini SL. Antimicrobial effect of six endodontic sealers: an in vitro evaluation. *Endod Dent Traumatol* 1999;15:42–5.
26. Leonardo MR, da Silva LAB, Tanomaru Filho M, Bonifacio KC. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of a Castor Oil-Based Irrigant. *J Endod* 2001;27(12):717-19.

27. Leonardo MR, da Silva LA, Tonomaru Filho M, Bonifácio KC, Ito IY (2000)
In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. J Endod 2000;26:391–4.
28. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LAB, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root irrigating solution. J Endod 1999;25:167-71.
29. Markowitz K, Moynihan M, Liu M, Kim S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. Oral Surg, Oral Med, Oral Path 1992;73:729–37.
30. McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *E. Faecalis* in vitro. J Endod 2004; 30:218-219.
31. Menezes R, Bramante CM, Garcia RB, Letra A, Carvalho VGG, Carneiro E, et al. Microscopic analysis of dog dental pulp after pulpotomy and pulp protection with mineral trioxide aggregate and white Portland cement. J Appl Oral Sci. 2004;12(2).
32. Murray P R, Rosenthal M A. Microbiologia Médica. 2006. 5ª edição. Editora Mosby Elsevier.
33. Orstavik D. Antibacterial properties of endodontic materials. Int Endod J 1988; 2(21):161-69.
34. Pumarola J, Berastegui E, Brau E, Canalda C, Jimenez de Anta MT. Antimicrobial activity of seven root canal sealers. Results of agar diffusion and agar dilution tests Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1992;74:216–20.
35. Rafter, M. Apexification: a review. Dent Traumatol 2005; 21:1-8.

36. Ribeiro DA, Duarte MA, Matsumoto MA, Marques ME, Salvadori DM. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *J Endod* 2005;31(8):605-7.
37. Ribeiro CS, Kuteken FA, Hirata Júnior R, Scelza MF. Comparative evaluation of antimicrobial action of MTA, calcium hydroxide and Portland cement. *J Appl Oral Sci* 2006;14(5): 330-3
38. Saliba E, Abbassi-Ghadi S, Vowles R, Camilleri J, Hooper S, Camilleri J. Evaluation of the strength and radiopacity of Portland cement with varying additions of bismuth oxide. *Int Endod J* 2009;42:322-8.
39. Santos AD, Moraes JCS, Araújo EB, Yukimitu K, Valerio Filho WV. Physico-chemical properties of MTA and a novel experimental cement. *Int Endod J* 2005;38:443–7.
40. Sipert C.R., Hussne R.P., Nishiyama C.K., Torres S.A. In vitro antimicrobial activity of Fill Canal, Sealapex, Mineral Trioxide Aggregate, Portland cement and EndoRez. *Intern Endod J.* 38, 539–543, 2005
41. Siqueira JF Jr, Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod* 1997;23:167-9.
42. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1998;85:86-93.
43. Tang HM, Torabinejad M, Kettering JD. Leakage evaluation of root end filling materials using endotoxin. *J Endod* 2002;28:5-7.

44. Tanomaru-filho M, Faleiros FBC, Saçaki JN, Duarte MAH, Guerreiro Tanomaru JM. Evaluation of pH and Calcium Ion Release of Root-end Filling Materials Containing Calcium Hydroxide or Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 2009;35 (10):1418-21.
45. Tobias RS. Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. *Int Endod J* 1988;21:155–60.
46. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999;25:197–205.
47. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995;21:349–53.
48. Waltimo TMT, Siren EK, Torkko HLK, Olsen I, Haapasalo MPP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 1997;30:96-101
49. Weiss E, Shalhav M, Fuss Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endod Dent Traumatol* 1996;12:179–84.

Considerações finais

.....

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tema deste estudo foi escolhido com base nos trabalhos desenvolvidos com o cimento MTA (Agregado Trióxido Mineral), que vem ganhando destaque desde seu surgimento no final dos anos 90, por Torabinejad⁴². Este cimento revolucionou a endodontia, já que além de suas diversas indicações, é um material biocompatível e estimula o reparo ósseo^{30,42,43}. Embora a composição básica deste cimento seja o cimento Portland, o MTA é razoavelmente caro e apresenta dificuldades de manipulação e inserção³². Devido a essas desvantagens e outras como, longo tempo de presa e resistência a compressão inadequada⁶, pesquisas continuam a fim de se desenvolver um cimento a base de Portland com baixo custo e propriedades ainda melhores que o MTA. As similaridades e propriedades biológicas deste cimento já foram provadas por diversos autores^{7,10,35}, todavia, este cimento não mostra radiopacidade suficiente de acordo com as normas ISO para materiais endodônticos, sendo assim, um agente radiopacificador deve ser adicionado a sua composição. Alguns estudos prévios^{3,13} avaliaram a associação do cimento Portland com alguns agentes radiopacificadores como óxido de bismuto, óxido de zircônio, óxido de chumbo, subnitrato de bismuto, carbonato de bismuto, sulfato de bário, iodofórmio, tungstato de cálcio e óxido de zircônio e puderam concluir que todos os agentes, exceto sulfato de bário, apresentaram maior radiopacidade que a dentina e, portanto, podem ser sugeridos como agentes radiopacificadores para o cimento Portland. Porém, além da radiopacidade, é importante que seja estudado propriedades físicas, químicas e biológicas. Surgiu desta forma, o interesse em avaliar a citotoxicidade, além da atividade

antimicrobiana e pH do cimento Portland associado a diferentes agentes radiopacificadores: óxido de bismuto, óxido de zircônio e tungstato de cálcio.

Na avaliação da citotoxicidade, foram utilizadas 2 linhagens celulares, fibroblastos do ligamento periodontal (mPDL) e células de osteosarcoma de ratos (ROS 17/2.8) que foram escolhidas por originarem de diferentes tecidos e assim poder mostrar diferentes comportamentos quando expostas a testes de citotoxicidade. Neste estudo analisamos a viabilidade celular pelo teste MTT, um teste rotineiro utilizado na citotoxicidade de novas drogas e materiais endodônticos em sistema de cultura celular^{11,17,23}, e pudemos observar que todas as associações de cimento Portland e agentes radiopacificadores foram consideradas biocompatíveis. Também analisamos a morfologia celular e detecção de apoptose e necrose para identificar o tipo de morte celular que ocorreu em ambas às linhagens celulares assim como a obtenção de dados qualitativos. Os resultados mostraram que apenas nas maiores concentrações dos grupos de cimento Portland puro (CP), CP + óxido de bismuto e CP + tungstato de cálcio, houve morte celular por necrose. Diversas investigações utilizando MTA cinza, MTA branco e outros cimentos a base de Portland em modelos animais tem relatado a presença de tecido pulpaes e periapicais com necrose. A presença de necrose têm sido atribuída aos altos valores de pH que os materiais proporcionam e até mesmo para a estimulação da produção de citocinas³⁹. Este estudo demonstrou pela primeira vez que altos valores de pH (pH>10) observados para diferentes eluídos do CP foram fortemente correlacionados ($r = 0.9$) ao tipo de morte celular por necrose nas 2 linhagens celulares.

Frente a este resultado e complementando as propriedades biológicas dos cimentos retrobturadores, a atividade antimicrobiana e o pH do cimento Portland e associações foram investigados. Os microrganismos selecionados foram os mais encontrados quando nos deparamos com casos de retratamento ou insucesso no tratamento endodôntico^{27,38}. Assim, pela técnica de difusão em ágar os cimentos associados foram avaliados contra *E.faecalis*, *P.aeruginosa*, *C.albicans*, *S.mutans* e *M.luteus*. Nossos resultados demonstraram que todos os cimentos testados promoveram halo de inibição contra todas as cepas endodônticas, confirmando que nenhum dos agentes radiopacificadores influenciou nesta propriedade quando comparado ao CP puro. Já na avaliação do pH, todas as amostras mantiveram o pH alcalino em todos os períodos avaliados (12, 24, 48, 72 horas), confirmando o potencial antimicrobiano dos cimentos relatado pelo alto pH⁸. Porém como encontramos resultados distintos e variados na literatura frente à atividade antimicrobiana, por exemplo do *Enterococcus faecalis*, pesquisas adicionais devem ser realizadas mudando-se a metodologia para melhor explicar e afirmar tais resultados.

Referências

.....

REFERÊNCIAS*

- 1- Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru-filho M, Esberard RM. The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of Mineral Trioxide Aggregate and White Portland Cement with a Radiopacifier. *J Endod.* 2009; 35: 550-4.
- 2- Bortoluzzi EA, Duarte MAH, Demarchi ACCO, Bramante CM. The use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of Mineral Trioxide Aggregate and White Portland Cement. *J Endod.* 2006; 32: 1194-7.
- 3- Bortoluzzi EA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Duarte MA. Radiographic effect of different radiopacifiers on a potential retrograde filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108: 628-32.
- 4- Braz MG, Marcondes JPC, Matsumoto MA, Duarte MAH, Salvadori DMF, Ribeiro DA. Genotoxicity in primary human peripheral lymphocytes after exposure to radiopacifiers in vitro. *J Mater Sci.* 2008; 19: 601-5.
- 5- Camargo SEA, Camargo CHR, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J.* 2008; 42: 227–37.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

6- Camilleri J. Evaluation of selected properties of mineral trioxide aggregate sealer cement. *J Endod.* 2009; 35: 1412-7.

7- Camilleri J, Montesin FE, Di Silvio L, Pitt Ford TR. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *Inter Endod J.* 2005; 38: 834-42.

8- McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod.* 2004; 30: 218-9.

9- Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of Bismuth Oxide Radiopacifier Content on the material properties of an endodontic Portland Cement-based (MTA-like) System. *J Endod.* 2007; 33: 295-8.

10- De Deus, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J.* 2005; 38: 604-9.

11- Donadio M, Jin Jiang, Jianing He, Yu-Hsiung Wang, Safavi KE, Qiang Zhu. Cytotoxicity evaluation of Activ GP and Resilon sealers in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107: 74-8.

12- Duarte, MAH, Demarchi ACCO, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga SC. Arsenic release provided by MTA and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99: 648-50

- 13- Duarte MAH, El-Kadre GDO, Vivan RR, Tanomaru JMG, Tanomaru Filho M, Moraes IG. Radiopacity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod.* 2009; 35: 737-40.
- 14- Eldeniz A U, Hadimli H H, Ataoglu H, Orstavik D. Antibacterial effect of selected root-end filling material. *J Endod.* 2006; 32: 345-9.
- 15- Estrela C, Bammann LL, Estrela CRA, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J.* 2000; 11: 3-9.
- 16- Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Junior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J.* 1995; 6: 85-90.
- 17- Gordoysus M, Avcu N, Gordoysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F, Ural Au. Cytotoxic effects of four different endodontic materials in human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 2007; 33: 1450-4.
- 18- Hasan Zarrabi M, Javidi M, Naderinasab M, Gharechahi M. Comparative evaluation of antimicrobial activity of three cements: new endodontic cement (NEC), mineral trioxide aggregate (MTA) and Portland. *J Clin Pediatr Dent.* 2008; 33: 117-22.
- 19- Holland R, Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabe PF, Junior ED. Mineral Trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod.* 2001; 27: 281-4.
- 20- Holland R, Souza V. Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. *J Endod.* 1985; 11: 535-43.

- 21- Holland R, Souza V, Nery MJ, Bernabe FE, Otoboni-Filho JA, Dezan Junior E, et al. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. *J Endod.* 2002; 28: 173-6.
- 22- Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé, PFE, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod.* 1999; 25: 161-6.
- 23- Jafarnia B, Jiang J, He J, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Evaluation of citotoxicity of MTA employing various additives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107: 739-44.
- 24- Karimjee CK, Koka S, Rallis DM, Gound TG. Cellular toxicity of mineral trioxide aggregate mixed with an alternative delivery vehicle. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 115-20.
- 25- Leal JM, Bampa LL, Poliselí-Neto A. Cirurgias parendodônticas. Indicações, contra-indicações, modalidades cirúrgicas. In: Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares. Princípios técnicos e biológicos.* São Paulo: Artes Médicas; 2005. p. 1263-1343.
- 26- Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod.* 1993; 19:541-4.
- 27- Leonardo MR, da Silva LAB, Tanomaru Filho M, Bonifacio KC. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a Castor Oil-Based irrigant. *J Endod.* 2001; 27: 717-9.

- 28- Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru-Filho M, Cortes KC, Ito IY. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *J Endod.* 2000; 26: 391-4.
- 29- Leonardo MR, Silva LAB, Utrilla LS, Assed S, Ether SS. Calcium hydroxide root canal sealers – histopathologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. *J Endod.* 1997; 23: 428-32.
- 30- Menezes R, Bramante CM, Garcia RB, Letra A, Carvalho VGG, Carneiro E, et al. Microscopic analysis of dog dental pulp after pulpotomy and pulp protection with mineral trioxide aggregate and white Portland cement. *J Appl Oral Sci.* 2004; 12: 104-7.
- 31- Mickel A K, Nguyen T H, Chogle S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2003; 29: 257-8.
- 32- Mooney GC, North S. The current opinions and use of MTA for apical barrier formation of non-vital immature permanent incisors by consultants in pediatric dentistry in the UK. *Dent Traumatol.* 2008; 24: 65-9.
- 33- Neelakantan P, Subbarao CV. An analysis of the antimicrobial activity of ten root canal sealers--a duration based in vitro evaluation. *J Clin Pediatr Dent.* 2008; 33: 117-22.
- 34- Oliveira MG, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro ALB, Costa AT, Pozza DH. Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Braz Dent J.* 2007; 18: 3-7.

- 35- Ribeiro DA, Duarte MA, Matsumoto MA, Marques ME, Salvadori DM. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *J Endod.* 2005; 31: 605-7.
- 36- Ribeiro CS, Scelza MF, Hirata Júnior R, Buarque de Oliveira LM. The antimicrobial activity of gray-colored mineral trioxide aggregate (GMTA) and white-colored MTA (WMTA) under aerobic and anaerobic conditions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109: 109-12.
- 37- Sipert CR, Hussne RP, Nishiyama CK, Torres SA. In vitro antimicrobial activity of FillCanal, Sealapex, Mineral Trioxide Aggregate, Portland cement and EndoRez. *Int Endod J.* 2005; 38: 539–43.
- 38- Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1998; 85: 86-93.
- 39- Tabarsi B, Parirokh M, Eghbal MJ, Haghdoost AA, Torabzadeh H, Asgary S. A comparative study of dental pulp response to several pulpotomy agents. *Int Endod J.* 2010; 43: 565-71.
- 40- Tanomaru-filho M, Faleiros FBC, Saçaki JN, Duarte MAH, Guerreiro-Tanomaru JM. Evaluation of pH and calcium ion release of root-end filling materials containing Calcium Hydroxide or Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod.* 2009; 35: 1418-21.
- 41- Tanomaru-Filho M, Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *J Oral Sci.* 2007; 49: 41-5.

- 42-Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 1999; 25: 197–205.
- 43-Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995; 21: 349–53.
- 44-Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKennedy DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod.* 1997; 23: 225-8.

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 31 de março de 2011.

ANA LÍVIA GOMES CORNÉLIO