

INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME PELO MTA FILLAPEX COM E SEM A ADIÇÃO DE ALUMINATO DE CÁLCIO E ALUMINATO DE CÁLCIO E PRATA

LUIZA HELENA SILVA DE ALMEIDA¹; RENATA DORNELLES MORGENTAL²;
SÉRGIO CAVA³, PATRÍCIA RODRIGUES³, RAFAEL RATTO DE MORAES¹;
FERNANDA GERALDO PAPPEN¹

¹Universidade Federal de Pelotas-Faculdade de Odontologia- luizahelenadentista@hotmail.com,
ferpappen@yahoo.com.br, moraesrr@gmail.com

²Universidade de Santa Maria-remorgental@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, Engenharia de Materiais, CDTec, Pelotas, RS, Brasil -
ati_jg@hotmail.com; sergiocava@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Diversos fatores podem causar o fracasso do tratamento endodôntico. Infecções secundárias podem ocorrer quando os microorganismos penetram no sistema de canais radiculares durante ou após a conclusão do tratamento, levando ao crescimento de novos biofilmes bacterianos (SIQUEIRA et al., 2000). Para evitar estes crescimentos a atividade de inibição do crescimento bacteriano bem como a ação antimicrobiana dos cimentos endodônticos desempenham um papel importante no resultado do tratamento.

Dentre os cimentos endodônticos que buscam aliar as propriedades física-química e biológicas está o MTA-Fillapex (FLPX) (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brazil). A principal composição do FLPX é MTA e resina salicilato. Este material apresenta boas propriedades físico-químicas (VITTI et al. 2013), elevada solubilidade, elevada liberação de íons cálcio e pH alcalino (BORGES et al., 2012, SILVA et al., 2013; MORGENTAL et al., 2011). No entanto, nos estudos de biocompatibilidade este material tem demonstrado efeitos irritantes ao tecido subcutâneo (TAVARES et al., 2013) e tecido ósseo (ASSMAN et al., 2015) de animais além de limitada atividade antibacteriana (MORGENTAL et al., 2011).

A adição de aluminato de cálcio e aluminato de cálcio com prata ao MTA-Fillapex pode melhorar a atividade antibacteriana deste material, aumentando a reação química de hidratação, a qual se baseia na dissolução de aluminato de cálcio e subsequente precipitação de componentes de hidratos. Este fato resulta em prolongada liberação de íons cálcio e prata, o que pode levar a um aumento no pH e ao aumento da capacidade de reparo induzida pelo cimento (OLIVEIRA et al., 2010). Além disso, a liberação de prata no meio induz um estresse oxidativo nas células bacterianas, levando a lise destas células (EL BADAWY et al., 2011).

Diante disso, com intuito de melhorar as propriedades biológicas do FLPX, foi adicionado a este cimento, aluminato de cálcio e aluminato de cálcio com prata em diferentes concentrações. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades de inibição do biofilme do FLPX com e sem a adição de aluminato de cálcio e aluminato de cálcio e prata.

2. METODOLOGIA

Os materiais testados estão descritos na tabela 1. Os cimentos foram colocados em moldes de plástico com medidas padronizadas, e armazenados por

24 horas em estufa, até presa final. Cada disco foi esterilizado em luz ultravioleta. Discos de hidroxiapatita foram utilizados como controle positivo.

Para o crescimento do biofilme de microcosmos, coletou-se placa bacteriana de um adulto saudável e esta foi colocada em suspensão em meio BHI (Brain Heart Infusion). Os discos foram incubados em placas de 24 poços com 1,8 ml de BHI esterilizado e 0,2 ml da suspensão de placa bacteriana. A troca do meio de cultura foi realizada semanalmente durante o período experimental. Os espécimes foram mantidos em anaerobiose, a 37°C, durante os tempos experimentais de 3, 15 e 30 dias. Após estes períodos cada espécime foi analisado em microscópio Confocal (Olympus Fluoview 1000, Olympus Corporation, Tokyo, Japão). Foram examinadas 05 áreas de cada espécime. Os biofilmes foram corados com o corante BacLight LIVE?DEAD KIT L7012 (bacterial viability kit) para avaliação quantitativa, onde as bactérias viáveis são coradas com fluorescência verde, e as bactérias com membrana rompida são coradas com fluorescência vermelha (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). A biomassa total do biofilme, além da proporção de células bacterianas vivas foi quantificada. Todos os testes foram realizados em quintuplicata.

As imagens foram analisadas utilizando software BioImage_L (<http://bioimage.com>) para o biovolume total e viabilidade celular (células verdes). Os dados foram analisados através dos testes Anova e Tukey, com o nível de significância de 0.05.

Tabela 1. Materiais avaliados

Material
MTA Fillapex (Angelus, Londrina, PR, Brazil)
AH Plus (Dentsply De Trey GmbH, Konstanz, Germany)
EndoSequence BC Sealer (Innovative BioCeramix Inc., Vancouver, Canada)
MTA Fillapex + 10% CaAl ₃
MTA Fillapex + 10% (CaAl + 1%Ag)
MTA Fillapex + 10% (CaAl + 5%Ag)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O volume de biofilme total para cada cimento avaliado está descrito na tabela 2. A análise dos substratos revelou que a formação de biofilme ocorreu em todos os grupos e em todos os intervalos de tempo avaliados. Após três dias de incubação, o maior biovolume total (μm^3), foi observado no grupo controle, com a diferença significativa de crescimento de biofilmes ($p < 0,05$). Aos três dias, o menor crescimento foi observado com os cimentos EndoSequence, e FLPX com aluminato de cálcio e prata.

Aos quinze dias o FLPX com 10% CaAl₃ apresentou os menores valores de crescimento de biofilme sendo diferente estatisticamente dos demais cimentos testados ($p < 0,05$). Ao final dos tempos experimentais, aos 30 dias de incubação, menor biovolume foi observado para o cimento EndoSequence, seguido do FLPX com CaAl₃. A adição de aluminato de cálcio ao FLPX conferiu uma redução do crescimento de biofilme ao cimento, e além disso, no decorrer do período experimental esta ação foi sendo prolongada, conferindo ação antimicrobiana ao material testado.

O Endosequence aos 30 dias foi o material que apresentou o menor crescimento de biofilme sendo estatisticamente diferente dos demais cimentos no mesmo tempo experimental ($p < 0,05$). Situação similar foi encontrada no estudo de WANG et al. (2014), em que o Endosequence foi o material com melhor desempenho para a inibição de crescimento de biofilmes.

Table 2: Média e desvio padrão do biovolume total (μm^3) em 3, 15 e 30 dias ($n = 5$ por grupo).

Material	Média \pm Desvio Padrão		
	3 dias	15 dias	30 dias
EndoSequence	12210.92 \pm 3611.07 ^{Aab}	114396.59 \pm 15539.97 ^{Bd}	7727.80 \pm 1290.54 ^{Aa}
AHPlus	23789.96 \pm 6582.34 ^{Abc}	32166.77 \pm 4719.32 ^{Bb}	96242.04 \pm 11692.20 ^{Cc}
Fillapex	32995.55 \pm 8468.92 ^{Ac}	65915.64 \pm 51382.90 ^{Bcd}	81923.68 \pm 83925.23 ^{ABb}
Fillapex + 10%C3A	16550.76 \pm 14329.32 ^{Abc}	12303.12 \pm 9289.51 ^{Aa}	42971.40 \pm 57529.95 ^{Bb}
Fillapex + 10% (C3A + Ag5%)	8988.28 \pm 4722.58 ^{Aab}	52734.48 \pm 75844.80 ^{Bbc}	131246.52 \pm 71721.14 ^{Cc}
Fillapex + 10% (C3A + Ag1%)	4482.68 \pm 6083.03 ^{Aa}	159914.70 \pm 164811.81 ^{Bd}	216390.60 \pm 1.08 ^{Cc}
HÁ	53228.24 \pm 29862.51 ^{Ad}	106596.87 \pm 52691.22 ^{Bd}	232911.18 \pm 5.35 ^{Bc}

Diferenças entre letras maiúsculas indicam diferença estatisticamente significativa na mesma linha ($P < 0,05$).

Diferenças entre letras minúsculas indicam diferença estatisticamente significativa na mesma coluna ($P < 0,05$).

A literatura tem provado que quando os microorganismos são organizados em biofilmes, eles são mais resistentes do que a forma plânticas correspondente do mesmo microrganismo (MOHAMMADI E ABBOTT, 2009; SVENSATER E BERGENHOLTZ, 2004). Assim a utilização de microscopia confocal (CLSM) de biofilmes através da coloração de viabilidade celular torna possível a coleta de informações relevantes e detalhadas sobre os biofilmes, como o volume de biofilme por área após o crescimento em diferentes condições e as proporções de microorganismos vivos e mortos (SHEN et al., 2009). A informação quantitativa é uma das vantagens claras do método utilizado CLSM.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que, a adição de aluminato de cálcio melhorou as propriedades de inibição do crescimento do biofilme pelo cimento MTA Fillapex.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SIQUEIRA, J.F.; J.R.; ROCAS, I.N.; FAVIERI, A.; ABAD, E.C.; CASTRO, A.J.; GAHYVA, S.M. Bacterial leakage in coronally unsealed root canals obturated with 3 different techniques. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v.90, n.5, p. 647-650, 2000.

VITTI, R.P.; PRATI, C.; SINHORETI, M.A.; ZANCHI, C.H.; SILVA, M.G.; OGLIARI, F.A.; PIVA, E.; GANDOLFI, M.G. Chemical-physical properties of experimental

root canal sealers based on butyl ethylene glycol disalicylate and MTA. **Dental Materials**, v. 29, n.12, p.1287-1294, 2013.

BORGES, R.P.; SOUSA-NETO, M.D.; VERSIANI, M.A.; RACHED-JÚNIOR, F.A.; DE-DEUS, G.; MIRANDA, C.E.; PÉCORÁ, J.D. Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. **International Endodontic Journal**, v.45, n.5, p.419-428, 2012.

SILVA, E.J.; ROSA, T.P.; HERRERA, D.R.; JACINTO, R.C.; GOMES, B.P.; ZAIA, A.A. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. **Journal of Endodontics**, v.39, n.2, p.274-277, 2013.

MORGENTAL, R.D.; VIER-PELISSER, F.V.; OLIVEIRA, S.D.; ANTUNES, F.C.; COGO, D.M.; KOPPER, P.M. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. **International Endodontic Journal**, v.44, n.12, p.1128-1133, 2011.

TAVARES, C.O.; BÖTTCHER, D.E.; ASSMANN, E.; KOPPER, P.M.; DE FIGUEIREDO, J.A.; GRECCA, F.S.; SCARPARO, R.K. Tissue reactions to a new mineral trioxide aggregate-containing endodontic sealer. **Journal of Endodontics**, v.39, n.5, p.653-657, 2013.

ASSMANN, E.; BÖTTCHER, D.E.; HOPPE, C.B.; GRECCA, F.S.; KOPPER, P.M. Evaluation of bone tissue response to a sealer containing mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v.41, n.1, p.62-66, 2015.

OLIVEIRA, I.R.; PANDOLFELLI, V.C.; JACOBOVITZ, M. Chemical, physical and mechanical properties of a novel calcium aluminate endodontic cement. **International Endodontic Journal**, v.43, n.12, p.1069-1076, 2010.

EL BADAWY, A.M.; SILVA, R.G.; MORRIS, B.; SCHECKEL, K.G.; SUIDAN, M.T.; TOLAYMAT, T.M. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. **Environmental science & technology letters**, v.45, n. 1, p.283-287, 2011.

WANG, Z.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Dentin extends the antibacterial effect of endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms. **Journal of Endodontics**, v.40, n.4, p.505-508, 2014.

MOHAMMADI, Z.; ABBOTT, P.V. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. **International Endodontic Journal**, v.42, n.4, p.288-302, 2009.

SVENSATER, G.; BERGENHOLTZ, G. 2004. Biofilms in endodontic infections. **Endodontic topics**, v.9, p.27-36, 2004

SHEN, Y.; QIAN, W.; CHUNG, C.; OLSEN, I.; HAAPASALO, M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: A three-dimensional quantitative analysis. **Journal of Endodontics**, v. 35, n.7, p.981-985, 2009.