

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MTA E CIMENTO PORTLAND EM CEPAS DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF MTA AND PORTLAND CEMENT IN *ENTEROCOCCUS FAECALIS* AND *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Stéphanie Yone Antonio Abinader da Silva

Graduanda em Odontologia pela FO-UFF

Licínio Esmeraldo da Silva

Professor Adjunto do Departamento de Estatística - UFF

Maria Theresa Alves da Cunha Kalil

Professora Auxiliar do Departamento FFE/PUNF - UFF

Bruno Leal

Pós-Doutor do Departamento GCM/EGB - UFF

Luiz Cezar Correa

Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biologia das Interações EGB - UFF

Dilvani Santos

Professor Associado do Departamento GCM/EGB - UFF

Marcos da Veiga Kalil

Professor Adjunto do Departamento de Odontoclínica - UFF

Helena Carla Castro Almeida

Professor Associado do Departamento GCM/EGB - UFF

Endereço para correspondência: rua Cel. Moreira Cesar 229, 1809, Icaraí, Niterói, RJ, CEP 24.230.052

E-mail odontok@gmail.com

Recebido em: 06/06/2011

Aceito em: 09/08/2011

RESUMO

A determinação do perfil antimicrobiano de materiais endodônticos é de grande importância para determinação dos procedimentos odontológicos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil antimicrobiano dos cimentos endodônticos MTA, que vem constituindo-se um excelente selador e preenchedor especialmente nas perfurações radiculares e de furca e que até então possuíam um prognóstico bastante desfavorável, e o Cimento Portland, que vem sendo utilizado com eficácia no tratamento da polpa dentária, frente a cepas de *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias comumente resistentes aos antimicrobianos atuais e encontradas na maioria dos casos de lesões endodônticas refratárias. No teste antimicrobiano, os cimentos foram diluídos em água destilada e aplicados em discos de papel de filtro estéreis que foram colocados em placas de Petri inoculadas com as bactérias. O teste estatístico utilizado (ANOVA) permitiu inferir que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os controles positivos e os cimentos avaliados. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que nenhum dos cimentos testados, MTA ou Portland, apresentam atividade antimicrobiana sobre as cepas testadas exigindo, portanto um protocolo de desinfecção prévio ao se utilizar esses materiais na prática odontológica.

Palavras-chave: MTA; cimento Portland; atividade antimicrobiana; *Enterococcus faecalis*; *Pseudomonas aeruginosa*; endodontia; microbiologia.

ABSTRACT

The determination of the antimicrobial profile of endodontic materials are of great importance for the dental procedures establishment. The aim of this study was to evaluate the profile of antimicrobial sealers MTA, which is an excellent sealer and filler especially in the root and furcation perforations, which had unfavorable prognosis and Portland cement, which has been used effectively in dental pulp treatment against *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* that are the resistant bacteria present in most cases of refractory endodontic infections. In the antimicrobial test, the material was diluted in distilled water and applied on filter paper discs that were placed in Petri dishes inoculated with bacteria. The ANOVA statistical test allowed us to infer that there was a statistically significant difference with $p < 0.05$ when comparing positive controls, and cements. After the

experiments, we can conclude that none of the sealers, MTA or Portland, showed antimicrobial activity against the strains tested, thus requiring a protocol for disinfection prior to using these materials

Keywords: MTA, Portland cement, antimicrobial activity, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, endodontics, microbiology;

INTRODUÇÃO

A *Enterococcus faecalis* é uma bactéria gram positiva, anaeróbia facultativa, normalmente encontrada no trato gastrointestinal dos seres humanos e outros mamíferos; podendo causar infecções com risco de vida nos seres humanos. Essa bactéria é encontrada principalmente em ambiente hospitalar e tem sido freqüentemente encontrada em 30 a 90% dos casos de infecções secundárias. Esta cepa afeta comumente a raiz do dente afetado por lesões periapicais persistentes. A contaminação bacteriana dos canais radiculares inevitavelmente resulta em interação entre a *E. faecalis* e os tecidos periapicais durante o processo de dinâmica de inflamação periapical, afetando negativamente uma nova formação óssea periapical, e consequentemente, a cura dessas lesões (VALADARES; SOARES; NOGUEIRA et al, 2011, KARYGIANNI; WIEDMANN-AL-AHMAD; FINKENZELLER et al, 2011; OMS, 2011).

A *Pseudomonas aeruginosa* é outra bactéria de importância que age como um patógeno oportunista. Essa bactéria gram-negativa, aeróbia e baciliforme explora eventuais fraquezas do organismo para estabelecer um quadro de infecção. Essa característica, associada à sua resistência natural a um grande número de antibióticos e antisépticos a torna uma importante causa de infecções hospitalares e diversas infecções endodônticas refratárias (GARCEZ; NUNEZ; LAGE-MARQUES et al, 2007; SIQUEIRA; RÔÇAS, 2009; OMS, 2011).

O cimento MTA é composto por vários óxidos minerais e tem se mostrado superior a outros materiais usados na Endodontia em sua capacidade seladora frente a corantes, bactérias e endotoxinas. Esse cimento é biocompatível e induz a formação de osso e cimento, por isso, vários autores tem avaliado o uso de MTA para vedamento de perfurações em estudo laboratoriais e clínico. Além disso, o cimento MTA é radiopaco, apresenta boa resistência à compressão, baixa solubilidade e adesividade à dentina.

Semelhante ao MTA, o Cimento Portland, cimento que já era largamente utilizado na construção civil, veio revolucionar o tratamento endodôntico, substituindo o formocresol, que apresenta alta toxicidade, e o MTA, que é de alto custo. O Cimento Portland é constituído por silicatos de cálcio, alumínio e ferro, contendo fases de clínquer e de outros compostos, sendo biologicamente compatível com os tecidos dentários. Bactericida por natureza, uma vez que possui um pH altamente alcalino e em alguns estudos, esse produto mostrou-se eficaz no tratamento da polpa dentária em crianças com dentes de leite, com vantagens terapêuticas e financeiras.

Diversos autores têm relatado a importância de se identificar o perfil antimicrobiano desses cimentos, principalmente MTA, sobre as cepas de *E. faecalis* e *P. aeruginosa*. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar esses cimentos quanto a atividade antimicrobiana frente a essas cepas, realizando ainda uma revisão de literatura sobre o assunto.

REVISÃO LITERATURA

Em diversas situações, bactérias entéricas anaeróbias facultativas podem ser identificadas nos canais radiculares, especialmente em amostras coletadas durante a terapia, em casos de resposta insuficiente ou retratamento de canais obturados com insucesso. A espécie mais comum de é o *Enterococcus faecalis* que em grande parte das vezes é o único isolado (TORABINEJAD; WATON, 2010).

A habilidade de formação de biofilme pelo gênero *Enterococcus* permite a colonização de superfícies inertes e biológicas, protege contra agentes antimicrobianos e ação de fagócitos, mediando adesão e invasão de células do hospedeiro. Além da formação de biofilme, os fatores de virulência mais citados são a produção de substância de agregação, adesinas de superfície, ácido lipopoliteico, produção extracelular de superóxido, enzima lítica gelatinase e hialuronidase. Assim, a hidrólise de colágeno pela gelatinase produzida por *E. faecalis* pode ter papel importante na patogênese e na propagação de inflamações periapicais. O *E. faecalis* também produz a enzima hialuronidase que atua no ácido hialurônico encontrado no tecido conjuntivo humano, facilitando a disseminação bacteriana. (PARADELLA; KOGA-ITO; JORGE, 2007).

Autores como Costa, Alves e Oliveira et al. (2010), investigaram a presença de *Enterococcus faecalis* em 25 dentes submetidos à retratamento endodôntico e em 10 casos com infecção endodôntica primária, ambos associados à periodontite apical assintomática. Dos 25 casos

de retratamento, 18 apresentaram *E. faecalis*. Nos 10 casos de infecção primária, dois apresentaram o microrganismo. O percentual de ocorrência de *E. faecalis* foi mais elevado nos dentes submetidos à retratamento (72%) que nos casos de infecção endodôntica primária (20%).

Da mesma forma, a relação de formação de biofilmes em Expressões Genéticas gelE em cepas de *Enterococcus faecalis* retiradas de canais radiculares em pacientes submetidos a retratamento endodôntico foi estudado por Wang, Dong e Zheng et al (2011). Este trabalho concluiu que a Formação de biofilmes em *E. faecalis* foi facilitada mesmo nos casos sem fistula. E que nos casos de dentes com imagem radiolúcida periapical as cepas com biofilme-positivos, a expressão de gelE foi maior. Confirmando que as cepas de *Enterococcus faecalis* são, de fato, frequentemente encontradas no interior dos canais nos casos de insucessos nos tratamentos endodônticos com e sem lesão periapical.

Em outro trabalho, Reiss-Araújo, Gominho e Albuquerque et al (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de 2 materiais seladores temporários (Vitro Fill e Vitro Molar) ante a cultura mista de *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*, como também perante cada uma das bactérias isoladamente. Nenhum material exerceu atividade antimicrobiana perante a cultura pura de *Enterococcus faecalis* e a cultura mista em teste.

Alguns cimentos obturadores dos canais radiculares também foram avaliados quanto a sua ação antimicrobiana por Piva, Faraco Junior e Feldens et al (2009). Avaliaram *in vitro* a ação antimicrobiana de materiais obturadores de canais radiculares de dentes decíduos por meio da difusão em ágar. Os materiais testados foram: pasta Guedes-Pinto, pasta CTZ, OZE, Calen®, L&C® e MTA. Foi utilizada uma mistura microbiana composta por: *Staphylococcus aureus* - ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* - ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853, *Bacillus subtilis* - ATCC 6633, *Candida albicans* - ATCC 10231. A leitura dos halos de inibição (mm) foi realizada após 48h/37°C e os resultados submetidos aos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. As pastas CTZ e Guedes-Pinto apresentaram halos de inibição estatisticamente maiores que os demais materiais ($p < 0,001$). A L&C® e o MTA não apresentaram halos de inibição.

Da mesma forma, Asgary e Kamrani (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana do MTA, hidróxido de cálcio, novo cimento endodôntico (NEC) e cimento Portland em diversas espécies de microorganismos, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus au-*

reus e *Escherichia coli*. Os maiores halos de inibição foram observados ao redor do hidróxido de cálcio e NEC.

Já Zarrabi, Javidi e Naderinasab et al (2008), avaliaram a atividade antimicrobiana do MTA, NEC e cimento Portland em diferentes concentrações sobre *Escherichia coli*, *Cândida*, *Actinomyces viscosus*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*. Todos os materiais testados mostraram atividade antimicrobiana contra as espécies testadas, exceto sobre *Enterococcus faecalis*. Os halos de inibição ao redor do NEC foram maiores do que os halos ao redor do MTA e cimento Portland.

Em 2006, Filho, Tanomaru e Barros et al. estudaram a atividade antimicrobiana do Sealer 26, Sealapex com óxido de zinco, Óxido de zinco e eugenol, cimento Portland e MTA sobre *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cândida albicans* e *Enterococcus faecalis*. Os estudos concluíram que os materiais testados tiveram atividade antimicrobiana sobre as cepas dos microorganismos testados. Cimento Portland e MTA apresentaram os menores halos de inibição.

Já Ribeiro, Kuteken e Junior et al (2006) avaliaram e compararam o efeito antimicrobiano do MTA Dentsply, MTA Angelus, hidróxido de cálcio e cimento Portland sobre quatro cepas bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*, e *Enterococcus faecalis*. O MTA Dentsply, MTA Angelus e Cimento Portland inibiram o crescimento da *P. aeruginosa*. O hidróxido de cálcio foi efetivo contra *P. aeruginosa* e *B. fragilis*. Sob atmosfera de anaerobiose, condição que pode impedir a formação de espécies reativas do oxigênio, nenhum dos materiais foi capaz de exercer efeitos sobre *E. faecalis* e *E. coli*.

DISCUSSÃO

A análise da atividade antimicrobiana das diversas substâncias de uso em endodontia se faz necessária para a perfeita indicação no tratamento de canais radiculares. Portanto, a avaliação dos aspectos antimicrobianos do MTA deve ser objeto de análise. (SIQUEIRA JUNIOR; LOPES; MAGALHÃES et al, 2007).

São muito comuns estudos com as cepas utilizadas pelo presente estudo o que demonstra que ensaios de sensibilidade antimicrobiana utilizando-se essas cepas, são uma prática corriqueira e imperiosa para a avaliação de diferentes materiais de uso em Endodontia (RIBEIRO; KUTEKEN; JUNIOR et al, 2006; PARADELLA; KOGA-ITO; JORGE, 2007; ASGARY; KAMRANI, 2008; PIVA; FARACO JU-

NIOR; FELDENS et al, 2009; COSTA; ALVES; OLIVEIRA et al, 2010; WANG; DONG; ZBENG et al, 2011)

O MTA possui propriedades físicas, químicas e biológicas que lhe conferem biocompatibilidade, capacidade indutora da osteogênese, da cementogênese, e efeito antimicrobiano. As evidências científicas acerca do uso deste aglomerado sustentam o seu emprego no reparo das perfurações endodônticas. Daí a necessidade de se conhecer a sua capacidade antimicrobiana (MACIEL; ANDRADE; KALIL et al., 2009; TORABINEJAD; WATON, 2010).

Os resultados alcançados pelo presente experimento assemelham-se aos resultados alcançados pelos autores citados na revisão de literatura, demonstrando estarem em consonância com os mesmos. Ademais a metodologia aplicada no presente experimento demonstra a sua eficácia quando comparada com os experimentos daqueles estudos. (RIBEIRO; KUTEKEN; JUNIOR et al, 2006; REISS-ARAÚJO; GOMINHO; ALBUQUERQUE et al, 2006; FILHO; TANOMARU; BARROS et al, 2006; ZARRABI; JAVIDI; NADERINASAB et al, 2009; PARADELLA; KOGA-ITO; JORGE, 2007)

Já no que se refere a aplicabilidade clínica de tais resultados, pode-se inferir que para a utilização dessas substâncias em áreas potencialmente contaminadas. Deve-se proceder a devida descontaminação ou desinfecção para que seja possível a utilização com sucesso dessas substâncias. Já que elas não apresentaram atividade antimicrobiana.

Dessa forma, deve preceder ao o tratamento cirúrgico de lesões endodônticas refratárias com obturação retrógrada uma perfeita descontaminação das áreas que receberão estas substâncias.

MATERIAL E MÉTODOS

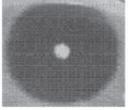
Foram utilizados para a pesquisa 0,75g de MTA e 0,75g de cimento Portland, cada um diluído em 3ml de água destilada. Os discos de papel Whatman nº1 (5mm de diâmetro) foram embebidos com a solução-estoque dos materiais recém-preparado e colocados sobre o meio de Mueller Hinton (sólido), em placa previamente inoculada com as bactérias *P. aeruginosa* ou *E. faecalis*, para realização do teste de sensibilidade como descrito por Leal, Afonso e Rodrigues et al (2008).

As culturas contendo os discos foram incubadas a uma temperatura de 37° por um período de 24h. A sensibilidade foi determinada após esse período através da medida do diâmetro do halo (zona) de inibição em mm em torno do disco de papel em ensaios realizados em triplicatas. Antimicrobianos utilizados atualmente no tratamento de infecções por essas bactérias (oxacilina, vancomicina e ciprofloxacina) foram usados neste trabalho como controles positivos.

RESULTADOS

Os resultados dos testes de sensibilidade utilizando as cepas de *E. faecalis* e *P. aeruginosa* mostraram que os cimentos não apresentam um perfil antimicrobiano frente as cepas testadas quando comparadas aos controles positivos constituídos de antimicrobianos utilizados atualmente no tratamento de infecções (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1 - Avaliação do perfil antimicrobiano do MTA e do cimento Portland contra cepas de *E. faecalis* e *P. aeruginosa* com representação dos halos de inibição.

BACTÉRIA	MTA	Portland	CTRL (+)*	CTRL (-)**
<i>Enterococcus faecalis</i>	 0 mm	 0 mm	 16 mm	 0 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 35408	 0 mm	 0 mm	 23 mm	 0 mm

* Ctrl (+) = Oxacilina (5mg/ml) que apresenta ação antimicrobiana contra cepas Gram-positivas (Halo =16 mm)

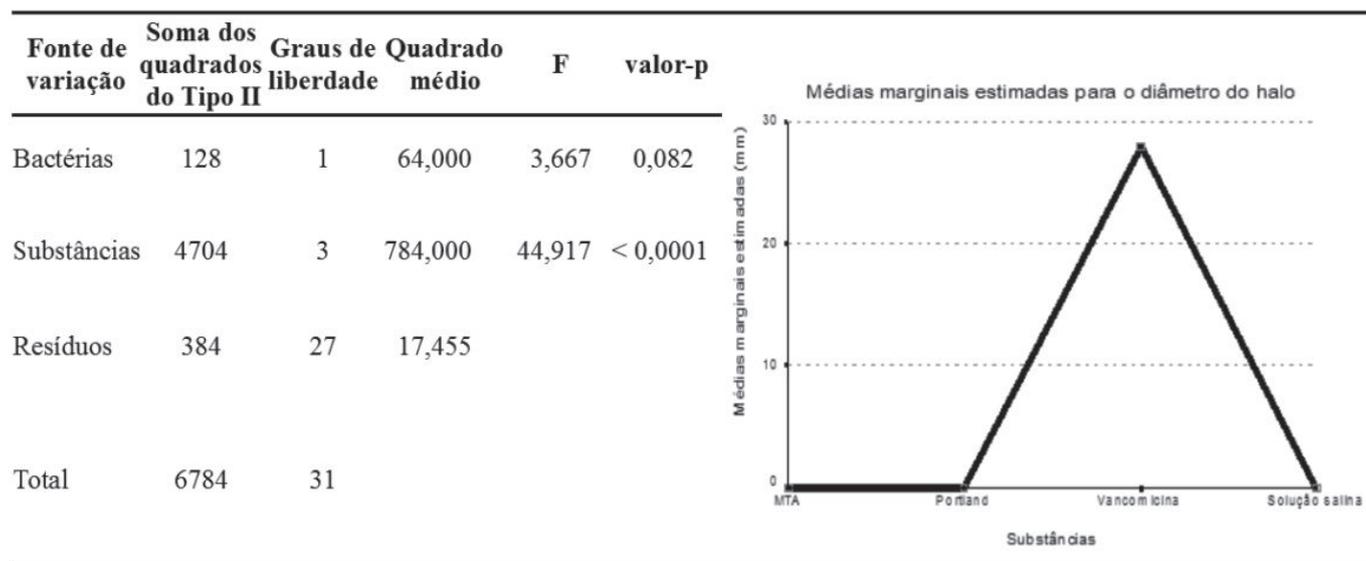
* Ctrl (+) = Ciprofloxacina (5mg/ml) que apresenta ação antimicrobiana contra cepas Gram-negativas (Halo = 23 mm)

** Ctrl (-) = Solução salina que não apresenta ação antimicrobiana (Halo = 0 mm)

A avaliação estatística dos resultados pelo método ANOVA confirmou a diferença estatística significativa

entre os controles positivos e os cimentos avaliados, confirmando a ausência de atividade.

Figura 1 - Análise estatística dos resultados (esquerda) e representação gráfica dos valores encontrados relacionados a variável dependente (Diâmetro do halo) (direita).



Tratamento estatístico

A análise da variância (ANOVA) permitiu identificar diferença estatisticamente significativa entre as substâncias, concluindo-se que as substâncias MTA, Portland e solução salina comportam-se de modo semelhante e cada uma delas com um comportamento diferenciado da Vancomicina, a qual apresenta capacidade de eliminação bacteriana como descrito na literatura com o valor de $p < 0,05$ (LUIZ; COSTA; NADANOVSKY et al, 2005)

CONCLUSÃO

Através da metodologia empregada no presente teste, pode-se afirmar que as substâncias MTA e o Cimento Portland comportam-se de modo semelhante, concluindo-se que ambos não apresentam ação antimicrobiana sobre as cepas de bactérias testadas.

REFERÊNCIAS

1. Asgary S, Kamrani FA. Antibacterial effects of five different root canal sealing materials. *Journal of Oral Science*. 2008; 50(4): 469-474.
2. Costa MPFC, Alves JAB, Oliveira AHA, et al. Enterococcus faecalis em retratamentos endodônticos e em casos de infecção primária associados à periodontite apical assintomática. *Rev Flum Odontol*. 2010 jan./jun.; 16(33).
3. Filho MT, Tanomaru JMG, Barros DB, et al. In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers MTA-based cements and Portland cement. *Journal of Oral Science*. 2007; 49(1): 41-45.
4. Garcez AS, Nunez SC, Lage-Marques JL, et al. Photonic real-time monitoring of bacterial reduction in root canals by genetically engineered bacteria after chemomechanical endodontic therapy. *Braz Dent J*. 2007; 18(3): 202-7.
5. Karygianni L, Wiedmann-Al-Ahmad M, Finkenzeller G, et al. Enterococcus faecalis affects the proliferation and differentiation of ovine osteoblast-like cells. *Clin Oral Investig*. 2011 May; 17.
6. Leal B, Afonso IF, Rodrigues CR, et al. Antibacterial profile against drug-resistant Staphylococcus epidermidis clinical strain and structure-activity relationship studies of 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine and thieno[2,3-b]pyridine derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2008 Sep 1; 16(17): 8196-204.
7. Luiz RR, Costa JLC, Nadanovsky. *Epidemiologia e Bioestatística na Pesquisa Odontológica*. [Rio de Janeiro]: Atheneu; 2005.

8. Maciel ACC, Andrade AO, Kalil MV, et al. MTA no reparo das perfurações endodônticas: relato de casos. *Rev Flum Odontol.* 2009 jan./jun.; 15(31).
9. OMS. Organização Mundial da Saúde. Antimicrobial resistance bibliography. [acesso 25 maio 2011]. Disponível em: <<http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/antimicrobial-p2.pdf>>.
10. Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Enterococcus faecalis: considerações clínicas e microbiológicas. *Rev Odontol Unesp.* 2007; 36(2): 163-168.
11. Piva F, Faraco Junior IM, Feldens CAF, et al. Ação antimicrobiana de materiais empregados na obturação dos canais de dentes decíduos por meio da difusão em ágar: estudo *in vitro*. *Pesq. Brás. Odontoped. Clin. Integr.* 2009 jan./abr.; 9(1): 13-17.
12. Reiss-Araújo C, Gominho L, Albuquerque DS, et al. Análise da ação antimicrobiana de materiais seladores provisórios coronários utilizados em endodontia. *RSBO.* 2006. 3(2): 7-14.
13. Ribeiro CS, Kuteken AK, Junior RH, et al. Comparative Evaluation of antimicrobial action of MTA, Calcium hydroxide and Portland Cement. *J Appl Oral Sci.* 2006; 14(5): 330-3.
14. Ribeiro CS, Andrade AO, Scelza P, et al. Atividade antimicrobiana e citotóxica do MTA – Uma revisão de literatura. *Rev Flum Odontol.* 2009 jan./jun.; 15(31).
15. Siqueira Junior JF, Lopes HP, Magalhães FAC, et al. Eficácia antimicrobiana de diferentes medicamentos intracanaís sobre Enterococcus Fecalis, Cândida albicans e Actinomyces radicialis. *RBO.* 2007; 64(1-3).
16. Siqueira JFJ, Rôças IN. Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. *J Oral Microbiol.* 2009 Aug. 10; 1.
17. Torabinejad M, Waton, RE. Endodontia – Princípios e prática. 4ª ed. [Rio de Janeiro]: Elsevier; 2010.
18. Valadares MA, Soares JA, Nogueira CC, et al. The efficacy of a cervical barrier in preventing microleakage of Enterococcus faecalis in endodontically treated teeth. *Gen Dent.* 2011 Jan./Feb.; 59(1): 32-7.
19. Wang L, Dong M, Zbeng J, et al. Relationship of Biofilm Formation and gelE gene expression in Enterococcus faecalis recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. *JOE.* 2011; 37(5): 631-49.
20. Zarrabi, MH, Javidi M, Naderinasab M, et al. Comparative evaluation of antimicrobial activity of three cements: new endodontic cement (NEC), mineral trioxide aggregate (MTA) and Portland. *Journal of Oral Science.* 2009; 51(3): 437-442.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio técnico de Juliana Novais, ao Hospital Universitário Antônio Pedro - UFF pelas cepas e a UFF-PROPPi, CAPES, CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro e pelas bolsas dos autores.