

INDRI NOGUEIRA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CITOTOXICIDADE DO
AGREGADO DE TRIÓXIDO MINERAL ASSOCIADO A
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CLOREXIDINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas – Área de Odontopediatria.

Orientadora: Prof^a Dr^a Elisa Maria Aparecida Giro

Araraquara

2008

Nogueira, Indri.

Atividade antibacteriana e citotoxicidade do agregado de trióxido mineral associado a diferentes concentrações de clorexidina / Indri Nogueira. – Araraquara: [s.n.], 2008.

95 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

1. Bactérias 2. Clorexidina 3. Endodontia 4. Materiais biocompatíveis 5. Microbiologia. I. Título

INDRI NOGUEIRA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CITOTOXICIDADE DO AGREGADO
DE TRIÓXIDO MINERAL ASSOCIADO A DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE CLOREXIDINA**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof^ª Dr^a Elisa Maria Aparecida Giro

2º Examinador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

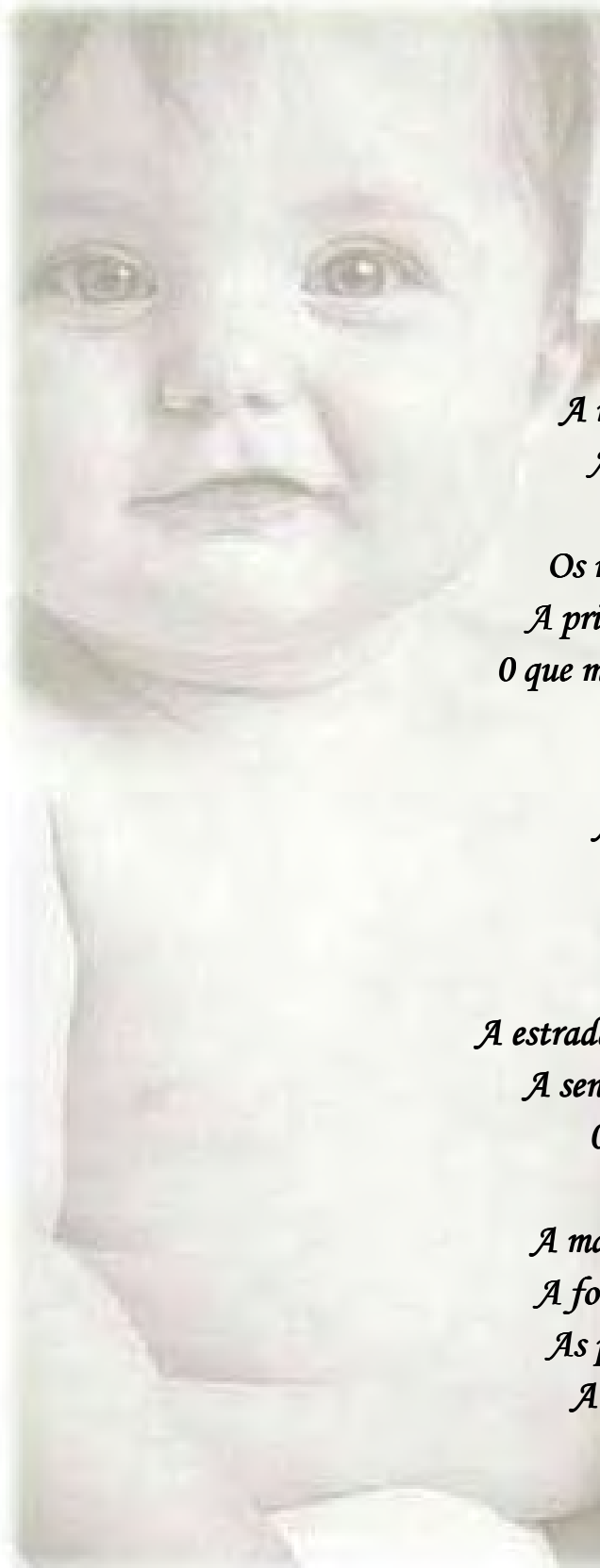
3º Examinador: Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho

Araraquara, 30 de julho de 2008.

DADOS CURRICULARES

INDRI NOGUEIRA

30 de março de 1981	Nascimento em Brasília – DF
Filiação	Sebastião Sávio Nogueira Lim Hang Lan Nogueira
2001 - 2004	Curso de Graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
2005 - 2006	Estágio de Atualização em <i>Endodontia</i> na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Departamento de Dentística Restauradora
2005 - 2006	Estágio de Atualização em <i>Emergência em Odontopediatria</i> na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Departamento de Clínica Infantil.
2006 - 2008	Curso de Pós-Graduação em nível de Mestrado em Ciências Odontológicas, Área de concentração em Odontopediatria, na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”



Poema da Paz

*O dia mais belo? Hoje
A coisa mais fácil? Equivocar-se
O obstáculo maior? O medo
O erro maior? Abandonar-se
A raiz de todos os males? O egoísmo
A distração mais bela? O trabalho
A pior derrota? O desalento
Os melhores professores? As crianças
A primeira necessidade? Comunicar-se
O que mais faz feliz? Ser útil aos demais
O mistério maior? A morte
O pior defeito? O mau humor
A coisa mais perigosa? A mentira
O sentimento pior? O rancor
O presente mais belo? O perdão
O mais imprescindível? O lar
A estrada mais rápida? O caminho correto
A sensação mais grata? A paz interior
O resguardo mais eficaz? O sorriso
O melhor remédio? O otimismo
A maior satisfação? O dever cumprido
A força mais potente do mundo? A fé
As pessoas mais necessárias? Os pais
A coisa mais bela de todas? O amor*

Madre Teresa de Calcutá

DEDICATÓRIA

A Deus

Por permitir minha entrada no curso de mestrado, por capacitar-me para realizá-lo, pela fé, esperança e força concedidas em todos os momentos, principalmente, nas dificuldades.

“Tudo posso naquele que me fortalece”
(Filipenses 4, 13)

Ao meu pai, Sávio e à minha mãe, Lím

Pelo exemplo que são em minha vida de amor, fé, sabedoria, humildade, fortaleza, educação e determinação. Obrigada pelas orações e pelo apoio, mesmo apesar da distância. Amo muito vocês!

**“Pais brilhantes estimulam os filhos a fazer de cada lágrima
uma oportunidade de crescimento”**
(Augusto Cury)

Ao meu noivo, amor da minha vida, César

Pelo carinho, pela paciência nas horas de angústia e estresse, pela confiança, pelos ensinamentos, motivação e encorajamento. Obrigada pelo amor e compreensão. Te amo muito!

**“O amor é paciente, é benigno ...
tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta”**
(1 Coríntios 13: 4,7)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Professora Dr^a Elisa Maria Aparecida Giro

Pela orientação, atenção, dedicação e amizade. Agradeço a Deus por ter conhecido uma pessoa tão especial, com dons maravilhosos e com um coração repleto de bondade. Com a senhora pude aprender o valor e o significado de: amor, humildade, paciência, sinceridade, compreensão, ética e justiça.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Pela orientação, paciência, confiança, ensinamentos e conselhos concedidos. Obrigada pela assistência no desenvolvimento desse trabalho, por permitir a realização de parte deste no Laboratório de Patologia Experimental - UNESP e pela ajuda na obtenção do material utilizado.

Ao Professor Antonio Carlos Pizzolitto

Pelo apoio, atenção, auxílio e por disponibilizar o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, para que a análise antibacteriana deste estudo fosse realizada.

Às queridas amigas, Juliana Gondim e Fernanda Lessa

Pela amizade, disposição, participação e auxílio na realização desse trabalho. Vocês são muito especiais!

Aos meus irmãos Rudí e Hendri

Pelo amor, carinho e, mesmo à distância, por sempre permanecerem companheiros.

À minha segunda família: Madalena, Luís Evanir (Vani), Tiago e Vítor

Pelo acolhimento nos finais de semana, pelo amor, carinho e conselhos. Agradeço a Deus por ter colocado vocês em minha vida!

“Você pode sonhar, projetar, criar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo mas precisará de pessoas para tornar o sonho realidade.”

(Walt Disney)

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", representados pelo Digníssimo Diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla, pela Vice-Diretora Prof^a Dr^a Andréia Affonso Barretto Montandon e pela digníssima ex-Diretora Prof^a Dr^a Rosemary Adriana Chiérici Marcontônio.

Ao Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, representado pela Chefe de Departamento Prof^a Dr^a Angela Cristina Cilense Zuanon e pela Vice-Chefe Prof^a Dr^a Lídia Parsekian Martins.

À Coordenação da Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, representada pelos Professores: Dr^a Rita de Cássia Loiola Cordeiro, Dr. Dirceu Barnabé Ravelli, Dr^a Josimeri Hebling Costa e Dr. Luiz Gonzaga Gandini Júnior.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

À Empresa Angelus[®] (Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina, PR, Brasil), por ter cedido o material para ser utilizado nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Elliot W. Kitagima do NAP/MEPA - ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil, por disponibilizar o microscópio eletrônico de varredura (MEV) para a análise da morfologia celular.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, Prof^a Dr^a Angela Cristina Cilense Zuanon, Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani, Prof^a Dr^a Elisa Maria Aparecida Giro, Prof. Dr. Fábio César Abreu-e-Lima, Prof^a Dr^a Josimeri Hebling, Prof^a Dr^a Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto (Tuka) e Prof^a Dr^a Rita de Cássia Loiola Cordeiro.

Às queridas amigas de turma de mestrado: Ana Luísa B. M. de Oliveira, Camila Fávero de Oliveira, Hérica Adad Ricci, Elcilaine Rizzato Azevedo e Lícia Bezerra Cavalcante. Obrigada pelos momentos de descontração, convivência, amizade e aprendizado.

Às queridas amigas-irmãs Christiane Castro, Débora Barbosa e Eliane Milazzo, que mesmo à distância, estavam sempre presentes e sempre torcendo pelo meu sucesso. Obrigada pelas orações, carinho e força de vocês.

Aos queridos amigos, Ana Paula Faloni, Filipe Abi Rached, Isabella Haneda, Sabrina Aquino e Marcinha Tanaka. Obrigada pela amizade, pelas horas de alegria e descontração, pelo carinho, atenção e conselhos dados.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, do curso de Odontopediatria: Andreza M. F. Aranha, Érika Botelho Josgrilberg, Fábio L. F. Scanavino, Fernanda C. R. Lessa, Hermes Pretel, Jonas de Almeida Rodrigues, Júnia C. L. Ferrari dos Santos, Luciana Montú Lima, Mariane Emí Sanabe, Murilo de Sousa Guimarães, Cármem Regina Coldebella, Juliana O. Gondim, Michele Baffi Diniz, Nancy Tomoko Sacono, Simone di Salvo Mastrantonio, Cristiane Maria da Costa e

Silva, Débora da Silva Lopes, Fabiano Jeremias, Juliana Feltrin de Souza, Marcela Martini Tagliani e Mácia Hiromi Tanaka.

Aos amigos de laboratório de Patologia Experimental pelos momentos de alegria e de aprendizado: Adriano Augusto M. de Mendonça, Adriano Fonseca de Lima, Ana Paula Dias Ribeiro, Andreza Almeida, Andreza Maria Fabio Aranha, Camila Fávero de Oliveira, Cármen Regina Coldebella, Carolina B. Brito, Castelo Pedro V. Cidade, Cláudia Huck, Daniela Cristina Barbosa, Darlon Martins, Fernanda da Silveira Vargas, Fernanda C. R. Lessa, Flávia Cristina Coimbra, Flávia Zardo Trindade, Gislaíne C. Padovani, João F. Kina, Juliana Pirola Garcia, Karina A. Neves, Keren C. F. Jordão, Luciana Rocha Coimbra, Marcela Tagliani, Maria da Glória Vieira Celli, Nancy Tomoko Sacono e Pedro Paulo Chaves de Souza.

Às Estagiárias da Odontopediatria, pelos conhecimentos compartilhados: Ioneide Maria G. Brandão, Kelí Regina Victorino, Keren Cristina F. Jordão, Larissa Stangari, Lígia Nunes de Moraes Ribeiro, Mariana Fiochi Pena e Natália Apolinário de Lima.

À técnica do Laboratório de Microbiologia, UNESP - Farmácia, Maria do Carmo e às técnicas dos Laboratórios de Microbiologia e Patologia Experimental, UNESP - Odontologia, Sônia F. da Silveira Vargas e Juliana Pirola. Obrigada pela ajuda, compreensão e paciência.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, Sonia Maria Tircaílo, Célia Ap. Brogna B. da Silva, Dulce Helena Oliveira, Odete A. Goveia, Pedro C. Alves, Tânia, A. M. dos Santos, Antônio P. Cabriní

(Totó), Cristina Ferreira Afonso e Márcia Elena C. dos Santos que com seus trabalhos sempre nos ajudaram.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, Mara Cândida Munhoz do Amaral, Rosângela Aparecida Silva dos Santos, José Alexandre Garcia e Flávia Sousa de Jesus pela atenção, carinho e educação com que sempre me atenderam.

Aos amigos e funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP por todo carinho, amizade, atenção, paciência e por estarem sempre dispostos a ajudar: Adriano Ferreira Luiz, Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas, Eliane Cristina Marques de Mendonça Spera, Eliane Maria Sanches Scarso, Maria Aparecida Capela Carvalho, Marley Cristina Chiusoli Montagnoli, Maria Helena Matsumoto Komatsi Leves, Maria Inês Carlos, Odete Aparecida Camilo, Silvia Helena Acquarone Lavras.

Aos amigos e funcionários da seção de Esterilização pela amizade, atenção e disposição que sempre nos atenderam: Aurelúcia Vieira Rocha, Marco Antônio Pereira e Paulo R. M. Pagliarini.

A todos os professores e funcionários desta Faculdade pela atenção e contribuição para minha formação acadêmica, profissional e humana.

E a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

Muito obrigada!!!

PREFÁCIO

Esta tese será apresentada na forma de dois artigos intitulados:

Artigo 1 – “Atividade antibacteriana do agregado de trióxido mineral associado a diferentes concentrações de clorexidina” - Será submetido para publicação no *Journal of Endodontics*.

Artigo 2 – “Efeito citotóxico do agregado de trióxido mineral associado à clorexidina sobre cultura de fibroblastos” - Será submetido para publicação no *Journal of Endodontics*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	16
INTRODUÇÃO.....	18
PROPOSIÇÃO.....	23
ARTIGO 1 – “ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO AGREGADO DE TRIÓXIDO MINERAL ASSOCIADO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CLOREXIDINA”.....	24
ARTIGO 2 – “EFEITO CITOTÓXICO DO AGREGADO DE TRIÓXIDO MINERAL ASSOCIADO À CLOREXIDINA SOBRE CULTURA DE FIBROBLASTOS”.....	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS.....	78
ANEXOS.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CHX - clorexidina

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA - ácido desoxirribonucléico

E. coli - *Escherichia coli*

E. faecalis - *Enterococcus faecalis*

HCl - ácido clorídrico

HMDS - Hexametil-disiloxano

MMPs - metaloproteinases

MPDL - mouse periodontal ligament fibroblast cells (fibroblastos do ligamento periodontal de camundongos)

MTA - Mineral Trioxide Aggregate ou agregado de trióxido mineral

MTT - metiltetrazolium - ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5 diphenyltetrazolium bromide)

p - nível de significância estatística

P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa*

PBS - Solução salina fosfatada tamponada

pH - potencial hidrogeniônico

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

SDH - desidrogenase succínica

SFB - soro fetal bovino

UFC - unidades formadoras de colônia

UI/mL - unidades internacionais por mililitros

Nogueira I. Atividade antibacteriana e citotoxicidade do agregado de trióxido mineral associado a diferentes concentrações de clorexidina [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

Resumo

Para que um material seja indicado como retrobturador, é desejável que apresente várias propriedades, entre elas, intensa atividade antibacteriana e aceitável biocompatibilidade. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, in vitro, o efeito antibacteriano e citotóxico do Agregado de Trióxido Mineral (MTA-Branco, Angelus[®] Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina, PR, Brasil), associado à solução de clorexidina (CHX) em diferentes concentrações. Para a análise da atividade antibacteriana foi empregado o método de difusão em ágar Müller-Hinton e foram utilizados os microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC - 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC - 27853), *Escherichia coli* (ATCC - 25922) e *Enterococcus faecalis* (ATCC - 29262). Em placas de Petri contendo a suspensão bacteriana com meio de cultura, foram preparados poços com 4 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade, os quais foram preenchidos com o cimento MTA preparado com água destilada estéril (G1-controle) ou com solução de CHX nas concentrações de 0,06% (G2), 0,12% (G3), 0,2% (G4) e 1% (G5). As placas foram incubadas em condições de aerobiose a 37°C por 24 horas e os halos de inibição do crescimento bacteriano foram medidos em milímetros. Para avaliar a citotoxicidade do MTA associado às diferentes concentrações de CHX, o metabolismo e a morfologia celular foram avaliados por meio do teste do MTT e da análise da microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. Corpos de prova de 4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura foram preparados com as associações de materiais e imersos em 1,1 mL de meio de cultura (DMEM) por 24 horas ou por 7 dias para obtenção dos extratos. DMEM completo (grupo controle - G6) e os extratos de cada grupo foram aplicados sobre cultura de fibroblastos do ligamento periodontal de camundongos, os quais foram incubados por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar. A adição de CHX 1% ao MTA aumentou a atividade antibacteriana do

cimento sobre *S. aureus* ($p < 0,05$). Para *E. coli* e *P. aeruginosa* não houve diferença estatística em relação aos tamanhos dos halos de inibição para todos os materiais estudados ($p > 0,05$). Para o *E. faecalis*, MTA + CHX 0,2% e MTA + CHX 1% apresentaram menores halos de inibição quando comparados aos demais grupos ($p < 0,05$). Para os extratos de 24 horas, a redução do metabolismo celular para os grupos G1 a G5 foi de 11,87%; 23,63%; 21,87%; 34,64% e 83,01%, respectivamente; para os extratos de 7 dias, o metabolismo das células decresceu em 61,35%; 71,45%; 75,43%; 81,26% e 86,13%, respectivamente. Para ambos os períodos de obtenção dos extratos e para todos os grupos experimentais, o metabolismo celular foi estatisticamente menor do que para o grupo controle (G6) ($p < 0,05$). O menor efeito citotóxico foi observado para G1 ($p < 0,05$), seguido pelos grupos G2 e G3 que não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0,05$). Os grupos G4 e G5 apresentaram os maiores efeitos citotóxicos, sendo G5 mais citotóxico do que G4 ($p < 0,05$). Concluiu-se que: 1) a adição de clorexidina ao MTA independente da concentração utilizada, não resultou em melhora da atividade antibacteriana sobre as espécies estudadas, com exceção do *S. aureus*; 2) quanto maior a concentração de CHX incorporada ao pó do MTA, maior a toxicidade do cimento sobre fibroblastos do ligamento periodontal de camundongos (MDPL); 3) o extrato de 7 dias foi mais citotóxico que o extrato de 24 horas.

Palavras-chave: Bactérias; clorexidina; endodontia; materiais biocompatíveis; microbiologia.

Nogueira I. Antibacterial activity and cytotoxic effects of mineral trioxide aggregate associate with different concentrations of chlorhexidine [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

Abstract

An ideal root-end filling material should present several properties, including antibacterial activity and biocompatibility. The aim of this in vitro study was to investigate the antibacterial and cytotoxic effects of Mineral Trioxide Aggregate (MTA-White, Angelus[®] Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina, PR, Brasil) mixed with different concentrations of chlorhexidine (CHX). For antibacterial activity analysis diffusion method on Müller-Hinton agar was employed. The bacterial strains used were *Staphylococcus aureus* (ATCC - 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC - 27853), *Escherichia coli* (ATCC - 25922) e *Enterococcus faecalis* (ATCC - 29262). In Petri plates containing culture medium with bacterial suspension, wells were made measuring 4 mm in diameter and 5 mm in depth. The wells were completely filled with MTA mixed with sterile distilled water (G1) or with different concentrations of CHX: 0.06 % (G2), 0.12% (G3), 0.2% (G4) and 1% (G5). The plates were incubated in aerobic conditions at 37°C for 24 hours, and then the diameters of the zones of bacterial inhibition were measured. To evaluate the cytotoxicity of the MTA mixed with different concentrations of CHX, the cell metabolism and cells morphology were evaluated by the MTT assay and scanning electron microscopy, respectively. Round-shaped samples measuring 4 mm in diameter and 2 mm in thickness were prepared with the association of materials and immersed in 1.1 mL of culture medium (DMEM) and incubated for 24 hours or 7 days. The extracts from every sample and pure DMEM (control group - G6) were applied on mouse periodontal ligament fibroblast cells culture and incubated at 37°C with 5% CO₂ and 95% air for 24 hours. The addition of CHX 1% to MTA increased the antibacterial activity of the cement against *S. aureus* (p <0.05). There was no statistically significant difference in size of inhibition zones against *E. coli* and *P. aeruginosa* for the studied materials (p > 0.05). Against *E. faecalis*, MTA + CHX 0.2% and MTA +

CHX 1% determined lower inhibition zones when compared to the other groups ($p < 0.05$). To 24-hour extracts the reduction of cell metabolism was 11.87%; 23.63%; 21.87%; 34.64%; and 83.01%, respectively for groups G1 to G5. To 7-day extracts, the metabolism of the cultured cells decreased by 61.35%; 71.45%; 75.43%; 81.26%; and 86.13% respectively for groups G1 to G5. For both periods of extracts obtained and for all experimental groups, the cell metabolism was significantly lower than in control group (G6) ($p < 0.05$). The lowest cytotoxic effect was observed for G1 ($p < 0.05$) followed by G2 and G3 groups that did not show a statistically significant difference between them ($p > 0.05$). The groups G4 and G5 had the higher cytotoxic effects and G5 was more cytotoxic than G4 ($p < 0.05$). It was concluded that: 1) the addition of chlorhexidine to MTA independent of the concentration used did not improve the antibacterial activity against studied microorganisms (except against *S. aureus*); 2) all concentrations of chlorhexidine mixed with MTA caused intense cytotoxic effects when extracts obtained in both periods were applied directly on mouse periodontal ligament fibroblast cells (MDPL); 3) the extract of 7 days was more cytotoxic than the extract of 24 hours.

Keywords: Bacteria; biocompatible materials; chlorhexidine; endodontics; microbiology.

INTRODUÇÃO

Um dos principais objetivos da terapia endodôntica é a eliminação de irritantes presentes no interior do sistema de canais radiculares, seguida da obturação da forma mais hermética possível. Os canais radiculares de dentes necrosados têm a capacidade de abrigar várias espécies bacterianas e seus subprodutos³³ e sua complexidade anatômica dificulta ou impossibilita uma limpeza completa mesmo com o uso de técnicas e instrumentos apropriados, podendo levar ao insucesso do tratamento. Assim, é relativamente freqüente a persistência de lesões periapicais, e, principalmente quando o retratamento do canal não é bem sucedido ou não é possível, torna-se necessária a intervenção cirúrgica pararendodôntica⁴³. Esse procedimento consiste na exposição da região periapical, curetagem para remoção da lesão patológica, ressecção do ápice radicular, preparo de uma cavidade e inserção de material retrobturador.

O material ideal para procedimentos de obturação retrógrada deve aderir-se e adaptar-se adequadamente às paredes dentinárias do preparo, favorecendo um bom selamento apical, a fim de prevenir a infiltração de microrganismos e de seus subprodutos provenientes do canal radicular para o tecido periapical^{18,47}. Além disso, deve ser biocompatível, insolúvel nos fluidos tissulares, ter estabilidade dimensional, não sofrer corrosão, ser de fácil manipulação e ter radiopacidade¹⁸.

Durante muitos anos o amálgama foi o material de eleição nos procedimentos de retrobturação. Entretanto, algumas de suas desvantagens como a liberação de mercúrio, presença de corrosão e expansão tardia desestimularam o seu uso^{17,18}. Com a finalidade de contornar essas desvantagens do amálgama,

cimentos à base de óxido de zinco e eugenol passaram a ser utilizados como materiais para obturação retrógrada. Todavia, esses materiais também apresentam algumas desvantagens como elevada solubilidade e irritação aos tecidos vivos¹⁸.

O agregado de trióxido mineral (MTA) foi introduzido na endodontia em 1993 por Lee et al.²⁹ e tem sido indicado para procedimentos de retrobturação, perfurações radiculares e de furca^{2,35,49}, em pulpotomias e capeamento pulpar direto^{14,36,53}, e em casos de dentes com rizogênese incompleta, como barreira apical⁵³. Seus principais componentes são: silicato de tricálcio, aluminato de tricálcio, óxido de tricálcio, óxido de silicato e partículas hidrófilas. Quando o pó de MTA é hidratado, há a formação de um gel coloidal que se solidifica em menos de 4 horas após sua manipulação, criando uma barreira praticamente impermeável⁴⁷. Foi demonstrado que, além de radiopacidade satisfatória e baixa solubilidade, este cimento apresenta pH elevado (10,2 a 12,5)⁴⁸, o qual pode contribuir para a formação de tecido mineralizado quando o material é usado para retrobturação^{51,52}.

Como o MTA é recomendado para aplicação sobre os tecidos periodontal, ósseo e pulpar, é importante conhecer seus efeitos citotóxicos e suas propriedades biológicas. Dentro desse contexto, estudos in vitro mostraram a manutenção da viabilidade e proliferação de células pulpares^{27,44} e de fibroblastos do ligamento periodontal e gengivais de humanos⁶ quando em contato com o MTA. Em relação aos osteoblastos, o MTA, assim como um cimento a base de hidróxido de cálcio (Dycal), estimularam o crescimento celular, sugerindo que o cálcio liberado por esses materiais tem a capacidade de regular o crescimento dessas células⁴⁵. Em

estudo usando cementoblastos, o MTA induziu a proliferação celular e a expressão de proteínas como fosfatase alcalina, osteocalcina e colágeno tipo I, as quais estão relacionadas com o processo de cementogênese⁴⁶.

Estudos *in vivo*^{1,52} mostraram formação de cimento sobre o MTA quando este foi usado como material retrobturador. Também foi observado que, quando em contato com o tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, tanto o MTA quanto o hidróxido de cálcio, promoveram a deposição de granulações caracterizadas como cristais de calcita, as quais são formadas a partir da reação do cálcio do material com o dióxido de carbono do tecido conjuntivo²⁴. Esta reação sugere uma resposta pulpar semelhante ao hidróxido de cálcio quando da aplicação do MTA sobre este tecido conjuntivo especializado.

O óxido de cálcio é um dos principais constituintes do MTA e, em presença de umidade, promove a formação do hidróxido de cálcio, o qual é responsável pelo pH altamente alcalino do material²⁴ e pode explicar a ação antimicrobiana do MTA. Como o pH acima de nove tem a capacidade de inativar enzimas da membrana celular de alguns microrganismos, há perda da atividade biológica da membrana citoplasmática ou destruição de fosfolipídios ou ácidos não-saturados, levando então, a danos na integridade da membrana citoplasmática¹².

O MTA apresenta atividade antibacteriana sobre algumas espécies anaeróbias facultativas^{49,53}, contudo, não inibe as anaeróbias estritas⁴⁹. Em relação a bactérias freqüentemente isoladas em canais radiculares de dentes com necrose

pulpar e reação periapical, alguns trabalhos não mostraram ação antibacteriana do cimento sobre *E. faecalis*^{12,32,49}, *E. coli*^{32,49}, *S. aureus*^{12,32,49} e *P. aeruginosa*¹².

Estudos recentes^{22,25,28,39,41,42} sugeriram a associação da clorexidina (CHX) com o MTA, na tentativa de aumentar o seu efeito antimicrobiano. A CHX é uma molécula catiônica capaz de adsorver-se à parede celular bacteriana e unir-se a moléculas carregadas negativamente (proteínas e lipopolissacarídeos), alterando a permeabilidade da membrana com posterior precipitação de componentes intracelulares microbianos²⁶. Todavia, assim como demonstrado por diferentes agentes químicos recomendados para irrigação de cavidades e canais radiculares^{9,21,34}, a CHX também apresenta efeitos citotóxicos definidos sobre diferentes linhagens celulares^{7,8,16,20,23,31,37,40}. Experimentos *in vitro* realizados com fibroblastos humanos observaram que esses efeitos citotóxicos podem também inibir a síntese protéica^{20,31,37}. No entanto, o efeito tóxico dessa substância é dependente do tempo de exposição e concentração utilizada²³.

A CHX a 0,12% aumenta a atividade antimicrobiana do MTA sobre os microrganismos: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. sanguis*, *A. odontolyticus*, *F. nucleatum* e *C. albicans*⁴¹. Entretanto, na mesma concentração induz, *in vitro*, aumento na apoptose de macrófagos e fibroblastos²², sugerindo que essa mistura pode, *in vivo*, interferir na regeneração dos tecidos periapicais.

Todavia, ainda pouco se sabe sobre os efeitos citotóxicos e antimicrobianos da associação MTA e CHX, principalmente quando diferentes concentrações de CHX são adicionadas ao cimento. Assim, pesquisas nesta área específica são de grande interesse a fim de determinar quais concentrações de

CHX incorporadas ao MTA poderiam aumentar o potencial antimicrobiano do cimento, sem causar danos celulares. Os dados obtidos *in vitro* poderiam direcionar o desenvolvimento de pesquisas *in vivo* com o objetivo de fornecer procedimentos clínicos e tratamentos mais seguros para o cirurgião-dentista e seus pacientes.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana e a citotoxicidade do agregado de trióxido mineral (MTA-Branco, Angelus[®] Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina, PR, Brasil) associado a diferentes concentrações de clorexidina (CHX).

PROPOSIÇÃO ESPECÍFICA

1. Avaliar o potencial antibacteriano do MTA (MTA-Branco, Angelus[®] Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina, PR, Brasil) associado a diferentes concentrações de clorexidina, por meio do teste de difusão em ágar, sobre os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*.

2. Avaliar a citotoxicidade do MTA (MTA-Branco, Angelus[®] Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina, PR, Brasil) associado a diferentes concentrações de clorexidina sobre cultura de fibroblastos por meio das análises do metabolismo e da morfologia celular.

Atividade antibacteriana do agregado de trióxido mineral associado a diferentes concentrações de clorexidina

Autores: Indri Nogueira¹, Juliana O. Gondim¹, Antonio C. Pizzolitto², Carlos A. S. Costa³, Elisa M. A. Giro^{1*}

¹ Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil.

² Departamento de Microbiologia Clínica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Araraquara, SP, Brasil.

³ Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil.

* **Autor para correspondência**

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil. 14801-903

Phone: +55 16 33016336

E-mail: egiro@foar.unesp.br

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar, *in vitro*, o efeito antibacteriano de uma formulação de agregado de trióxido mineral (MTA) associado a diferentes concentrações de clorexidina (CHX). Para esta avaliação, foi empregado o método de difusão em ágar, utilizando os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. Em placas de Petri contendo a suspensão bacteriana misturada ao meio de cultura, foram confeccionados poços com 4 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade, os quais foram preenchidos com o MTA preparado com água destilada estéril ou com CHX em diferentes concentrações (0,06%, 0,12%, 0,2% e 1%), totalizando 10 poços para cada associação. As placas foram incubadas em condições de aerobiose a 37°C por 24 horas e os halos de inibição de crescimento dos microrganismos foram medidos em milímetros. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$). A adição de CHX 1% ao MTA aumentou a atividade antibacteriana do cimento sobre *S. aureus* ($p < 0,05$). Para *E. coli* e *P. aeruginosa* não houve diferença estatística em relação aos diâmetros dos halos de inibição para todos os materiais estudados ($p > 0,05$). Para o *E. faecalis*, MTA + CHX 0,2% e MTA + CHX 1% apresentaram menores halos de inibição quando comparados aos demais grupos ($p < 0,05$). Baseado nas condições experimentais deste trabalho pôde-se concluir que a adição de CHX ao MTA: 1) aumentou a atividade antibacteriana para o microrganismo *S. aureus* apenas na concentração de 1%; 2) não melhorou a atividade antibacteriana do cimento sobre *E. coli* e *P. aeruginosa*; 3) promoveu redução da atividade antibacteriana sobre o *E. faecalis*, nas maiores concentrações estudadas.

Palavras-chave: Bactérias; clorexidina; endodontia; materiais dentários; microbiologia.

Introdução

A persistência de microrganismos no sistema de canais radiculares e nos túbulos dentinários após o tratamento endodôntico convencional, geralmente está associada ao insucesso, com o desenvolvimento de lesão periapical crônica (1, 2). Nestes casos, quando não é possível o retratamento dos canais radiculares, a intervenção cirúrgica parentodôntica associada à retrobturação torna-se necessária para a manutenção do dente na cavidade bucal (3).

Dentre os materiais indicados para a retrobturação, o Agregado de Trióxido Mineral (MTA), composto por silicato, aluminato e óxido de tricálcio, além de óxido de silicato e bismuto, tem sido amplamente utilizado (4). Estudos comparando o MTA ao amálgama e a cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, mostraram que o MTA apresenta melhor adesão às paredes dentinárias e melhor adaptação marginal (5), proporcionando melhor selamento apical (6) e, conseqüentemente, menor microinfiltração bacteriana (7). Outras propriedades favoráveis também foram observadas como baixa solubilidade (4), boa radiopacidade (4), adequada expansão quando em contato com a umidade (7), força de compressão semelhante ao amálgama (6) e, adequada biocompatibilidade (3, 6, 8).

Além dessas propriedades, um material retrobturador deve possuir atividade antibacteriana a fim de evitar que bactérias remanescentes do sistema de canais radiculares reinfetem a região periapical ou invadam o cimento via periápice determinando a persistência da lesão crônica (9).

O MTA preparado com água destilada estéril apresenta efeito antibacteriano o qual pode ser atribuído, em parte, ao seu elevado pH, que aumenta de 10,2 imediatamente após a manipulação para aproximadamente 12,5 em cerca de três horas, permanecendo, então, constante por tempo prolongado (10). Entretanto, este material não apresenta adequada atividade antibacteriana sobre algumas bactérias encontradas no sistema de canais radiculares de dentes infectados, como por exemplo, *Enterococcus faecalis* (9, 11), *Staphylococcus aureus* (9, 11), *Escherichia coli* (9, 11) e *Pseudomonas aeruginosa* (11).

Com o objetivo de melhorar a atividade antibacteriana do MTA, a água destilada usada durante a manipulação tem sido substituída pela CHX (12-14). A CHX possui propriedade de adsorver-se a substratos aniônicos da parede celular de bactérias sendo liberada lentamente (substantividade). Desta forma, causa a quebra de componentes intracelulares e a coagulação e precipitação do citoplasma, provendo um efeito antibacteriano de longa duração (15). Devido às suas propriedades catiônicas, a clorexidina também se adere à hidroxiapatita da dentina (16) e a liberação gradual desta protege a região contra a colonização de microrganismos (17).

Apesar da CHX mostrar-se efetiva *in vitro* contra a maioria das espécies microbianas encontradas em canais radiculares infectados (18), pouco é conhecido com relação às propriedades antibacterianas da associação MTA/CHX. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito antibacteriano do MTA associado a diferentes concentrações de CHX sobre as espécies *Staphylococcus aureus* (ATCC - 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC - 27853), *Escherichia*

coli (ATCC - 25922) e *Enterococcus faecalis* (ATCC - 29262), as quais são freqüentemente identificadas em infecções de canais radiculares e na ocorrência de lesões periapicais refratárias.

Material e Métodos

Os materiais utilizados neste estudo assim como sua composição, quantidade usada na preparação e respectivos fabricantes estão apresentados na Tabela 1.

Para a avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana do MTA (MTA-Branco - Angelus[®] Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina, PR, Brasil) associado a diferentes concentrações de CHX (0,06%, 0,12%, 0,2% e 1%) (HENRIFARMA Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado o teste de difusão em ágar. A atividade antibacteriana foi testada sobre os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC - 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC - 27853), *Escherichia coli* (ATCC - 25922) e *Enterococcus faecalis* (ATCC - 29262).

As cepas bacterianas foram semeadas em caldo Müller-Hinton (Acumedia Manufacturers, Inc. Baltimore, Maryland, USA) e permaneceram por 24 horas em estufa bacteriológica a 37°C para obtenção de suspensão padrão com turbidez correspondente a 0,5 da escala de MacFarland, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de meio de cultura.

Para a realização do teste de difusão foram usadas cinco placas de Petri (20 x 100 mm) para cada microrganismo, nas quais foram vertidos 20 mL de ágar

Müller-Hinton a 45°C, acrescidos de 300 µL do inóculo bacteriano. Após solidificação (aproximadamente 30 minutos), em cada placa, foram confeccionados cinco poços equidistantes (um para cada material) com 4 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade (Figura 1 - Anexo), de forma que cada uma das placas recebesse todos os materiais estudados. O experimento foi realizado em duplicata.

Para todos os grupos, os materiais foram manipulados sob condições assépticas, na proporção de 100 mg de pó/30 µL de líquido, sendo que o grupo G1 (MTA + água destilada estéril) foi utilizado como grupo controle. Nos grupos G2 a G5, a água destilada foi substituída pelas soluções de CHX em diferentes concentrações (G2 = MTA + CHX 0,06%; G3 = MTA + CHX 0,12%; G4 = MTA + CHX 0,2%; G5 = MTA + CHX 1%).

Após manipulação, os materiais foram inseridos com auxílio de insersor e condensador de amálgama previamente esterilizados, nos poços confeccionados nas placas de Petri até seu completo preenchimento (Figura 2 - Anexo).

Para a pré-difusão dos materiais, as placas foram mantidas em temperatura ambiente por uma hora e depois foram incubadas a 37°C por 24 horas em condições de aerofilia. Em seguida, com auxílio de um paquímetro digital (Mytutoyo Sul Americana Ltda., SP, BR), foi realizada a medição do diâmetro dos halos de inibição em milímetros. As medidas foram determinadas a partir de dois pontos opostos localizados nos limites mais externos do halo de inibição formado ao redor de cada poço, incluindo a medida do diâmetro do poço (Figura 3 - Anexo). Para assegurar que não havia crescimento bacteriano na região

correspondente aos halos, as placas foram avaliadas em microscópio de luz (Olympus, modelo VT-II, Tokyo, Japão), com aumento de 20 vezes.

Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias. Como a distribuição destes não obedeceu à curva de normalidade e não houve homogeneidade de variâncias, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação dos halos de inibição dos diferentes materiais para um mesmo microrganismo e, também, para comparação dos halos de inibição de cada material para os diferentes microrganismos. Quando a hipótese nula de igualdade entre os grupos foi rejeitada, testes de Mann-Whitney foram aplicados para identificar as diferenças. Para todos os testes estatísticos aplicados foi considerado o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

Resultados

Os valores das medianas, assim como os valores mínimo e máximo das medidas dos diâmetros dos halos de inibição de cada material estudado de acordo com a cepa bacteriana estão apresentados na Tabela 2.

Comparando os diferentes materiais para cada microrganismo usado no estudo, pôde-se observar que para o *S. aureus*, o grupo G5 (MTA + CHX 1%) promoveu o maior halo de inibição ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos (G1 = MTA + H₂O; G2 = MTA + CHX 0,06%; G3 = MTA + CHX 0,12% e G4 = MTA + CHX 0,2%), os quais não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si ($p > 0,05$). Para *E. coli* e *P. aeruginosa* não houve diferença estatística significativa em relação aos diâmetros dos halos de inibição para todos os

materiais estudados ($p>0,05$). Para *E. faecalis*, o grupo G5 apresentou diâmetro de halo de inibição inferior aos grupos G1 a G3 ($p<0,05$) e semelhante ao grupo G4 ($p>0,05$), o qual não diferiu dos demais grupos ($p>0,05$).

A comparação do diâmetro dos halos de inibição de cada material em relação aos diferentes microrganismos mostrou que para os grupos G1 e G2, os halos de inibição observados para a *E. coli* foram semelhantes àqueles da *P. aeruginosa* ($p>0,05$) e menores do que os apresentados pelo *S. aureus* e *E. faecalis* ($p<0,05$). Para os grupos G3 e G4, os halos de inibição foram significativamente maiores para o *S. aureus* ($p<0,05$), seguido pelo *E. faecalis* e pela *P. aeruginosa*, a qual não apresentou diferença em relação a *E. coli*. Para o grupo G5, os halos de inibição para o *S. aureus* foram significativamente maiores daqueles apresentados pelos demais microrganismos ($p<0,05$), os quais não apresentaram diferenças entre si ($p>0,05$).

Discussão

Neste estudo, para avaliar a atividade antibacteriana do MTA associado à água destilada estéril ou à clorexidina em diferentes concentrações, foi empregado o método de difusão em ágar, usando a técnica de confecção de poços. Esse método é comumente usado para avaliar a atividade antimicrobiana de materiais endodônticos (19, 20). Porém, alguns fatores como controle e padronização da densidade do inóculo, meio de cultura, seleção dos microrganismos, temperatura de incubação das placas e pontos de leitura dos halos de inibição podem afetar a dinâmica e a variabilidade de testes de difusão (21). Também devem ser

consideradas a solubilidade e a capacidade de difusão dos materiais em ágar (11, 22), a área de contato entre o ágar e o material experimental, o peso molecular do agente antimicrobiano, a concentração do material em teste, a viscosidade do gel de ágar, a concentração iônica do material em relação ao meio (20) e a toxicidade da substância teste para cada bactéria (19).

Durante a mistura para obtenção dos materiais utilizados no presente estudo, foi observada consistência semelhante, porém, não foram realizados testes químicos para analisar a interação dos componentes do cimento MTA com as diferentes concentrações de CHX, as quais podem ter modificado algumas propriedades do cimento, como por exemplo a sua difusão. Em adição, substâncias que agem por meio de seus altos valores de pH, como ácidos e bases, podem ter sua atividade alterada pela capacidade de neutralização do meio de cultura (23). Além disso, devido ao MTA possuir baixa solubilidade (4), este não se difunde muito bem em ágar e requer um longo período para alcalinizar o meio (23).

Em relação aos microrganismos utilizados neste estudo, estes foram selecionados por serem isolados com frequência em canais infectados (1, 24-26) e por terem sido, também, utilizados em outras pesquisas que avaliaram a ação antimicrobiana do MTA e da CHX (2, 4, 11-13, 21, 23). O *E. faecalis*, em particular, foi estudado por ser o microrganismo mais frequentemente isolado em casos de dentes com lesões periapicais refratárias (1, 26) e por estabelecer infecções de difícil tratamento (27).

Os resultados do presente trabalho mostraram que todos os materiais avaliados, inclusive o MTA com água destilada, apresentaram efeito antibacteriano sobre as cepas utilizadas. Porém, esses resultados diferem daqueles observados nos trabalhos de Torabinejad et al. (9) e Estrela et al. (11), nos quais o MTA não mostrou atividade antibacteriana sobre *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. No trabalho realizado por Torabinejad et al. (9), além de o MTA ser de procedência diferente daquele utilizado no presente estudo, foi empregada a técnica de colocação direta do material sobre a superfície do ágar, diferentemente da metodologia utilizada neste trabalho, onde poços foram confeccionados no ágar e os materiais foram condensados, reproduzindo o volume exato de MTA por amostra e proporcionando uma maior superfície de contato do material com o meio inoculado com cada uma das cepas bacterianas. Estrela et al. (11), utilizando metodologia semelhante à do presente estudo, verificaram que o MTA apresentou somente halos de difusão para os microrganismos *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*. O MTA Pro-Root[®] (Dentsply - Tulsa Dental, OK, USA) utilizado no estudo de Estrela et al. (11) difere do MTA-Branco (Angelus[®] Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina, PR, Brasil) utilizado neste estudo com relação às porcentagens de Silício e Ferro (maiores para o primeiro) e de Cálcio (maior para o MTA-Branco – Angelus[®]), o que pode em algum grau influenciar os resultados.

No presente estudo, para *S. aureus*, bactéria gram-positiva, foi observado maior halo de inibição em relação às outras cepas. *E. faecalis*, também bactéria gram-positiva, apresentou halos de diâmetros intermediários, enquanto, os

menores halos, foram obtidos para *E.coli* e *P. aeruginosa*, bactérias gram-negativas. Essas diferenças de comportamento podem ser justificadas devido aos distintos graus de resistência inerentes a cada bactéria. A menor resistência de bactérias gram-positivas quando comparadas às gram-negativas pode estar relacionada às diferenças nas paredes celulares destes microrganismos (28). O *E. faecalis* apesar de ser uma bactéria gram-positiva é capaz de sobreviver em pH extremamente alcalino, em torno de 11,1 (29). Como o pH do MTA permanece altamente alcalino (entre 10,2 e 12,5) por um longo período de tempo, este parece contribuir para a zona de inibição observada inclusive no grupo MTA associado a água destilada estéril (13).

Comparando os diâmetros dos halos de inibição das diferentes associações empregadas neste estudo, observou-se que para o *S. aureus*, o grupo G5 (MTA + CHX 1%) apresentou maior halo de inibição em relação aos demais grupos ($p < 0,05$), sendo estes semelhantes entre si ($p > 0,05$). Entretanto, para *E. coli* e *P. aeruginosa*, não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$) e, para o *E. faecalis*, os halos de inibição relacionados aos grupos G4 (MTA + CHX 0,2%) e G5 (MTA + CHX 1%) foram menores quando comparados com os demais ($p < 0,05$).

Os resultados observados neste trabalho concordam parcialmente com aqueles apontados por Stowe et al. (12), que compararam a associação MTA + água destilada com MTA + CHX 0,12%, observando aumento do halo de inibição sobre *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* e halo de inibição igual ou menor sobre a *P. aeruginosa* com a associação MTA + CHX 0,12%. As diferenças nos resultados

podem ser explicadas pela maior quantidade de solução de CHX incorporada ao MTA por Stowe et al. (12) (36µL) do que no presente estudo (30 µL), e às diferenças na composição do MTA utilizado (MTA Pro-Root[®] e MTA-Branco Angelus[®]).

Em um estudo testando a atividade antibacteriana de medicamentos usados intracanal, entre eles a CHX 0,12% e 0,2%, Barbosa et al. (1997) (30) observaram maior halo de inibição sobre *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* com a CHX 0,2%. Resultado diferente foi observado no presente estudo, no qual a CHX misturada ao MTA nas concentrações de 0,12% e 0,2%, não apresentaram diferença significativa no tamanho dos halos de inibição para os mesmos microrganismos. Este resultado sugere uma interação da CHX com o cimento, alterando sua difusão e, conseqüentemente, o tamanho dos halos de inibição quando comparados com aqueles obtidos por Barbosa et al. (1997) (30) com a solução de clorexidina isoladamente.

O MTA parece possuir mecanismo de ação semelhante ao apresentado pelo hidróxido de cálcio com relação à atividade antibacteriana (10) e à formação de barreira mineralizada (31, 32). Isso pode ser justificado pelo fato do óxido de cálcio presente no MTA quando em contato com os fluidos tissulares, promover a formação de silicato de cálcio e hidróxido de cálcio (4). Em estudo realizado por Lynne et al. (33), no qual foi avaliada a atividade antibacteriana do hidróxido de cálcio, da solução de CHX a 0,12% (Peridex[®]) e da associação destes sobre *E. faecalis* em amostras de dentina infectadas, a solução de hidróxido de cálcio apresentou maior atividade antibacteriana em comparação à solução de CHX e à

associação de ambos. Esses resultados foram explicados pela neutralização das propriedades do hidróxido de cálcio pela CHX, além de, provavelmente, esta ter afetado as propriedades físicas e químicas do hidróxido de cálcio, assim como a sua capacidade de dissociação. Zerella et al. (34) mostraram em estudo utilizando absorvância de luz ultravioleta, que mais de 99% da CHX precipitava na presença do hidróxido de cálcio e que a dissociação da CHX em meio aquoso é menor em pH básico, ou seja, a maioria as moléculas de CHX na presença de hidróxido de cálcio não sofreram dissociação. Os autores sugeriram que a CHX sofre desprotonação dos grupos guanidina em pH maior que oito gerado pelo hidróxido de cálcio em meio aquoso, e que isso seria responsável pela redução da ação antimicrobiana da CHX associada ao hidróxido de cálcio. Como o MTA tem mecanismo de ação e pH semelhantes ao hidróxido de cálcio, é provável que, também, provoque uma redução da atividade antibacteriana da CHX.

Em estudo avaliando a influência do hidróxido de cálcio sobre a fragmentação do digluconato de CHX por meio de espectrometria de massa, foi constatado que na mistura do digluconato de CHX a 0,2% com o hidróxido de cálcio, não foi encontrada a CHX, indicando a sua total fragmentação (35). O autor sugere que o efeito antimicrobiano observado por alguns estudos para essa associação de medicamentos não se deve à CHX e sim à ação dos diferentes subprodutos de sua fragmentação.

Baseado nessas informações, pode-se inferir que o mesmo possa ter ocorrido quando da associação do MTA à CHX em concentrações crescentes de 0,06% a 1%, resultando em ausência de diferença estatística com relação ao

tamanho dos halos de inibição para *E. coli* e *P. aeruginosa* e em menores halos de inibição sobre o *E. faecalis* quando comparados ao MTA manipulado com água destilada.

Conclusão

Todos os materiais em teste apresentaram atividade antibacteriana manifestada por meio da presença de halo de inibição. A adição de CHX ao MTA determinou aumento da atividade antibacteriana para o microrganismo *S. aureus* apenas na concentração de 1%; não melhorou a atividade antibacteriana do cimento sobre *E. coli* e *P. aeruginosa* e promoveu redução da atividade antibacteriana sobre o *E. faecalis*, nas maiores concentrações estudadas.

Agradecimentos

À Angelus[®] Indústria de Produtos Odontológicos Ltda, pelo fornecimento do MTA e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo: 301029/2007-5) pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

Referências

1. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85(1):86-93.
2. D'Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. *J Endod* 1999;25(5):351-353.
3. Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod* 1997;23(4):225-228.
4. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995;21(7):349-353.
5. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod* 1995;21(6):295-299.
6. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod* 1993;19(12):591-595.
7. Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J Endod* 1995;21(3):109-112.
8. Apaydin ES, Shabahang S, Torabinejad M. Hard-tissue healing after application of fresh or set MTA as root-end-filling material. *J Endod* 2004;30(1):21-24.

9. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. J Endod 1995;21(8):403-406.
10. Fridland M, Rosado R. MTA solubility: a long term study. J Endod 2005;31(5):376-379.
11. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pecora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. Braz Dent J 2000;11(1):3-9.
12. Stowe TJ, Sedgley CM, Stowe B, Fenno JC. The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate. J Endod 2004;30(6):429-431.
13. Holt DM, Watts JD, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. The antimicrobial effect against *Enterococcus faecalis* and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chlorhexidine liquid. J Endod 2007;33(7):844-847.
14. Shahi S, Rahimi S, Yavari HR, Shakouie S, Nezafati S, Abdolrahimi M. Sealing ability of white and gray mineral trioxide aggregate mixed with distilled water and 0.12% chlorhexidine gluconate when used as root-end filling materials. J Endod 2007;33(12):1429-1432.
15. Lin YH, Mickel AK, Chogle S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. J Endod 2003;29(9):565-566.
16. Rolla G, Loe H, Schiott CR. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity. Arch Oral Biol 1971;16(9):1109-1116.

17. Basrani B, Santos JM, Tjaderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94(2):240-245.
18. Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J* 1999;32(2):99-102.
19. 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(6):784-790.
20. Leonardo MR, da Silva LA, Tanomaru Filho M, Bonifacio KC, Ito IY. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *J Endod* 2000;26(7):391-394.
21. Sipert CR, Hussne RP, Nishiyama CK, Torres SA. In vitro antimicrobial activity of Fill Canal, Sealapex, Mineral Trioxide Aggregate, Portland cement and EndoRez. *Int Endod J* 2005;38(8):539-543.
22. Estrela C, Rodrigues de Araujo Estrela C, Bammann LL, Pecora JD. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. *J Endod* 2001;27(12):720-723.
23. Siqueira JF, Jr., de Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod* 1997;23(3):167-169.
24. Keudell K, Conte M, Fujimoto L, Ernest M, Berry HG. Microorganisms isolated from pulp chambers. *J Endod* 1976;2(5):146-148.

25. Zavistoski J, Dzink J, Onderdonk A, Bartlett J. Quantitative bacteriology of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980;49(2):171-174.
26. Baumgartner JC, Falkler WA, Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* 1991;17(8):380-383.
27. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992;18(9):427-430.
28. Eldeniz AU, Hadimli HH, Ataoglu H, Orstavik D. Antibacterial effect of selected root-end filling materials. *J Endod* 2006;32(4):345-349.
29. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002;35(3):221-228.
30. Barbosa CA, Gonçalves RB, Siqueira JF, Jr., de Uzeda M. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. *J Endod* 1997;23(5):297-300.
31. Holland R, de Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabe PF, Otoboni Filho JA, et al. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Brazilian dental journal* 2001;12(2):109-113.
32. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Faraco Junior IM, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J* 2001;12(1):3-8.

33. Lynne RE, Liewehr FR, West LA, Patton WR, Buxton TB, McPherson JC. In vitro antimicrobial activity of various medication preparations on *E. faecalis* in root canal dentin. J Endod 2003;29(3):187-190.
34. Zerella JA, Fouad AF, Spangberg LS. Effectiveness of a calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate mixture as disinfectant during retreatment of failed endodontic cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005;100(6):756-761.
35. Barbin EL. Análise química da clorexidina misturada ou não ao hidróxido de cálcio [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2008.

Tabela 1 - Apresentação dos materiais utilizados no estudo (composição, fabricante e quantidade utilizada na preparação do cimento)

Material	Composição	Fabricante	Quantidade
MTA Branco	SiO ₂ ; K ₂ O; Al ₂ O ₃ ; Na ₂ O; Fe ₂ O ₃ ; SO ₃ ; CaO; Bi ₂ O ₃ ; MgO e resíduos insolúveis (sílica cristalina, óxido de cálcio e sulfato de potássio e sódio)	Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos Ltda, Londrina, PR, Brasil	100 mg
Clorexidina	Solução aquosa de gluconato de clorexidina	HENRIFARMA Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP, Brasil	30µL
Água Destilada Estéril	----	Laboratório de Fisiologia e Patologia Experimental Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP	30µL

Tabela 2 – Diâmetro do halo de inibição (mm) obtido de acordo com a cepa bacteriana e o material estudado (mediana, mínimo e máximo)

CEPA BACTERIANA	MATERIAL				
	G1 MTA + H2O	G2 MTA + CHX 0,06%	G3 MTA + CHX 0,12%	G4 MTA + CHX 0,2%	G5 MTA + CHX 1%
<i>S. aureus</i> (ATCC - 25923)	13,7 (13,1 - 15,4) A b	14 (13,1 - 14,6) A b	14,3 (13,2 - 14,7) A b	14 (13 - 14,7) A b	14,9 (13,9 - 15,5) A a
<i>E. coli</i> (ATCC - 25922)	11,8 (11,3 - 13,5) B a	11,9 (11,1 - 13) B a	12 (11,2 - 13) C a	12,2 (11,2 - 12,7) C a	12,5 (11,7 - 13,3) B a
<i>P.aeruginosa</i> (ATCC - 27852)	12,5 (12,1 - 12,9) A a	12,5 (12,1 - 12,9) A a	12,5 (12,1 - 12,9) A a	12,5 (12,1 - 12,9) A a	12,5 (12,1 - 12,9) A a
<i>E. faecalis</i> (ATCC - 29262)	13,5 (12,5 - 14,6) A a	13,8 (13,2 - 14,6) A a	13,4 (12,5 - 14,4) B a	13,1 (12,1 - 14,4) B ab	12,5 (12 - 14) B b

* Valores seguidos por letras maiúsculas iguais nas colunas e letras minúsculas iguais nas linhas não apresentam diferença estatisticamente significante (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Efeito citotóxico do agregado de trióxido mineral associado à clorexidina sobre cultura de fibroblastos

Autores: Indri Nogueira¹, Fernanda C. R. Lessa¹, Carlos A. S. Costa²,

Elisa M. A. Giro^{1*}

¹ Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil.

² Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil.

* **Autor para correspondência**

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil. 14801-903

Phone: +55 16 33016336

E-mail: egiro@foar.unesp.br

Resumo

O objetivo desse estudo *in vitro* foi avaliar a citotoxicidade de uma formulação de agregado de trióxido mineral (MTA) associado a diferentes concentrações de clorexidina (CHX) sobre cultura de fibroblastos (MPDL). Para isto, corpos de prova com 4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura foram preparados com cada uma das associações: MTA + água destilada (G1), MTA + CHX 0,06% (G2), MTA + CHX 0,12% (G3), MTA + CHX 0,2% (G4) e MTA + CHX 1% (G5). Os corpos de prova foram imersos individualmente em recipientes contendo 1,1 mL de meio de cultura DMEM, onde permaneceram por 24 horas ou por 7 dias para a obtenção dos extratos. Fibroblastos do ligamento periodontal de camundongos (20.000 células/cm²) foram semeados em compartimentos de placas para cultura de células de 24 compartimentos e incubados por 48 horas a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar. Decorrido este período, o meio de cultura de cada compartimento foi substituído por 1 mL dos extratos dos materiais e as células foram incubadas por mais 24 horas. O meio de cultura (DMEM) foi usado como grupo controle negativo (G6). A citotoxicidade foi avaliada pela análise do metabolismo celular (teste do MTT) e pela análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura. Para os extratos de 24 horas houve redução do metabolismo celular de 11,87%; 23,63%; 21,87%; 34,64% e 83,01%, respectivamente, para os grupos G1 a G5. Para os extratos de sete dias, a redução foi de 61,35%; 71,45%; 75,43%; 81,26% e 86,13%, respectivamente. Para ambos os períodos de obtenção dos extratos, o metabolismo celular foi estatisticamente menor para todos os grupos experimentais quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$). O menor efeito citotóxico foi observado para G1 ($p < 0,05$), seguido pelos grupos G2 e G3, que não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0,05$). Os grupos G4 e G5 apresentaram os maiores efeitos citotóxicos ($p < 0,05$), sendo G5 mais citotóxico do que G4 tanto para o extrato de 24 horas quanto de 7 dias. A análise em microscopia eletrônica de varredura demonstrou que o aumento da concentração de clorexidina incorporada ao MTA resultou em uma redução do número de células aderidas ao substrato de vidro e marcante alteração na morfologia celular. Baseado nas condições experimentais deste trabalho, pode-se concluir que, independente do tempo de obtenção dos extratos, quanto maior a concentração de CHX incorporada ao MTA, mais tóxico o cimento para os fibroblastos do ligamento periodontal de camundongos (MDPL) e o extrato de 7 dias foi mais citotóxico que o extrato de 24 horas.

Palavras-chave: Clorexidina; endodontia; fibroblastos; materiais biocompatíveis; viabilidade celular.

Introdução

A cirurgia pararendodôntica é indicada em casos de patologia perirradicular persistente, sendo que o material retrobturador ideal deve promover selamento adequado do periápice, apresentar boa adesão à estrutura dental, baixa solubilidade, estabilidade dimensional e ser antimicrobiano (1, 2). Além destas propriedades, por permanecer em contato com a região periapical, o material retrobturador deve ser biocompatível (1) e permitir o reparo dos tecidos periapicais pela neoformação de cimento, ligamento periodontal e osso alveolar (3-5).

Vários materiais para retrobturação têm sido utilizados no decorrer dos anos, como o amálgama, cimentos a base de óxido de zinco e eugenol, gutapercha, resina composta, cimentos de ionômero de vidro e compômeros (6). Contudo, nenhum desses materiais preenche as propriedades desejáveis para um material retrobturador ideal. O amálgama e os cimentos a base de óxido de zinco e eugenol tiveram seu uso desestimulado por apresentarem várias características desfavoráveis. Com a utilização do amálgama foram observadas: liberação de mercúrio e outros íons, corrosão, manchamento, expansão tardia, infiltração marginal e presença de reações inflamatórias agudas (1, 5, 7). Por outro lado, os cimentos a base de óxido de zinco e eugenol, apresentam sensibilidade à umidade com conseqüente solubilidade e são altamente tóxicos aos tecidos vivos (1, 4, 7, 8).

Diferentes formulações de agregado de trióxido mineral (MTA) foram desenvolvidas com a finalidade de selar comunicações entre os canais radiculares

e o periodonto (2), e, recentemente passaram a ser usadas também como retrobturadores (2, 5, 9-14). Estudos *in vivo* têm mostrado a sua biocompatibilidade com os tecidos perirradiculares, permitindo o reparo com formação de cimento inclusive sobre o material (3-5, 8). Comparado ao amálgama e aos cimentos a base de óxido de zinco e eugenol, o MTA apresenta melhor selamento apical (2, 9) e adaptação às paredes dentinárias (12), baixa citotoxicidade (7, 15), além de induzir menor reação inflamatória nos tecidos periapicais adjacentes à área de ressecção radicular (3-5, 8).

O estímulo para a reparação tecidual depende da ausência de agentes irritantes originários de produtos metabólicos bacterianos e da origem físico-química dos materiais seladores (16). Apesar das várias propriedades apresentadas pelas formulações de MTA, alguns estudos apontam que este material não apresenta efeito antibacteriano sobre alguns microrganismos geralmente encontrados em canais infectados, como o *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (14, 17, 18).

Com o objetivo de melhorar a atividade antimicrobiana do MTA, tem sido proposta a incorporação da clorexidina (CHX) a este material (19-21). Na concentração de 0,12%, a CHX associada ao MTA, parece promover uma melhor atividade antimicrobiana (19) sem alterar a capacidade seladora do material (20). Porém, esta mesma concentração de CHX adicionada ao MTA, quando em contato com fibroblastos de gengiva de camundongos e macrófagos, induziu maior taxa de apoptose quando comparado ao MTA preparado com água destilada (21). Todavia, os efeitos que a adição de diferentes concentrações de CHX ao

MTA pode causar às células do ligamento periodontal ainda não estão completamente elucidados.

Uma vez que o material retrobturador permanece em íntimo contato com tecidos perirradiculares, sua citotoxicidade deve ser melhor avaliada antes da realização de estudos in vivo. Visando a aplicação dessa associação de materiais em procedimentos de retrobturação, o objetivo desse trabalho foi avaliar a citotoxicidade de uma formulação de MTA (MTA-Branco - Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina, PR, Brasil) preparado com diferentes concentrações de CHX sobre cultura de fibroblastos do ligamento periodontal de camundongos (MPDL), por meio da análise do metabolismo e morfologia celular.

Material e Métodos

Cultura das células

Para a avaliação da citotoxicidade da associação do MTA com diferentes concentrações de CHX, foi utilizada linhagem estabelecida de fibroblastos do ligamento periodontal de camundongos (MPDL). Em capela de fluxo laminar vertical (Bio Protector Plus 12 – Veco, São Paulo, SP, Brasil), as células foram semeadas em frascos de cultura esterilizados de 75 cm² (Costar Corp., Cambridge, MA, USA), utilizando o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO,

Grand Island, NY, USA). Estas células foram mantidas em incubadora umidificada a 37° C, com 5% de CO₂ e 95% de ar, sendo que repiques foram realizados até a obtenção do número de células suficientes para a realização do experimento. Em seguida, 2x10⁴ células/cm² foram semeadas em placas de acrílico esterilizadas de 24 compartimentos (Costar, Cambridge, MA, USA) contendo 1 mL de meio de cultura DMEM suplementado. As placas foram mantidas em incubadora a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar, durante 48 horas.

Confecção dos corpos de prova

Os materiais utilizados neste estudo assim como sua composição química e respectivos fabricantes estão apresentados na Tabela 1.

O MTA-Branco (Agregado de Trióxido Mineral - Angelus[®] Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina, PR, Brasil) foi manipulado utilizando-se placa de vidro e espátula esterilizadas, na proporção de 100 mg de pó/30 µL de líquido (recomendada pelo fabricante). No grupo G1, o MTA foi manipulado com água destilada estéril. Nos grupos G2 a G5, a água destilada foi substituída pela solução de CHX em diferentes concentrações (G2 = MTA + CHX 0,06%, G3 = MTA + CHX 0,12%, G4 = MTA + CHX 0,2% e G5 = MTA + CHX 1%). Para o preparo e padronização dos corpos de prova (4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura), foram utilizadas matrizes bipartidas de aço inoxidável esterilizadas. Foram confeccionados 20 corpos de prova para cada grupo experimental, sendo 16 utilizados para a avaliação do metabolismo celular e 4 para a análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os corpos de

prova permaneceram nas matrizes por 10 minutos em estufa umidificada a 37°C para reação de presa inicial do material. Em seguida, foram removidos das matrizes e colocados individualmente em compartimentos de placas de acrílico esterilizadas de 24 compartimentos, cada um contendo 1,1 mL de meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino. Metade dos corpos de prova permaneceram submersos no meio de cultura por 24 horas e a outra metade por 7 dias em incubadora a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar, para obtenção dos extratos dos materiais, ou seja, o meio de cultura contendo os produtos liberados pelo material. Como grupo controle negativo, foi utilizado o meio de cultura DMEM (G6).

Avaliação do metabolismo celular

A análise do metabolismo celular foi realizada por meio da demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (SDH), enzima que representa a taxa de respiração mitocondrial das células viáveis. Para atingir este objetivo, foi utilizada a análise colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) (22).

Após o período de 48 horas de incubação das células com o meio de cultura, este foi substituído por 1 mL dos extratos de 24 horas ou de 7 dias. As células em contato com esses extratos foram incubadas por mais 24 horas, nas mesmas condições descritas.

Em seguida, oito espécimes de cada grupo tiveram os extratos substituídos por 900 µL de meio de cultura DMEM e 100 µL de solução de MTT (5 mg/mL em solução salina fosfatada tamponada). Após 4 horas de incubação a 37°C, o meio de cultura com a solução de MTT foi removido e cada compartimento

recebeu 600 µL de solução de isopropanol acidificado em HCl a 0,04 N para solubilizar os cristais de formazan formados. Três alíquotas de 100 µL de cada compartimento foram transferidas para placas de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, USA). A coloração produzida foi quantificada por espectrofotometria em Leitor Universal de ELISA (ELX 800 - Universal Microplate Reader- BIOTEK Instruments, ICC, USA) em um comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram obtidos por meio da média, em valores numéricos, das três alíquotas de cada compartimento. Em seguida, o efeito inibitório dos diferentes grupos estudados sobre o metabolismo celular foi calculado em porcentagem, sendo que o grupo controle negativo (DMEM) foi considerado como 100% do metabolismo celular.

Avaliação da morfologia celular

Para análise da morfologia celular em MEV foram utilizados dois compartimentos de placas de acrílico de 24 compartimentos para cada grupo (G1 a G6) e período de obtenção dos extratos (24 horas e 7 dias). Na base de cada compartimento foi posicionada uma lamínula de vidro esterilizada (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) de 12 mm de diâmetro.

Foram semeadas 2×10^4 células/cm² em cada compartimento como descrito anteriormente. Decorrido o período de 48 horas de incubação, o meio de cultura de cada compartimento foi substituído pelos extratos obtidos dos materiais ou pela solução controle (DMEM) e as placas foram mantidas por mais 24 horas em incubadora.

Em seguida, os extratos e o controle foram aspirados e, os compartimentos contendo as lamínulas de vidro com as células aderidas foram lavados com PBS. Em seguida, as células foram fixadas por 2 horas em glutaraldeído 2,5% (1 mL por compartimento), submetidas à lavagem por três vezes com 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem), pós-fixação em 200 µL de tetróxido de ósmio a 1% por 60 minutos, lavagem por duas vezes em 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem) e por duas vezes com 1 mL de água deionizada (15 minutos cada lavagem). As células foram, então, desidratadas em etanol 30%, 50% e 70%, por 30 minutos em cada solução e em etanol 95% e 100% por duas vezes de 30 minutos. Em seguida, as lamínulas foram mantidas em 200 µL de HMDS (Hexametil-disiloxano – ACROS ORGANICS, New Jersey, USA), um solvente de baixa tensão superficial que auxilia na secagem das células, sendo realizadas três trocas de 20 minutos cada.

As lamínulas de vidro com as células aderidas foram, então, removidas dos recipientes de acrílico e fixadas em *stubs* metálicos, os quais permaneceram em dessecador por 12 horas. Em seguida, procedeu-se a metalização dos espécimes com ouro, sendo que a morfologia celular foi avaliada em microscópio eletrônico de varredura (ZEISS, model DSM-940A, Oberkochen, Germany). A análise da morfologia celular foi realizada de forma descritiva.

Tratamento estatístico dos dados

O conjunto de dados referentes ao metabolismo celular foi avaliado quanto à distribuição e homogeneidade de variância. Como a distribuição dos dados não foi normal e não houve homogeneidade de variâncias, foram utilizados os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney para a realização das inferências. Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

Resultados

As medianas dos valores da absorbância referentes ao metabolismo celular, assim como os valores mínimo e máximo estão apresentadas na Tabela 2. A redução percentual média do metabolismo celular está apresentada nas Figuras 1 e 2, para os extratos de 24 horas e de 7 dias, respectivamente.

Para os extratos obtidos no período de 24 horas, a redução percentual do metabolismo celular foi de 11,87%; 23,63%; 21,87%; 34,64% e 83,01%, para os grupos G1 a G5, respectivamente. O grupo G1 apresentou menor redução do metabolismo celular em relação ao grupo controle (G6), quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Os grupos G2 e G3 foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$) e, apresentaram menor porcentagem de redução do metabolismo celular quando comparados aos grupos G4 e G5. O grupo G5, por sua vez, foi o grupo que apresentou maior taxa de redução do metabolismo celular.

Para os extratos de 7 dias, a redução do metabolismo celular foi de 61,35%; 71,45%; 75,43%; 81,26% e 86,13%, respectivamente, para os grupos G1 a G5.

Em relação à análise realizada por meio da microscopia eletrônica de varredura, no grupo controle (G6 - DMEM) observou-se grande número de células MPDL aderidas ao substrato de vidro (Figuras 3A e 5A), as quais exibiam características morfológicas típicas como forma achatada, superfície lisa e longos prolongamentos citoplasmáticos fortemente aderidos à superfície da lamínula de vidro (Figura 4A e 6A). Quando o extrato de 24 horas foi colocado em contato com as células, no grupo G1 (MTA + água destilada) observou-se uma redução no número de células MPDL, as quais apresentavam-se dispostas sobre toda a lamínula de vidro formando em algumas regiões pequenos agrupamentos (Figura 3B). Morfologicamente (Figura 4B), as células mostraram características semelhantes às do grupo controle (Figura 4A). Nos grupos G2 (MTA + CHX 0,06%) e G3 (MTA + CHX 0,12%), também houve redução do número de fibroblastos em relação ao grupo controle. Assim como em G1, observou-se, para estes grupos, formação de agrupamentos, porém, com menor densidade celular (Figuras 3C e 3D). Os fibroblastos apresentavam-se com volume diminuído e morfologia estrelada, exibindo longos prolongamentos citoplasmáticos sobre o substrato de vidro (Figuras 4C e 4D). No Grupo G4 (MTA + CHX 0,2%), as células estavam presentes em menor número e com volume reduzido em relação aos grupos G2 e G3, e foram observados poucos agrupamentos celulares sobre a lamínula de vidro (Figura 3E). A presença de poucos prolongamentos

citoplasmáticos alongados e afilados foi notada neste grupo, sendo que restos citoplasmáticos de células mortas permaneceram aderidos ao substrato de vidro (Figura 4E). No Grupo G5 (MTA + CHX 1%) não foi observada a presença de fibroblastos, mas apenas de pequenas estruturas com formato irregular (Figura 3F), sugestivas de fragmentos de componentes celulares.

Para os extratos de 7 dias, as alterações foram mais acentuadas quando comparadas com aquelas observadas para os extratos de 24 horas. Porém, da mesma forma que para os extratos de 24 horas, o número de células diminuiu à medida que aumentou a concentração da solução de CHX adicionada ao MTA (Figura 5B-F). A morfologia celular se assemelhou àquela dos grupos correspondentes com extratos de 24 horas (Figura 6A-E).

Uma comparação entre os grupos demonstrou que quanto maior a concentração de CHX incorporada ao MTA mais intensa foi a redução do número de células aderidas ao substrato de vidro e a alteração da morfologia celular. Assim, foi demonstrado que as alterações de número e morfologia celular foram dose-dependentes.

Discussão

A avaliação da biocompatibilidade dos materiais utilizados para retrobturação possui grande relevância clínica, uma vez que esses materiais podem causar irritação dos tecidos periapicais e retardar a cicatrização na região (21).

Os testes de citotoxicidade em cultura de células têm sido muito utilizados por serem relativamente simples e por fornecerem informações valiosas, as quais indicam se os materiais apresentam propriedades que justificam a realização de testes complementares *in vitro* e *in vivo* (23). Neste estudo, para a avaliação da citotoxicidade dos componentes liberados pela associação do MTA com a clorexidina (CHX), foi empregado o teste colorimétrico do metiltetrazolium (teste do MTT), que determina o metabolismo celular pela avaliação da taxa de respiração mitocondrial das células viáveis. As mitocôndrias das células viáveis possuem uma enzima denominada desidrogenase succínica que, quando em contato com os anéis de tetrazolium da solução de MTT, formam cristais de formazan que possuem coloração violeta (22). O teste do MTT foi selecionado, baseado no fato de o MTA ser uma substância hidrófila que libera componentes iônicos, os quais são capazes de interferir com as atividades enzimáticas intracelulares (24).

A linhagem de células do ligamento periodontal de camundongos (MPDL) foi utilizada, uma vez que, em uma situação clínica de cirurgia periododôntica com retrobturação, são células semelhantes a essas que permanecem em contato com o material retrobturador e são responsáveis pela formação e manutenção dos anexos do ligamento periodontal, assim como estão envolvidas na reparação, remodelação e regeneração do cemento e tecido ósseo adjacentes (25).

O uso de extratos simula o ambiente pós-cirúrgico imediato, no qual os elementos tóxicos liberados pelo material retrobturador nos fluidos teciduais, atuam diretamente sobre as células e tecidos periapicais. Além disso, os extratos

podem ser usados em várias concentrações para a avaliação da relação dose-resposta (15). No presente estudo, os elementos liberados em 24 horas pelo MTA recém manipulado associado às diferentes soluções de CHX causaram menor redução do metabolismo celular (G1: 11,87%; G2: 23,63%; G3: 21,87%; G4: 34,64%; G5: 83,01%) quando comparados aos extratos obtidos no período de 7 dias (G1: 61,35%; G2: 71,45%; G3: 75,43%; G4: 81,26%; G5: 86,13%). Essa diferença pode ser explicada porque em períodos mais longos, maior número e quantidade de componentes tóxicos são liberados do material para o meio, causando assim, maiores danos celulares.

Neste estudo, os corpos de prova foram colocados em contato com o meio de cultura para obtenção dos extratos 10 minutos após a manipulação dos materiais, tempo necessário para a presa inicial. Entretanto, como o MTA demora cerca de 4 horas para atingir a presa final (2), o menor tempo de espera para a colocação dos corpos de prova em meio de cultura pode ter determinado uma maior liberação de componentes, tornando este mais tóxico às células. Keiser et al. (2000) (15) avaliando o MTA recém manipulado e com 24 horas de presa, mostraram que a toxicidade sobre fibroblastos do ligamento periodontal de humanos diminuiu significativamente após 24 horas de presa (cerca de 78% de viabilidade celular) comparado ao extrato do MTA recém manipulado (cerca de 40% de viabilidade celular).

O extrato obtido do MTA associado à água destilada foi o grupo experimental que apresentou a menor taxa de redução do metabolismo celular e, menor alteração do número e da morfologia celular em relação ao grupo controle

(DMEM), independente do período de obtenção do extrato. Estudos avaliando a citotoxicidade do MTA associado à água destilada, em cultura de fibroblastos periodontais de humanos, não mostraram efeitos tóxicos relacionados ao MTA (26) e determinaram a indução de expressão de fosfatase alcalina, osteonectina e osteopontina por essas células (27).

Em cultura de células pulpares, estudos avaliando a citotoxicidade, demonstraram que o MTA induziu a proliferação celular, sugerindo que esse material é biocompatível e possui um efeito positivo na regeneração do complexo dentino-pulpar *in vivo* (28, 29). Além disso, o MTA quando em contato com matriz de dentina, parece induzir a liberação de fatores de crescimento e outras moléculas bioativas que têm potencial para estimular a dentinogênese reparadora resultando na formação de barreira mineralizada (30). Segundo Mitchell et al. (1999) (31), o MTA estimula a expressão de IL-6 e IL-8, as quais são responsáveis pela mobilização e o recrutamento de precursores de osteoclastos, bem como, pelo aumento da angiogênese. Isto sugere, que este material além de biocompatível, pode promover o reparo pela estimulação da remodelação óssea.

Microanálises realizadas utilizando o pó do MTA mostraram que o cálcio e o fósforo são os principais íons presentes neste material (11). Como estes íons também são os principais componentes dos tecidos duros dentais, esta pode ser uma explicação plausível para a boa compatibilidade biológica apresentada pelo MTA quando usado em contato com células e tecidos vivos (11). Esses dados podem ainda, explicar a pequena redução do metabolismo das células MPDL

provocada pelo extrato de 24 horas do MTA associado à água destilada, obtida nesse estudo (11,87%).

Em relação à associação MTA/solução de CHX, um estudo avaliando a ação do MTA ProRoot[®] misturado à CHX 0,12% sobre fibroblastos e macrófagos logo após a manipulação, mostrou aumento na porcentagem de apoptose dessas células e diminuição na síntese de DNA quando comparado ao MTA ProRoot[®] misturado à água destilada (21). Esses resultados estão de acordo com os apresentados no presente trabalho, no qual foi observada redução de 21,87% do metabolismo celular para o extrato de 24 horas do MTA + CHX 0,12%, e de 75,43% para o extrato de 7 dias. Esta redução do metabolismo celular foi significativamente maior do que àquela observada para o MTA + água destilada (11,87% e 61,35%, para os extratos de 24 horas e 7 dias, respectivamente. Além disso, para o grupo MTA + CHX 0,12%, houve uma maior redução do número de células, as quais apresentaram-se com volume diminuído e com morfologia alterada, quando comparadas às células do grupo MTA + água destilada.

Algumas pesquisas afirmam que a citotoxicidade provocada pela clorexidina é dose-dependente, ou seja, quanto maior é a concentração dessa substância, maior a citotoxicidade por ela determinada (32-35). Essa característica foi observada no teste do MTT deste estudo, pois quanto maior a concentração de CHX adicionada ao MTA, maior foi a porcentagem de redução do metabolismo celular. Observando-se a morfologia celular, essa particularidade também pôde ser constatada. No grupo controle foi observada morfologia celular típica caracterizada por forma achatada, superfície lisa e longos prolongamentos

citoplasmáticos, porém, à medida que a concentração de CHX incorporada ao MTA aumentou, maiores danos celular puderam ser visualizados. Dentre estes danos, foi constatado desde a redução do número e do volume de células aderidas ao substrato de vidro até estruturas totalmente irregulares, sugerindo o rompimento do citoplasma e a fragmentação das células.

Apesar dos resultados apresentados, particularmente para os extratos obtidos em 7 dias, mostrarem elevada citotoxicidade, a metodologia empregada no presente experimento apresenta algumas limitações em reproduzir as condições fisiológicas presentes na região periapical. Isso restringe a extrapolação dos resultados para situações *in vivo*, uma vez que estes podem não refletir de forma real os efeitos dos materiais quando aplicados em condições clínicas. Entretanto, estes estudos laboratoriais servem como referência para futuros estudos *in vivo*, os quais devem ser conduzidos com a finalidade de determinar os efeitos biológicos induzidos pela associação MTA/CHX sobre diferentes tecidos.

Conclusão

Baseado nas condições experimentais desse trabalho, pôde-se concluir que independente do tempo de obtenção dos extratos, quanto maior a concentração de CHX incorporada ao MTA, mais tóxico é o cimento para os fibroblastos MDPL. Independente da concentração da solução de CHX utilizada na preparação do cimento MTA, este material apresenta maior citotoxicidade quanto maior o tempo de obtenção do extrato.

Agradecimentos

Ao Dr. Elliot W. Kitagima do NAP/MEPA – ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil, pelo auxílio para a microscopia eletrônica de varredura (MEV).
À Angelus[®] Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., pelo fornecimento do material MTA e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (301029/2007-5) pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

Referências

1. Gartner AH, Dorn SO. Advances in endodontic surgery. *Dent Clin North Am* 1992;36(2):357-378.
2. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod* 1993;19(12):591-595.
3. Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod* 1997;23(4):225-228.
4. Baek SH, Plenk H, Jr., Kim S. Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, SuperEBA, and MTA as root-end filling materials. *J Endod* 2005;31(6):444-449.
5. Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *J Endod* 1995;21(12):603-608.
6. Friedman S. Retrograde approaches in endodontic therapy. *Endod Dent Traumatol* 1991;7(3):97-107.
7. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod* 1995;21(10):489-492.
8. Yildirim T, Gencoglu N, Firat I, Perk C, Guzel O. Histologic study of furcation perforations treated with MTA or Super EBA in dogs' teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100(1):120-124.

9. Bates CF, Carnes DL, del Rio CE. Longitudinal sealing ability of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J Endod* 1996;22(11):575-578.
10. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kaiyawasam SP. Tissue reaction to implanted super-EBA and mineral trioxide aggregate in the mandible of guinea pigs: a preliminary report. *J Endod* 1995;21(11):569-571.
11. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995;21(7):349-353.
12. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod* 1995;21(6):295-299.
13. Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J Endod* 1995;21(3):109-112.
14. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. *J Endod* 1995;21(8):403-406.
15. Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* 2000;26(5):288-291.
16. Leonardo MR, Salgado AA, da Silva LA, Tanomaru Filho M. Apical and periapical repair of dogs' teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(1):69-74.
17. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pecora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J* 2000;11(1):3-9.
18. Miyagak DC, de Carvalho EM, Robazza CR, Chavasco JK, Levorato GL. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of endodontic sealers. *Braz Oral Res* 2006;20(4):303-306.
19. Stowe TJ, Sedgley CM, Stowe B, Fenno JC. The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2004;30(6):429-431.
20. Shahi S, Rahimi S, Yavari HR, Shakouie S, Nezafati S, Abdolrahimi M. Sealing ability of white and gray mineral trioxide aggregate mixed with distilled water and 0.12% chlorhexidine gluconate when used as root-end filling materials. *J Endod* 2007;33(12):1429-1432.

21. Hernandez EP, Botero TM, Mantellini MG, McDonald NJ, Nor JE. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages in vitro. *Int Endod J* 2005;38(2):137-143.
22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1-2):55-63.
23. Tronstad L, Wennberg A. In vitro assessment of the toxicity of filling materials. *Int Endod J* 1980;13(3):131-138.
24. Schweickl H, Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci* 1996;104(3):292-299.
25. Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol* 2000 2000;24:28-55.
26. Gorduysus M, Avcu N, Gorduysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F, et al. Cytotoxic effects of four different endodontic materials in human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* 2007;33(12):1450-1454.
27. Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *J Dent Res* 2004;83(5):408-413.
28. Jafari-Moghaddame S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. *J Endodon* 2005; 31(5):387-391.
29. Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J* 2006;39(5):415-422.
30. Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent* 2007;35(8):636-642.
31. Mitchell PJ, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* 1999;20(2):167-173.
32. Cline NV, Layman DL. The effects of chlorhexidine on the attachment and growth of cultured human periodontal cells. *J Periodontol* 1992;63(7):598-602.
33. Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol* 1999;70(12):1443-1448.

34. de Souza LB, de Aquino SG, de Souza PP, Hebling J, Costa CA. Cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine. *Am J Dent* 2007;20(6):400-404.
35. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro* 2001;15(4-5):271-276.

Tabela 1 - Apresentação dos materiais utilizados no estudo (composição química, fabricante e quantidade utilizada na preparação do cimento)

Material	Composição	Fabricante	Quantidade
MTA Branco	SiO ₂ ; K ₂ O; Al ₂ O ₃ ; Na ₂ O; Fe ₂ O ₃ ; SO ₃ ; CaO; Bi ₂ O ₃ ; MgO e resíduos insolúveis (sílica cristalina, óxido de cálcio e sulfato de potássio e sódio)	Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos Ltda, Londrina, PR, Brasil	100 mg
Clorexidina	Solução aquosa de gluconato de clorexidina	HENRIFARMA Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP, Brasil	30µL
Água Destilada Estéril	----	Laboratório de Fisiologia e Patologia Experimental Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP	30µL

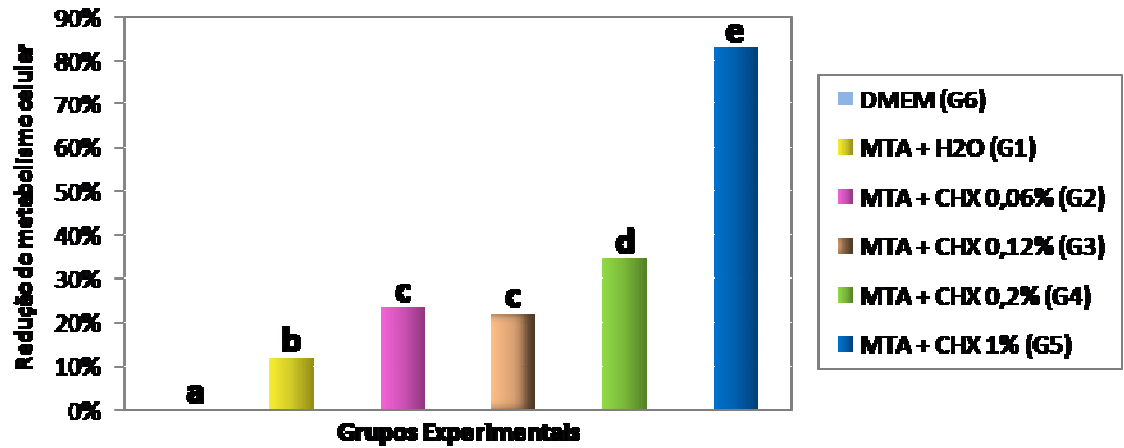


Figura 1 - Redução percentual do metabolismo celular de fibroblastos do ligamento periodontal de camundongos (MPDL) expostos a extratos de 24 horas do MTA associado à água destilada e à clorexidina em diferentes concentrações. DMEM completo foi usado como controle negativo e representou 100% de metabolismo celular. Colunas indicadas com letras iguais representam grupos que não apresentam diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

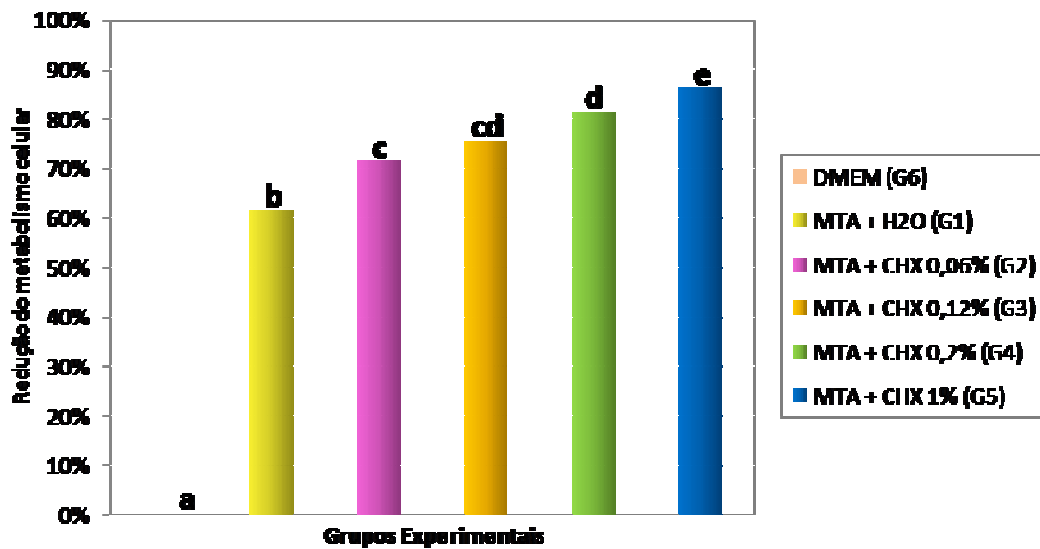


Figura 2 - Redução percentual do metabolismo celular de fibroblastos do ligamento periodontal de camundongos (MPDL) expostos a extratos de 7 dias do MTA associado à água destilada e à clorexidina em diferentes concentrações. DMEM completo foi usado como controle negativo e representou 100% de metabolismo celular. Colunas indicadas com letras iguais representam grupos que não apresentam diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Tabela 2 – Metabolismo celular (Teste do MTT) de fibroblastos do ligamento periodontal de camundongos (MPDL) após 24 horas de exposição aos extratos de 24 horas e 7 dias do MTA associado à água destilada ou à clorexidina em diferentes concentrações. Meio de cultura DMEM completo foi usado como controle negativo.

MATERIAL	Período de Obtenção do Extrato	
	24 horas Med (mín – máx)	7 dias Med (mín – máx)
MTA+H ₂ O (G1)	0,2461 (0,2219-0,2647) Ba	0,1279 (0,0687-0,1771) Bb
MTA+CHX0,06% (G2)	0,2137 (0,1871-0,2374) Ca	0,1097 (0,0670-0,1524) Cb
MTA+CHX0,12% (G3)	0,2146 (0,1917-0,2425) Ca	0,0831 (0,0517-0,1178) CDb
MTA+CHX0,2% (G4)	0,1862 (0,1284-0,2168) Da	0,0595 (0,0492-0,0854) Db
MTA+CHX 1% (G5)	0,0465 (0,0438-0,0557) Ea	0,0466 (0,0432-0,0490) Ea
DMEM (controle negativo) (G6)	0,2720 (0,2516-0,3213) Ab	0,3443 (0,2730-0,3742) Aa

* Valores seguidos por letras maiúsculas iguais nas colunas e letras minúsculas iguais nas linhas não apresentam diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

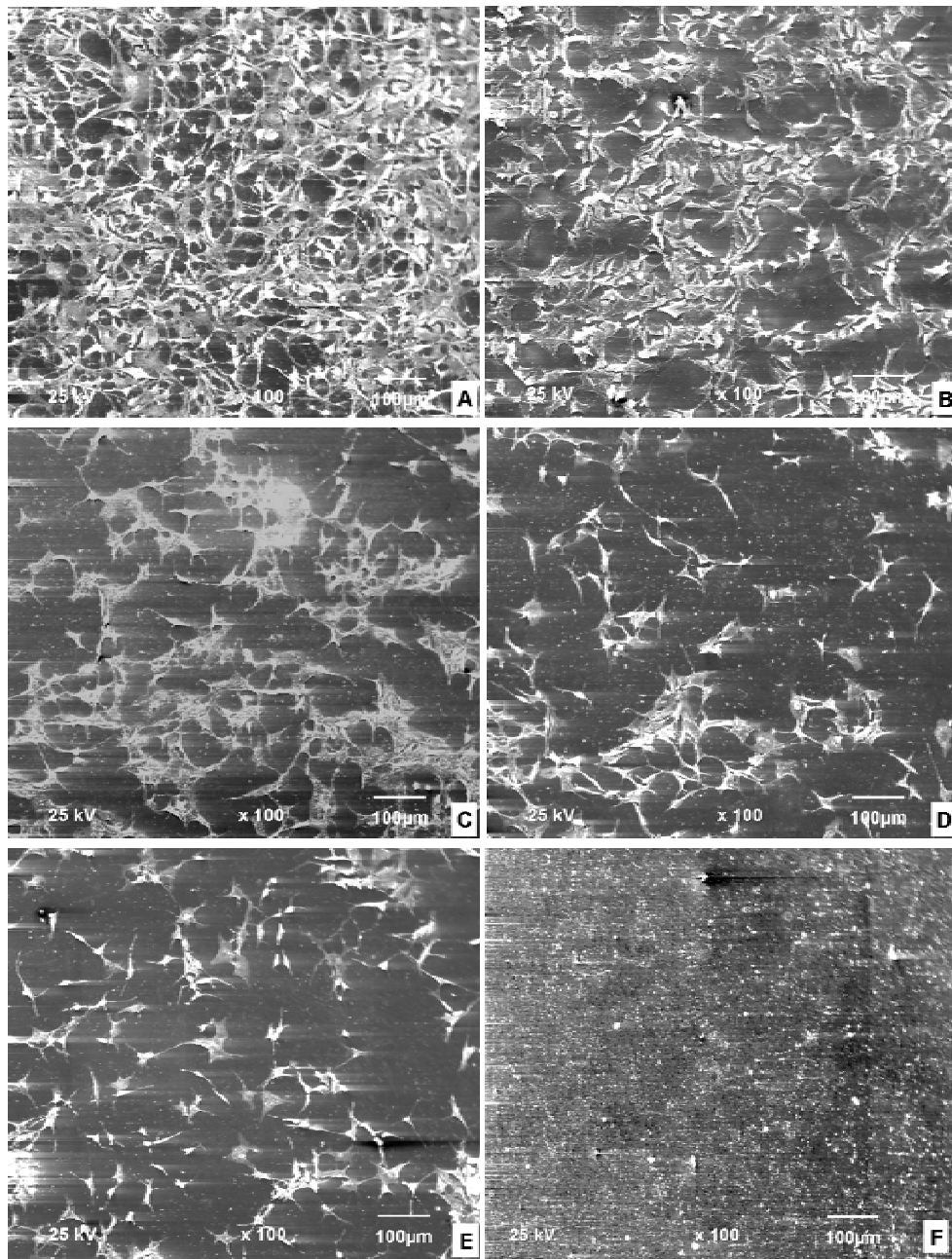


Figura 3 – Fotomicrografia em MEV de fibroblastos do ligamento periodontal de camundongos (MPDL) aderidos à lamínula de vidro após contato com os extratos de 24 horas do MTA associado à água destilada ou à CHX em diferentes concentrações, assim como, o grupo controle. **A.** Grupo G6 (controle negativo): DMEM, **B.** Grupo G1: MTA + água destilada, **C.** Grupo G2: MTA + CHX 0,06%, **D.** Grupo G3: MTA + CHX 0,12%, **E.** Grupo G4: MTA + CHX 0,2%, **F.** Grupo G5: MTA + CHX 1% (aumento original x 100, barra = 100 μm).

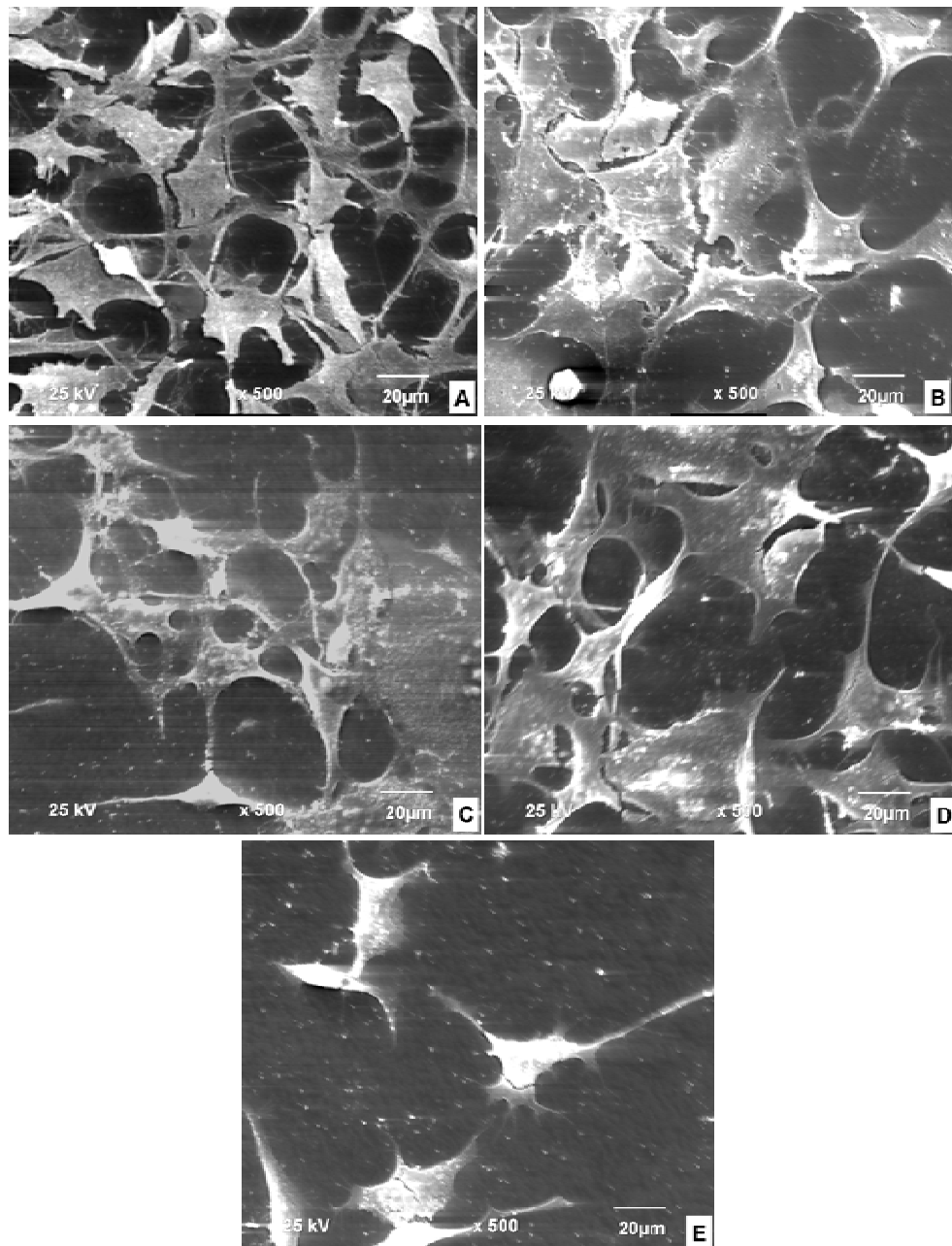


Figura 4 - Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura de fibroblastos do ligamento periodontal de camundongos (MPDL) aderidos à lamínula de vidro após contato com os extratos de 24 horas do MTA associado à água destilada ou à CHX em diferentes concentrações, assim como, o grupo controle. **A.** Grupo G6 (controle negativo): DMEM, **B.** Grupo G1: MTA + água destilada, **C.** Grupo G2: MTA + CHX 0,06%, **D.** Grupo G3: MTA + CHX 0,12%, **E.** Grupo G4: MTA + CHX 0,2 (aumento original x 500, barra = 20 µm).

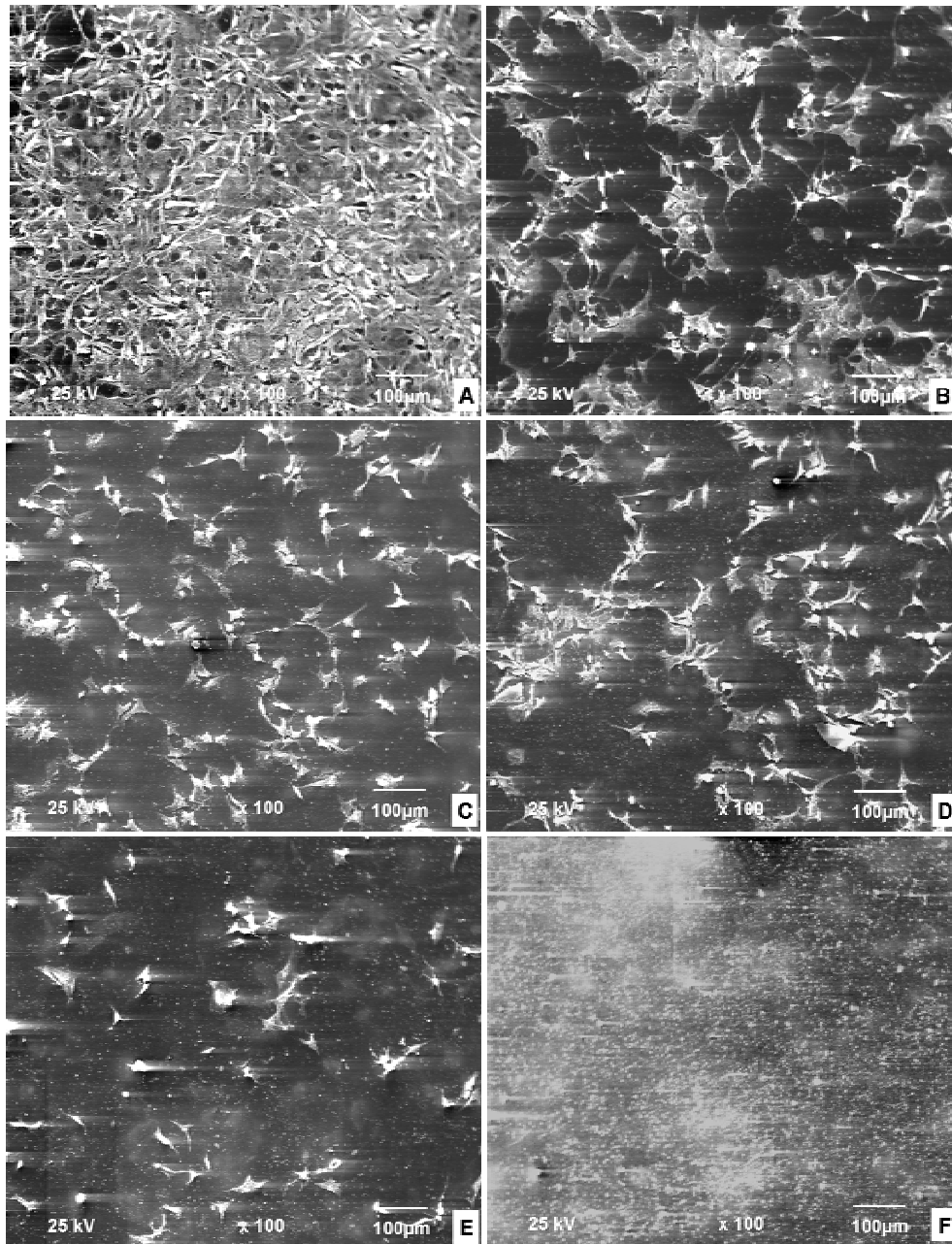


Figura 5 – Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura de fibroblastos do ligamento periodontal de camundongos (MPDL) aderidos à lamínula de vidro após contato com os extratos de 7 dias do MTA associado à água destilada ou à CHX em diferentes concentrações, assim como, o grupo controle. **A.** Grupo G6 (controle negativo): DMEM, **B.** Grupo G1: MTA + água destilada, **C.** Grupo G2: MTA + CHX 0,06%, **D.** Grupo G3: MTA + CHX 0,12%, **E.** Grupo G4: MTA + CHX 0,2%, **F.** Grupo G5: MTA + CHX 1% (aumento original x 100, barra = 100 µm).

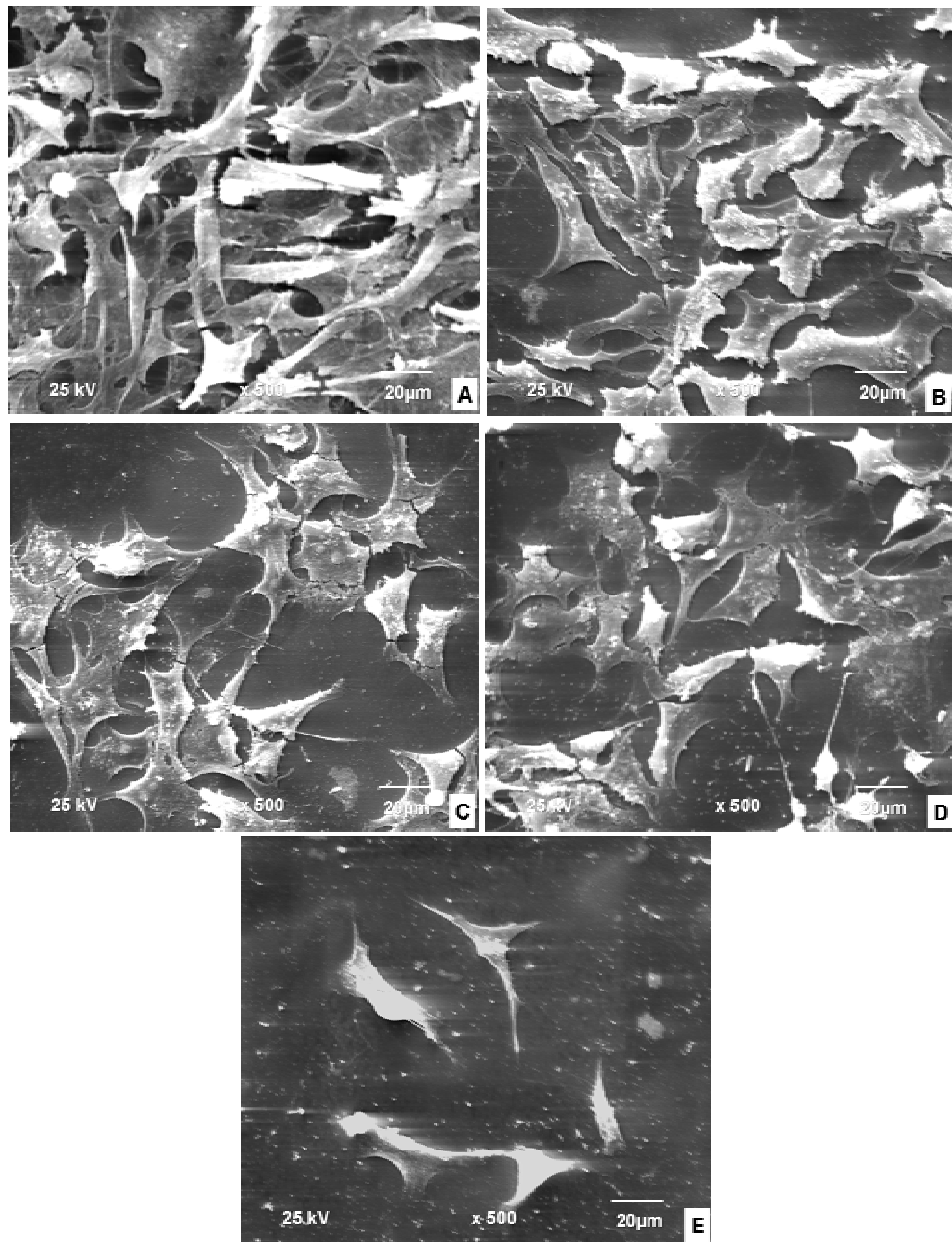


Figura 6 – Fotomicrografia em microscopia eletrônica de varredura de fibroblastos do ligamento periodontal de camundongos (MPDL) aderidos à lamínula de vidro após contato com os extratos de 7 dias do MTA associado à água destilada ou à CHX em diferentes concentrações, assim como, o grupo controle. **A.** Grupo G6 (controle negativo): DMEM, **B.** Grupo G1: MTA + água destilada, **C.** Grupo G2: MTA + CHX 0,06%, **D.** Grupo G3: MTA + CHX 0,12%, **E.** Grupo G4: MTA + CHX 0,2% (aumento original x 500, barra = 20 µm).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por ser biocompatível^{3,38,51,52,56} e apresentar características como bom selamento^{4,47} e adaptação às paredes dentinárias⁵⁰, o MTA tem sido indicado para obturação retrógrada, para selamento e reparo de perfurações radiculares e de furca, entre outros procedimentos clínicos amplamente empregados na odontologia^{2,14,35,36,47,51,53,55}.

Entretanto, como este material não apresenta adequada atividade antibacteriana sobre algumas espécies presentes em infecções endodônticas^{12,32,49}, tem sido proposta a sua associação com a CHX, um agente antimicrobiano de amplo espectro^{10,11,13,26,34}. Todavia, a atividade antibacteriana da solução de CHX depende da sua concentração e da susceptibilidade das espécies bacterianas, podendo atuar como bacteriostático ou bactericida¹³. Além disso, a CHX, inclusive em baixas concentrações, atua como inibidor de metaloproteinases (MMPs)¹⁹. Estas enzimas proteolíticas são liberadas na presença de inflamação pulpar e lesões periapicais, atuando na degradação da matriz orgânica extracelular^{5,30,54}. Portanto, a inibição dessas enzimas tem importante papel no processo de reparo após tratamento endodôntico.

Por outro lado, de acordo com a concentração utilizada, a CHX pode ser tóxica às células e tecidos^{7,8,15,20,23,31,37,40}. Neste estudo, diferentes concentrações dessa substância foram adicionadas ao MTA com a proposta de obter um medicamento com boas propriedades antibacterianas e mínima citotoxicidade. Contudo, a associação entre dois materiais nem sempre resulta na somatória dos efeitos benéficos, e muitas vezes, estes podem ter a sua ação inibida. Tal fato pôde

ser verificado na presente pesquisa, onde observou-se para a associação MTA/CHX, ausência do aumento da atividade antibacteriana sobre três das quatro espécies estudadas.

A adição de CHX ao MTA em concentrações elevadas, tal como 2%, interfere na presa do material²⁸, bem como nas propriedades mecânicas, tornando-o quebradiço e com baixa resistência à compressão²⁵. Com a incorporação de CHX 1% ao MTA, observou-se neste estudo, que os corpos de prova apresentaram-se mais quebradiços, sofrendo desintegração parcial ou total quando permaneceram imersos em meio de cultura para a obtenção dos extratos. Essa característica limita a concentração da CHX que pode ser incorporada ao MTA.

Como a associação MTA/CHX tem sido recentemente sugerida^{22,25,28,39,41,42}, a interação desses materiais ainda não está elucidada. Entretanto, considerando que a permanência do MTA em contato com os tecidos resulta na formação de hidróxido de cálcio^{24,25}, sugere-se que a interação do MTA com a CHX seja semelhante àquela que ocorre entre hidróxido de cálcio e clorexidina. Na presença de hidróxido de cálcio, as moléculas de CHX, na sua maioria, não sofrem dissociação devido ao pH alcalino deste material, resultando em redução da sua ação antimicrobiana⁵⁷.

Somando-se esta informação, ao fato de que a CHX pode ser tóxica às células e aos tecidos vivos de acordo com a concentração utilizada^{7,8,15,20,23,31,37,40}, e considerando que, no presente estudo, os resultados obtidos com a associação MTA/CHX não foram satisfatórios tanto em relação à melhora na atividade antibacteriana quanto aos efeitos citotóxicos sobre fibroblastos (MPDL), outros

estudos devem ser realizados com intuito de melhor investigar a interação e os mecanismos de ação dessa e de outras associações, visando obter um material com compatibilidade biológica aceitável e máxima propriedade antibacteriana.

CONCLUSÃO

1. A adição de CHX ao MTA, independente da concentração utilizada, não resultou em melhora da atividade antibacteriana sobre os microrganismos estudados, com exceção do *S. aureus*.
2. Quanto maior a concentração de CHX incorporada ao MTA, mais tóxico foi o cimento para os fibroblastos do ligamento periodontal de camundongos (MDPL).
3. Independente da concentração da solução de CHX utilizada na preparação do cimento MTA, o material apresentou maior citotoxicidade no maior tempo de obtenção do extrato.

REFERÊNCIAS*

1. Apaydin ES, Shabahang S, Torabinejad M. Hard-tissue healing after application of fresh or set MTA as root-end-filling material. *J Endod.* 2003; 30: 21-4.
2. Arens DE, Torabinejad M. Repair of furcal perforations with mineral trioxide aggregate: two case reports. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996; 82: 84-8.
3. Baek SH, Plenk H, Jr., Kim S. Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, SuperEBA, and MTA as root-end filling materials. *J Endod.* 2005; 31: 444-9.
4. Bates CF, Carnes DL, del Rio CE. Longitudinal sealing ability of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J Endod.* 1996; 22: 575-8.
5. Belmar MJ, Pabst C, Martinez B, Hernandez M. Gelatinolytic activity in gingival crevicular fluid from teeth with periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105: 801-6.
6. Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *J Dent Res.* 2004; 83: 408-13.
7. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 92: 446-50.
8. Cline NV, Layman DL. The effects of chlorhexidine on the attachment and growth of cultured human periodontal cells. *J Periodontol.* 1992; 63: 598-602.

* De acordo com o Estilo Vancouver. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

9. Costa CAS, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. *Am J Dent.* 2001; 14: 25-30.
10. D'Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. *J Endod.* 1999; 25: 351-3.
11. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res.* 1977; 85: 255-65.
12. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J* 1995; 6: 85-90.
13. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pecora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J.* 2000; 11: 3-9.
14. Estrela CR, Estrela C, Reis C, Bammann LL, Pecora JD. Control of microorganisms in vitro by endodontic irrigants. *Braz Dent J.* 2003; 14: 187-92.
15. Faraco IM, Jr., Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol.* 2001; 17: 163-6.
16. Faria G, Celes MR, De Rossi A, Silva LA, Silva JS, Rossi MA. Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured L929 fibroblasts. *J Endod.* 2007; 33: 715-22.
17. Frank AL, Glick DH, Patterson SS, Weine FS. Long-term evaluation of surgically placed amalgam fillings. *J Endod.* 1992; 18: 391-8.

18. Gartner AH, Dorn SO. Advances in endodontic surgery. *Dent Clin North Am.* 1992; 36: 357-78.
19. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6: 437-9.
20. Goldschmidt TP, Cogen R, Taubman S. Cytopathologic effects of chlorhexidine on human cells. *J Periodontol.* 1977; 48: 212-5.
21. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J.* 2003; 36: 75-85.
22. Hernandez EP, Botero TM, Mantellini MG, McDonald NJ, Nor JE. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages in vitro. *Int Endod J.* 2005; 38: 137-43.
23. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro.* 2001; 15: 271-6.
24. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod.* 1999; 25: 161-6.
25. Holt DM, Watts JD, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. The antimicrobial effect against *Enterococcus faecalis* and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chlorhexidine liquid. *J Endod.* 2007; 33: 844-7.
26. Hugo WB, Longworth AR. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol.* 1966; 18: 569-78.

27. Jafari-Moghaddame S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. *J Endodon.* 2005; 31: 387-91.
28. Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I. The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod.* 2006; 32: 569-72.
29. 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.
30. Leonardi R, Caltabiano R, Loreto C. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed in periapical lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J.* 2005; 38: 297-301.
31. Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol.* 1999; 70: 1443-8.
32. Miyagak DC, de Carvalho EM, Robazza CR, Chavasco JK, Levorato GL. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of endodontic sealers. *Braz Oral Res.* 2006; 20: 303-6.
33. Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res.* 1981; 89: 475-84.
34. Oncag O, Hosgor M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J.* 2003; 36: 423-32.
35. Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995; 79: 756-63.

36. Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *J Am Dent Assoc.* 1996; 127: 1491-4.
37. Pucher JJ, Daniel JC. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 1993; 63: 526-32.
38. Regan JD, Gutmann JL, Witherspoon DE. Comparison of Diaket and MTA when used as root-end filling materials to support regeneration of the periradicular tissues. *Int Endod J.* 2002; 35: 840-7.
39. Shahi S, Rahimi S, Yavari HR, Shakouie S, Nezafati S, Abdolrahimi M. Sealing ability of white and gray mineral trioxide aggregate mixed with distilled water and 0.12% chlorhexidine gluconate when used as root-end filling materials. *J Endod.* 2007; 33: 1429-32.
40. de Souza LB, de Aquino SG, de Souza PP, Hebling J, Costa CAS. Cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine. *Am J Dent.* 2007; 20: 400-4.
41. Stowe TJ, Sedgley CM, Stowe B, Fenno JC. The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2004; 30: 429-31.
42. Sumer M, Muglali M, Bodrumlu E, Guvenc T. Reactions of connective tissue to amalgam, intermediate restorative material, mineral trioxide aggregate, and mineral trioxide aggregate mixed with chlorhexidine. *J Endod.* 2006; 32: 1094-6.
43. 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 Oral Radiol Endod.* 1998; 85: 86-93.
44. Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2006; 39: 415-22.

45. 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.
46. Thomson TS, Berry JE, Somerman MJ, Kirkwood KL. Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2003; 29: 407-12.
47. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod.* 1993; 19: 591-5.
48. 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.
49. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. *J Endod.* 1995; 21: 403-6.
50. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod.* 1995; 21: 295-9.
51. Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *J Endod.* 1995; 21: 603-8.
52. Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry 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.
53. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 1999; 25: 197-205.
54. Wahlgren J, Salo T, Teronen O, Luoto H, Sorsa T, Tjaderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates. *Int Endod J.* 2002; 35: 897-904.

55. Witherspoon DE, Ham K. One-visit apexification: technique for inducing root-end barrier formation in apical closures. *Pract Proced Aesthet Dent*. 2001; 13: 455-60.
56. Yildirim T, Gencoglu N, Firat I, Perk C, Guzel O. Histologic study of furcation perforations treated with MTA or Super EBA in dogs' teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005; 100: 120-4.
57. Zerella JA, Fouad AF, Spangberg LS. Effectiveness of a calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate mixture as disinfectant during retreatment of failed endodontic cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100: 756-61.

ANEXOS

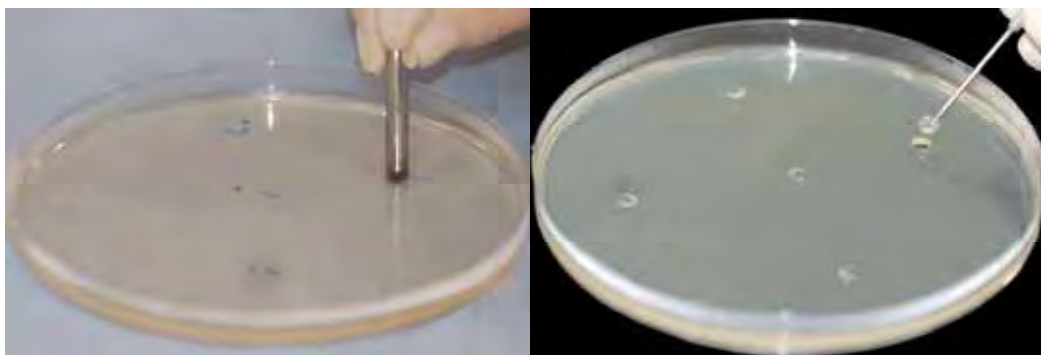


Figura 1 - Placa de Petri contendo ágar Müller-Hinton acrescido do inóculo bacteriano e confecção dos poços para preenchimento com os materiais estudados.

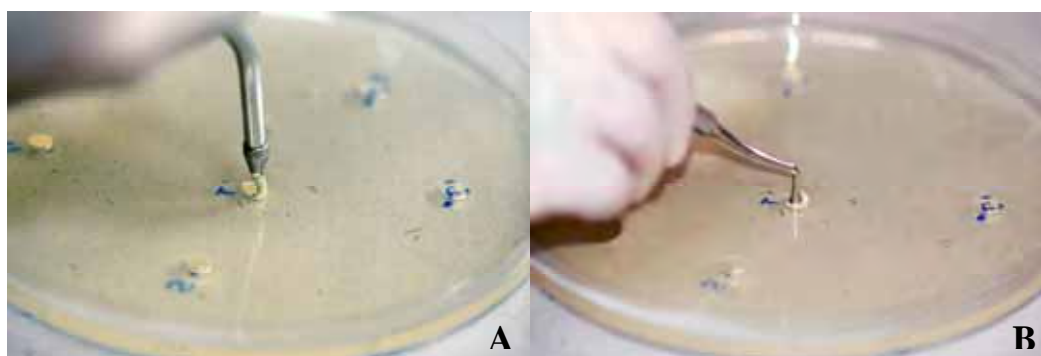


Figura 2 - Inserção dos materiais nos poços confeccionados nas placas de Petri com auxílio de insersor (A) e condensador de amálgama (B) previamente esterilizados.

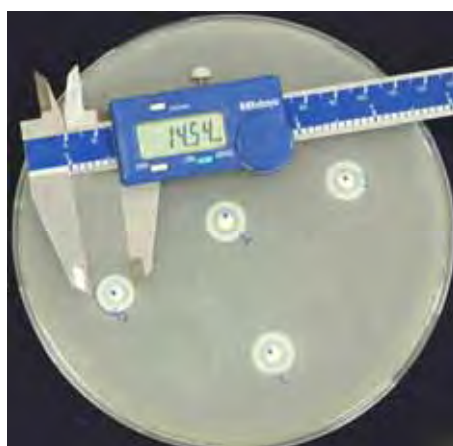


Figura 3 – Medição dos halos de inibição com auxílio de paquímetro digital.

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 30 de julho de 2008.

INDRI NOGUEIRA