

## pH, COMPORTAMENTO DE LIBERAÇÃO DE ÍONS E EFEITO ANTIMICROBIANO DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS EXPERIMENTAIS CONTENDO METACRILATOS METÁLICOS

MONIKA LAMAS FERREIRA<sup>1</sup>; VICTORIA BURMANN DA SILVA GUIMARÃES<sup>2</sup>;  
TIAGO COLLARES<sup>3</sup>; ANDERSON SCHWINGEL RIBEIRO<sup>4</sup>; FERNANDA GERALDO  
PAPPEN<sup>5</sup>; RAFAEL GUERRA LUND<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia UFPel - monikalamasf@gmail.com

<sup>2</sup> Aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia UFPel - victoryabs@gmail.com

<sup>3</sup> Professor do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia UFPel - collares.t@gmail.com

<sup>4</sup> Professor do Programa de Pós-Graduação em Química UFPel - andersonsch@hotmail.com

<sup>5</sup> Professora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia UFPel - ferpappen@yahoo.com.br

<sup>6</sup> Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPel - rafael.lund@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Na terapia endodôntica, a obturação é responsável pelo selamento do sistema de canais radiculares, proporcionando o preenchimento de irregularidades anatômicas e o sepultamento de bactérias que tenham sobrevivido às demais etapas do tratamento (ØRSTAVIK, 2005). Até o momento, no entanto, não foi desenvolvido um material único que preencha todos as características desejáveis: capacidade bactericida, adequado preenchimento e aderência às paredes dos canais radiculares, biocompatibilidade, suficiente tempo de trabalho e tempo de presa curto, além de não causar alteração na coloração das estruturas dentárias.

Dentre os cimentos obturadores de canais radiculares mais utilizados na prática clínica, podemos citar os cimentos à base de resina, cujo uso é amplamente consolidado; o cimento à base de salicilato, contendo agregado trióxido mineral (MTA), que tem apresentado atividade antimicrobiana; e os cimentos biocerâmicos, descritos como cimentos injetáveis, pré-misturados e prontos para uso (ZHANG et al., 2009; GARRIDO et al., 2010; MORGENTAL et al., 2011). Assim, a contínua investigação de novas formulações com o intuito de se obter um cimento que reúna todas as propriedades adequadas ainda se faz necessária.

Os acrilatos e metacrilatos são compostos produzidos em grandes quantidades e com aplicações em diversos tipos de indústrias, produtos medicinais e odontológicos (ROSSATO et al., 2017; COCCO et al., 2018). Os metacrilatos apresentam diferentes composições, incluindo o metacrilato de cálcio e o metacrilato de dibutilestanho (LIMA et al., 2018). Estudos *in vivo* (ATTRAMADAL, SVATUN, 1984) e *in vitro* (SVATUN, ATTRAMADAL, 1978) mostram que soluções contendo estanho e cálcio possuem propriedades antimicrobianas e têm papel importante no reparo periapical (REZENDE et al., 2016).

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e a liberação de íons de cimentos endodônticos experimentais contendo metacrilatos metálicos ( $Ca^{2+}$  e  $Sn^{4+}$ ).

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Delineamento dos grupos do cimento endodôntico experimental

Os cimentos experimentais foram formulados em duas pastas, base e catalisadora. A partir do cimento endodôntico experimental (EXP), foram adicionadas

às composições da pasta base, metacrilatos metálicos de cálcio (ECs) e dibutilestanho (ETs) na concentração de 2%. Em todos os ensaios, se utilizará, como controle comercial, o padrão-ouro, um cimento à base de resina epóxica, comercialmente chamado AHPlus. Os espécimes dos grupos experimentais foram manipulados, misturando-se as duas pastas em iguais proporções e fotoativando-as por 40 segundos. Os espécimes do grupo controle foram manipulados conforme especificações do fabricante.

### 2.3.2 Avaliação do pH, Liberação de Cálcio e Estanho

Os cimentos foram preparados e inseridos em tubos de polietileno (1mm x 10mm) com apenas uma extremidade aberta com o auxílio de um instrumento Lentulo tamanho #25. Três espécimes de cada material foram preparados. Cada espécime foi imediatamente imerso em um Falcon contendo 10 mL de água deionizada e incubado a 37°C durante todo o estudo. Antes da imersão dos espécimes, foram verificadas as concentrações de pH e íons da água deionizada (pH=6,01). As leituras de pH e íons foram realizadas novamente após 3h, 24h, 7, 15 e 30 dias de armazenamento. As leituras de pH do eludato foram realizadas com um pHmetro calibrado.

A liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Sn}^{4+}$  nas amostras foram medidas por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-ondas (MIP OES), modelo MP AES 4200, da Agilent Technologies, equipado com o sistema de nebulização convencional para introdução da amostra no plasma para determinação de  $\text{Ca}^{2+}$ , e nebulização multimodal (MSIS) com geração química de vapor, utilizando  $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$ , para a determinação de  $\text{Sn}^{4+}$ .

### 2.3.4 Ensaio de inibição da Formação de Biofilme

Para o ensaio antimicrobiano, os cimentos foram manipulados e colocados em moldes de plástico com 10 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura e os espécimes armazenados à temperatura ambiente durante 48h (GUERREIRO-TANOMARU et al., 2013). Foram utilizados discos de hidroxiapatita (HA) no grupo controle positivo (SHEN et al., 2009).

Os discos foram incubados em suspensões em meio de cultivo BHI armazenado em placas de cultura de 24 poços, sob condições anaeróbicas, a 37°C. Cada poço continha 1,5 mL de caldo BHI estéril e 0,5 mL de inóculo, em que os espécimes foram mantidos submersos. Após os períodos de crescimento de 7 e 15 dias, foram analisados 30 discos ( $n=3$  por grupo e por período de incubação) para biofilme e proporção de bactérias vivas e mortas por coloração de viabilidade e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM).

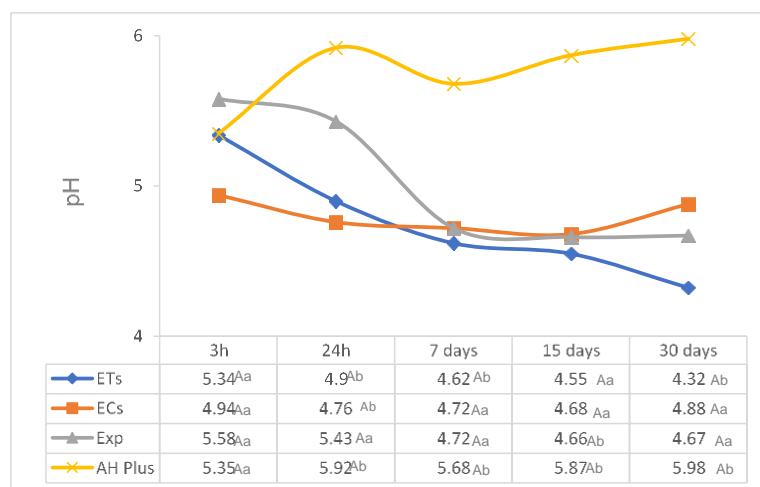
A análise da viabilidade do biofilme foi realizada utilizando a técnica SYTO 9 - iodeto de propídio. Primeiramente, as amostras foram limpas com 2 mL de solução salina e, em seguida, 0,25  $\mu\text{L}$  de corante foi adicionado sobre o biofilme. Foi utilizado um CLSM para visualizar as amostras (ORDINOLA-ZAPATA et al., 2012). Em seguida, foram obtidas cinco pilhas confocais de diferentes áreas aleatórias de cada amostra com lente de 10x e com formato de 512x512 pixels. Todas as imagens foram analisadas utilizando o software LAS X 3D Analysis para o biovolume total ( $\mu\text{m}^3$ ), o número total de células vivas (verde) e o percentual de células vivas.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software Sigma Plot 12.0. Os dados foram analisados para verificar a distribuição normal e a homogeneidade da variância. ANOVA de duas vias seguida por um teste complementar de Tukey foram empregados para avaliar cada uma das variáveis dependentes. O nível de significância para todos os testes foi 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Avaliação do pH, Liberação de Cálcio e Estanho

Os valores de pH estão demonstrados na Figura 1.



**Figura 1 pH do eludato dos selantes endodonticos durante o período de armazenamento de 30 dias.**

(ANOVA de uma via / Post hoc de Tukey. pH médio em cada período de avaliação para cada material, 3 horas após a manipulação. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) entre diferentes períodos de avaliação para o mesmo material. Letras minúsculas diferentes indicam estatisticamente diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre diferentes materiais no mesmo período de avaliação.

A liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  diminuiu ao longo do tempo em todos os cimentos testados, sendo o grupo ECs que apresentou a maior liberação dentro do período experimental e o ETs não apresentou níveis detectáveis no método convencional. O grupo ETs apresentou a maior liberação de  $\text{Sn}^{4+}$  no período de 24h a 30 dias, enquanto o AHPlus e o ECs não apresentaram valores detectáveis.

#### 3.2 Ensaio de inibição da Formação de Biofilme

Análise de biovolume total revelou formação de biofilme em todos os grupos. Em 7 dias, AHPlus e EXP apresentaram volume de biofilme estatisticamente menor que o grupo controle (HA) ( $P < 0,05$ ). Após 15 dias, ETs apresentou volume estatisticamente menor que os outros grupos ( $p < 0,05$ ). Para o teste de biovolume de bactérias viáveis, todos os grupos apresentaram valores similares em 7 dias. Após 15 dias, os grupos experimentais (ECs, ETs e EXP) apresentaram volumes estatisticamente menores em relação ao AHPlus e HA (Tabela 1).

**Tabela 1.** Mediana (percentil 25-75) para o biovolume total e viável dos biofilmes ( $n = 5$ )

Cimento Endodontico	Biovolume total de biofilme, $\mu\text{m}^3 \times 10^4$		Biovolume de biofilme viável, $\mu\text{m}^3 \times 10^4$	
	7 dias	15 dias	7 dias	15 dias
ECs	36,65 (5,88 – 274,90) <sup>A,ab</sup>	14,39 (2,02 – 29,32) <sup>A,bc</sup>	17,01 (2,10 – 63,56) <sup>A,a</sup>	0,41 (0,08 – 1,79) <sup>B,a</sup>
ETs	32,26 (20,62 – 185,65) <sup>A,ab</sup>	319,45 (0,35 – 395,34) <sup>A,a</sup>	13,72 (9,57 – 45,83) <sup>A,a</sup>	0,08 (0,00 – 0,44) <sup>B,a</sup>
EXP	15,25 (4,99 – 58,79) <sup>A,a</sup>	226,92 (31,73 – 307,27) <sup>B,bc</sup>	4,91 (1,45 – 18,58) <sup>A,a</sup>	1,07 (0,01 – 5,13) <sup>B,a</sup>
AH Plus	4,34 (0,91 – 147,93) <sup>A,a</sup>	51,74 (20,64 – 130,69) <sup>A,ab</sup>	0,73 (0,14 – 78,04) <sup>A,a</sup>	31,01 (12,60 – 53,63) <sup>A,b</sup>
HA (controle)	246,91 (73,29 – 421,83) <sup>A,b</sup>	462,57 (135,05 – 510,04) <sup>A,c</sup>	69,95 (11,87 – 96,86) <sup>A,a</sup>	38,65 (14,01 – 91,48) <sup>A,b</sup>

\* Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os tempos experimentais dentro dos grupos. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos no mesmo tempo experimental.

A adição de metacrilato metálicos de cálcio e estanho na concentração de 2% melhorou as propriedades antimicrobianas do cimento experimental, assim como aumentou a liberação de íons de  $Ca^{2+}$  e  $Sn^{4+}$ , em níveis maiores que o AHPlus e o cimento experimental. No entanto, neste estudo, não foi possível mensurar as concentrações dos dois íons pelo mesmo método de determinação química.

Até o momento, existem poucas publicações a respeito das propriedades e aplicações de cimentos endodônticos modificados com metacrilatos metálicos, mas seu uso mostrou-se promissor. No entanto, mais estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* são necessários para avaliar a performance destes materiais experimentais para uso em terapia endodôntica.

#### 4. CONCLUSÕES

As propriedades antimicrobianas do cimento experimental contendo metacrilatos metálicos foram melhoradas, e a liberação de  $Ca^{2+}$  e  $Sn^{4+}$  foi aumentada, sugerindo um potencial efeito positivo para a resposta biológica.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATTRAMADAL, A.; SVATUN, B. *In vivo* antibacterial effect of tin on the oral microflora. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v.92, n.2, p.161-164, 1984.
- COCCO, A.R. et al. New adhesive system based in metals cross-linking methacrylate. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 77, p. 519-526, 2018.
- GARRIDO, A.D. et al. Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on Copafieramultijuga oil-resin. **International Endodontic Journal**, v.43, n.4, p.283–291, 2010.
- GUERREIRO-TANOMARU, J.M. et al. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 3, p. 346-350, 2013.
- LIMA, G.S. et al. **Antimicrobial polymeric compositions containing metal containing methacrylates**. U.S. Patent Application n. 15/656,731, 25 jan. 2018.
- MORGENTAL, R.D. et al. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. **International Endodontic Journal**, v.44, n.12, p.1128-1133, 2011.
- ORDINOLA-ZAPATA, R. et al. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. **International Endodontic Journal**, v. 45, n. 2, p. 162-168, 2012.
- ØRSTAVIK, D. Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. **Endodontic Topics**, v.12, n.1, p.25-38, 2005.
- REZENDE, G.C. et al. Antimicrobial action of calcium hydroxide-based endodontic sealers after setting, against *E. faecalis* biofilm. **Brazilian Oral Research**, v. 30, n. 1, 2016.
- ROSSATO, T.C.A. et al. Experimental sealers containing metal methacrylates: physical and biological properties. **Journal of endodontics**, v. 43, n. 10, p. 1725-1729, 2017.
- SVATUN, B; ATTRAMADAL, A. The effect of stannous fluoride on human plaque acidogenicity *in situ* (Stephan curve). **Acta Odontologica Scandinavica**, v.36, n.4, p. 211-218, 1978.
- ZHANG, W.; LI, Z.; PENG, B. Assessment of a new root canal sealer's apical sealing ability. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.107, n.6, p.79-82, 2009.