

ESTUDO *IN VITRO* DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DE CIMENTOS PROTETORES DO COMPLEXO DENTINA-POLPA SOBRE OS MICROORGANISMOS *S. MUTANS* E *S. SANGUIS*

Telmo da Silva AFONSO*
Gelson Luis ADABO**
Antonio Carlos PIZZOLITTO***

- **RESUMO:** Os autores utilizaram o teste de difusão em ágar, para verificar a ação antimicrobiana dos cimentos protetores do complexo dentina-polpa, sobre o *S. mutans* e *S. sanguis*. Nas condições do trabalho, dos oito cimentos estudados *in vitro*, Vitrebond, Hydro C, XR-Ionomer e Life Improved mostraram ter ação antimicrobiana, enquanto Ketac-Bond, Renew Light, Shofu Lining Cement e Timeline não revelaram ação antimicrobiana.
- **PALAVRAS-CHAVE:** Cimentos de hidróxido de cálcio, microbiologia; cimentos de ionômeros vítreos, microbiologia.

Introdução

A dentina e a polpa devem ser consideradas uma unidade e devemos compreender que, quando se corta a dentina, também se estão cortando os prolongamentos celulares da polpa.

Na prevenção ao risco de um dano do complexo dentina-polpa, graças às influências mecânica, física e química do material restaurador, a proteção tem um destaque importante no procedimento restaurador.

A falta de adaptação entre os materiais restauradores e a parede das cavidades constitui um dos problemas biológicos que o clínico enfrenta na prática diária. Essa

* Pós-Graduando - Nível de Mestrado em Dentística Restauradora - Faculdade de Odontologia - UNESP - 14801-903 - Araraquara - SP.

** Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese - Faculdade de Odontologia - UNESP - 14801-903 - Araraquara - SP.

*** Departamento de Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - 14801-202 - Araraquara - SP.

desadaptação pode dar lugar à penetração de fluídos bucais, microorganismos, íons e moléculas nessa fenda existente entre eles.

Os microorganismos podem atingir os túbulos dentinários e multiplicarem-se, implicando sensibilidade dentinária, descoloração do dente, inflamação pulpar e cárie recorrente.³

A ação antimicrobiana dos materiais protetores do complexo dentina-polpa é de suma importância e nos parece imprescindível à prevenção da saúde dental, por promover maior longevidade ao dente restaurado, considerando-se o papel que os microorganismos exercem sobre os tecidos do dente.

À vista do exposto, o objetivo deste estudo é verificar *in vitro* a ação antimicrobiana de cimentos protetores do complexo dentina-polpa sobre os microorganismos *S. mutans* e *S. sanguis*.

Material e método

Os cimentos protetores do complexo dentina-polpa utilizados encontram-se agrupados na Tabela 1.

Tabela 1 – Cimentos utilizados

Marca comercial	Sigla	Tipo do componente	Fabricante
Hydro C	HY	Hidróxido de cálcio	Dentsply
Ketac-Bond	KE	Ionômero de vidro	ESPE
Life Improved	LI	Hidróxido de cálcio	Kerr
Renew Light	RE	Hidróxido de cálcio	S. S. White
Shofu Lining Cement	SH	Ionômero de vidro	Shofu
Timeline	TI	Resina	Dentsply
Vitrebond	VI	Ionômero de vidro	3M Dent. Prod. Div.
XR-Ionomer	XR	Ionômero de vidro	Kerr

Para a obtenção das amostras dos cimentos, utilizou-se uma placa de Teflon de 2 mm de espessura, fazendo-se perfurações de 3 mm de diâmetro, produzindo-se, assim, matrizes que deram origem às amostras dos cimentos.

Os cimentos foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante e as amostras foram retiradas de sua matriz com auxílio de um condensador para amálgama, tipo Ward n.2 (Duflex).

Após a obtenção das amostras dos cimentos, estes foram imediatamente submetidos ao teste de sensibilidade.

Foram utilizadas culturas puras de *S. mutans* e *S. sanguis*, isoladas no Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

Foi empregado ágar Mueller-Hinton (DIFCO), adicionado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro em placa de Petri, colocando-se 20 ml de meio por placa. O pH do meio de cultura foi ajustado para um pH 7,3.

Em câmara asséptica, as placas foram semeadas com uma zaragatoa (Ceconete-CECON), saturada na suspensão padronizada em meio "Tryptcase Soy Broth" (BBL), com uma turvação correspondente ao padrão proposto por Kirby-Bauer, inóculo de aproximadamente 108 bactérias/ml de *S. mutans* e *S. sanguis*, respectivamente. A zaragatoa foi passada por toda a superfície do meio de cultura, de maneira uniforme, sucessivamente, em três direções.

Após a retirada das amostras de cimento das matrizes, estas eram imediatamente distribuídas na superfície do meio de cultura semeado e seco, com auxílio de pinça clínica (Duflex) estéril, pressionando-as para fixá-las, tomando-se a precaução de guardar pelo menos 3 cm entre elas, e 1,5 cm da borda da placa, para evitar halos de inibição justapostos. Cada placa recebia cinco amostras de cimento, todas de uma marca comercial, e foram feitas 10 repetições para cada cimento.

As placas foram incubadas pelo método da jarra com vela (microaerofilia) a 35°C-37°C, por 48 horas.

Foram feitas leituras após 48 horas de incubação, usando-se paquímetro (Maub) de 0,1 mm de precisão para a determinação do diâmetro (em mm) do halo de inibição. Foi realizada a medida tomando-se dois pontos referenciais marcados no menor diâmetro nos limites opostos do halo de inibição. Quando o halo de inibição não era facilmente observado a olho nu, era feito o exame usando-se a lupa estereoscópica 10X (Olympus).

Resultado

As exigências para a realização de análise paramétrica não foram satisfeitas, por isso decidiu-se empregar metodologia estatística não paramétrica, do tipo Kruskal-Wallis,¹⁵ adotando o nível de significância de 5%.

Primeiramente, será apresentada análise do comportamento dos cimentos com *S. mutans* e *S. sanguis*, e, a seguir, será feita uma abordagem conjunta desses microorganismos.

Streptococcus mutans

Para os dados obtidos da leitura dos halos de inibição, foi feita a distribuição em "postos", o que permite observar que os materiais KE, RE, SH e TI apresentaram comportamento uniforme, com "posto" médio mínimo significativamente inferior aos demais materiais; já o cimento VI apresentou o maior posto médio, com diferença não

significativa para HY e XR; os cimentos HY, LI, XR apresentaram-se em nível intermediário e semelhantes. A Figura 1 ilustra esse achado.

Streptococcus sanguis

Para esse microorganismo, a Figura 2 permite observar que os materiais KE, RE, SH e TI apresentaram comportamento inferior e uniforme. O cimento VI apresentou o maior "posto" médio e os cimentos HY, LI e XR apresentaram "postos" médios em nível intermediário, porém uniforme.

S. mutans* e *S. sanguis

Após análise da atividade antimicrobiana de cimentos segundo cada microorganismo, observou-se que os resultados foram análogos. Essa analogia em relação aos microorganismos é visualizada na Figura 3.

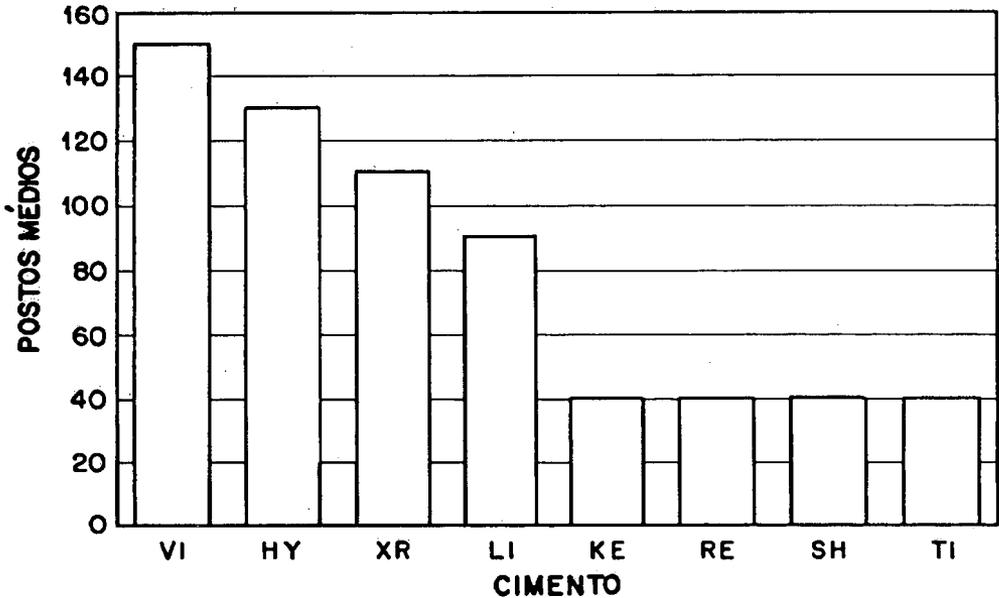


FIGURA 1 - Ação antimicrobiana dos cimentos perante *S. mutans*.

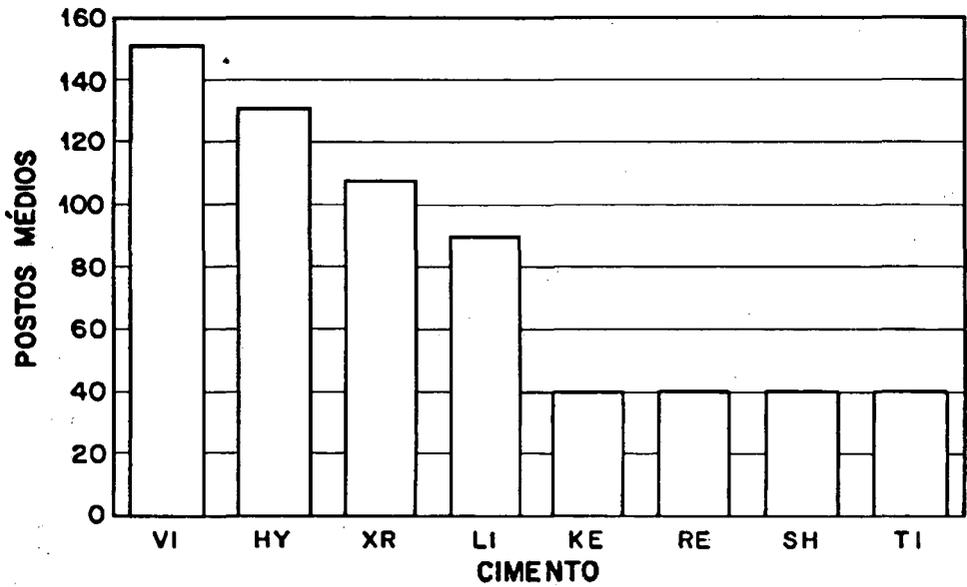


FIGURA 2 - Ação antimicrobiana dos cimentos perante *S. sanguis*.

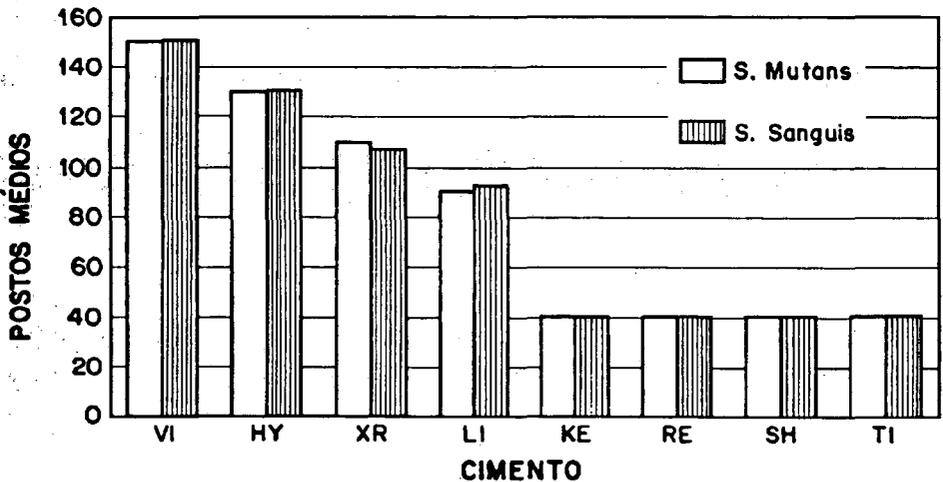


FIGURA 3 - Ação antimicrobiana dos cimentos perante *S. mutans* e *S. sanguis*.

Discussão

Verificando a ação antimicrobiana dos cimentos sobre *S. mutans* e *S. sanguis*, observou-se que os resultados foram semelhantes com ambos os microorganismos. Por outro lado, Barkhordar & Kempler,¹ estudando a ação antimicrobiana de cimentos

de hidróxido de cálcio sobre *S. mutans* e *S. sanguis*, verificaram que as zonas de inibição para *S. mutans* foram maiores do que os halos de inibição para *S. sanguis*. Em outro trabalho, Barkhordar et al.,² analisando a ação antimicrobiana de cimento de ionômero de vidro sobre as mesmas cepas de microorganismos, mostraram que alguns dos cimentos testados tiveram maiores halos em relação ao *S. sanguis* e outros, em relação ao *S. mutans*.

Considerando o fator material, pode-se observar que o cimento Vitrebond propiciou o maior halo de inibição, porém estatisticamente igual aos dos cimentos Hydro C e XR-Ionomer.

Os resultados positivos da ação antimicrobiana obtidos com os cimentos Vibrebond e XR-Ionomer confirmam os resultados de DeSchepper et al.,⁴ em que, além da ação antimicrobiana, estudaram a liberação de flúor e o pH desses cimentos. Os autores propõem que a atividade antimicrobiana seja causada pelo baixo pH, pois dentre os cimentos estudados (Zionomer P/L, Zionomer P/P, XR-Ionomer, Vitrebond e Timeline) só o XR-Ionomer e o Vitrebond inibiram o crescimento do *S. mutans* e foram os únicos a baixar o pH para 3,0 e 4,0, respectivamente. Além disso, liberaram concentrações de flúor consideradas bactericidas.

Hamilton & Bowden⁹ observaram que as concentrações inibitórias mínimas de flúor necessárias para atuar sobre *S. mutans* variam de 20 a 300 ppm, dependendo do composto de flúor usado e do pH do meio. Portanto, a acidez do meio tem tendência a potencializar o efeito antimicrobiano.

A ação positiva do cimento Hydro C, à base de hidróxido de cálcio, com comportamento estatisticamente igual ao Vitrebond e ao XR-Ionomer, tem substancial respaldo na literatura.

A embalagem do Hydro C* nos fornece em suas instruções a composição, porém sem a porcentagem dos elementos e, numa comparação com a fórmula do Dycal, segundo Fisher & McCabe,⁶ constatamos que são os mesmos elementos, ambos produzidos pela mesma indústria.

Diversos estudos^{7, 12, 19, 1} confirmam ação do cimento Dycal sobre *S. mutans*, *S. sanguis* ou sobre ambos.

Em posição intermediária e inferior ao Vitrebond, encontramos o cimento Life Improved que, por sua vez, exibiu comportamento semelhante ao Hydro C e ao XR Ionomer.

Embora não tenhamos encontrado na literatura trabalhos sobre a ação antimicrobiana do Life Improved, dispomos de publicações sobre o Life, cimento também à base de hidróxido de cálcio e da mesma indústria. O cimento Life Improved,** apresentado no trabalho de Freitas,⁸ fornece nas instruções a sua composição. Barkhordar & Kempler¹ estudaram *in vitro* o Life sobre *S. mutans* e *S. sanguis*; Forsten & Soderling,⁷ usando *S. mutans*, confirmam a ação antimicrobiana do Life, entretanto

* Dentsply Ind. e Com. Ltda. - Rua Alice Hervê, 86 - Petrópolis - RJ.

** Sybron Kerr Ind. e Com. Ltda. - Av. Amâncio Gaiolli, 775 - Guarulhos - SP.

não ratificam a similaridade do comportamento entre Life e Dycal, ou, por analogia, entre Life Improved e Hydro C.

Dos componentes químicos existentes na formulação de cimentos à base de hidróxido de cálcio, alguns foram estudados quanto à sua ação antimicrobiana. O hidróxido de cálcio, nos trabalhos de Lado et al.,¹⁰ Melo et al.,¹³ Sperança et al.,¹⁶ mostrou ser antimicrobiano; o óxido de zinco, nos trabalhos de Scherer et al.¹⁴ e de Turkheim.²⁰ O etiltolueno-sulfonamida é um óleo fenólico. As sulfonamidas são bacteriostáticas, inibindo a síntese do ácido fólico, por interferência competitiva com o ácido p-aminobenzóico (APAB), segundo os trabalhos de Fisher & McCabe⁶ e de Meeker et al.¹² Os cátions, tais como zinco, cálcio e magnésio, têm também eficiência para inibição bacteriana, segundo Winslow & Haywood.²¹

Para explicar também a ação antimicrobiana dos materiais, temos de levar em consideração o pH produzido pelos cimentos. O pH alcalino é um fator que favorece a ação antimicrobiana dos cimentos à base de hidróxido de cálcio, e vários autores, como Meeker et al.,¹² Fisher & McCabe,⁶ Tobias et al.,¹⁹ acreditam que o pH altamente alcalino do hidróxido de cálcio crie um ambiente adverso ao desenvolvimento da maioria dos microorganismos. Segundo Sperança et al.,¹⁶ para a maioria das bactérias, o pH ótimo de crescimento se localiza em torno de 6,5 e 7,5, e são poucas as bactérias que conseguem se desenvolver em limites extremos de pH.

Os cimentos Shofu Lining Cement, Ketac-Bond, Timeline e Renew Light mostraram os menores postos médios e iguais entre si.

Os cimentos de ionômero de vidro Shofu Lining Cement e Ketac-Bond, em ação sobre *S. mutans* e *S. sanguis*, foram estudados por Barkhordar et al.,² DeSchepper et al.⁵ e Scherer et al.¹⁴ estudaram os mesmos cimentos agindo sobre *S. mutans*. Nos três trabalhos, esses cimentos mostram atividade antimicrobiana sobre os microorganismos estudados, não sendo, portanto, concordantes com nossos resultados.

Esse fato talvez se deva a diferenças na metodologia por nós empregada, pois esses autores verificaram a ação dos cimentos imediatamente após a manipulação. Para tanto, foram feitas cavidades no meio de cultura e preenchidas com a mistura de cimento recentemente espatulado, procedimento conhecido como "técnica do poço".

A "técnica do poço" e o material colocado após a espatulação comparados com a colocação das amostras de cimento após sua presa, sobre a superfície do meio de cultura, propicia uma maior superfície de contato e, conseqüentemente, uma maior difusão, em que o agente antimicrobiano pode alcançar a concentração inibitória mínima no meio do ágar, segundo Tobias.¹⁷ Os trabalhos de Tobias et al.¹⁸ e Turkheim,²⁰ sobre a ação antimicrobiana de cimentos logo após serem espatulados e após a presa, verificaram que todos os cimentos, após a presa, tinham a sua atividade antimicrobiana diminuída e, dependendo do microorganismo estudado, essa ação era perdida. Um material logo após sua espatulação é mais solúvel do que após a sua presa; esse fato também pode refletir na sua variação da ação antimicrobiana, segundo

Freitas⁸ e Fisher & McCabe.⁶ Além disso, no estudo de McComb & Ericson,¹¹ os cimentos de ionômero de vidro apresentaram um pH $2,6 \pm 0,4$ durante a reação de presa e, após a presa, um pH $7,4 \pm 0,6$. Portanto, como já foi discutido anteriormente, o pH abaixo de 4,0 tem marcante influência na ação antimicrobiana dos cimentos de ionômero de vidro.

No trabalho de DeSchepper et al.,⁴ o uso do cimento Timeline teve o objetivo de testar a sua ação antimicrobiana sobre *S. mutans in vitro*, usando o Teste de Difusão em Ágar (TDA), para quantificar a liberação de flúor e o seu pH ao redor da amostra de cimento no ágar. Quanto à sua ação antimicrobiana, o Timeline não foi efetivo em produzir halo inibitório; quanto à liberação de flúor no ágar adjacente ao material, foram abaixo dos valores de concentração inibitória mínima (20 ppm) e o pH ficou entre 6,4 a 6,8 e, portanto, acima de 4,0, uma vez que valores abaixo de 4,0 influenciam a ação antimicrobiana e a liberação de flúor, como já foi afirmado anteriormente.

Não encontramos na literatura testes de avaliação antimicrobiana com o Renew Light. O cimento similar Prisma VLC Dycal foi estudado por McComb & Ericson¹¹ sobre *S. mutans in vitro*, não produzindo halo de inibição e possibilitando que as bactérias pudessem até crescer em contato com o material em excesso na superfície do ágar.

Esses achados para o Timeline e para o cimento similar ao Renew-Light confirmam os nossos resultados.

Enfim, devemos sempre considerar o material à luz de suas propriedades, que, como sabemos, dificilmente somam todas as qualidades desejáveis. Sob esse aspecto, procuramos contribuir para o melhor conhecimento da ação antimicrobiana de protetores do complexo dentina-polpa; entretanto, um enorme campo está aberto para essas e outras questões, ainda não suficientemente esclarecidas.

Conclusão

Dentro das condições experimentais do presente trabalho, baseados nos resultados obtidos, parece-nos válido concluir que:

- cada cimento estudado obteve o mesmo comportamento diante dos microorganismos *S. mutans* e *S. sanguis*;
- o Vitrebond proporcionou o maior halo de inibição, porém sem diferença significativa para os materiais Hydro C e XR-Ionomer;
- os cimentos Ketac-Bond, Renew Light, Shofu Lining Cement e Timeline apresentaram os menores halos de inibição e são semelhantes entre si;
- o cimento Life Improved ocupou nível intermediário com diferença não significativa para XR-Ionomer e Hydro C.

Agradecimentos

À Prof. Dra. Leonor de Castro Monteiro Loffredo, pela realização da análise estatística.

AFONSO, T. da S., ADABO, G. L., PIZZOLITTO, A. C. In vitro study of the antimicrobial action of dentin-pulp complex protector cements on *S. mutans* and *S. sanguis*. *Rev. Odont. UNESP (São Paulo)*, v.24, n.2, p.317-326, 1995.

- **ABSTRACT:** *The authors used the diffusion test in agar to verify the antimicrobial action of the pulp-dentin complex protector cements on S. mutans and S. sanguis. Under the conditions of the work, the eight studied cements in vitro, Vitrebond, Hydro C, XR-Ionomer and Life Improved showed antimicrobial action; while Ketac-Bond, Renew Light, Shofu Lining Cement and Timeline did not show antimicrobial action.*
- **KEYWORDS:** *Calcium hydroxide cements, microbiology; glass ionomer cements, microbiology.*

Referências bibliográficas

- 1 BARKHORDAR, R. A., KEMPLER, D. Antimicrobial activity of calcium hydroxide liners on *Streptococcus sanguis* and *S. mutans*. *J. Prosthet. Dent.*, v.61, p.314-7, 1989.
- 2 BARKHORDAR, R. A. et al. Antimicrobial action of glass-ionomer lining cement on *S. sanguis* and *S. mutans*. *Dent. Mater.*, v.5, p.281-2, 1989.
- 3 BROWNE, R. M., TOBIAS, R. S. Microbial microleakage and pulpal inflammation: a review. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.2, p.177-83, 1986.
- 4 DeSCHEPPER, E. J., THRASHER, M. R., THURMOND, B. A. Antibacterial effects of light-cured liners. *Am. J. Dent.*, v.2, p.74-6, 1989.
- 5 DeSCHEPPER, E. J., WHITE, R. R., VON DER LEHR, W. Antibacterial effects of glass ionomers. *Am. J. Dent.*, v.2, p.51-6, 1989.
- 6 FISHER, F. J., McCABE, J. F. Calcium hydroxide base materials: an investigation into the relationship between chemical structure and antibacterial properties. *Br. Dent. J.*, v.144, p.341-4, 1978.
- 7 FORSTEN, L., SODERLING, E. The alkaline and antibacterial effect of seven Ca(OH)₂ liners in vitro. *Acta Odontol. Scand.*, v.42, p.93-8, 1984.
- 8 FREITAS, J. F. Characterization and aqueous extraction of a calcium hydroxide materials. *Aust. Dent. J.*, v.27, p.352-6, 1982.
- 9 HAMILTON, I., BOWDEN, G. Effect of fluoride on oral microorganisms. In: EKSTRAND, J., FEJERSKOV, O., SILVERSTONE, L. M. (Ed.) *Fluoride in dentistry*. Copenhagen: Munksgaard, 1988. p.77-103.
- 10 LADO, E. A. et al. In vitro antimicrobial activity of six pulp capping agents. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.61, p.197-200, 1986.
- 11 McCOMB, D., ERICSON, D. Antimicrobial action of new, proprietary lining cements. *J. Dent. Res.*, v.66, p.1025-8, 1987.

- 12 MEEKER, H. G., NAJAFI, M. M., LINKE, H. A. B. Germicidal properties of dental cavity liners, bases, and cements. *Gen. Dent.*, v.34, p.474-8, 1986.
- 13 MELO, G. R., BAHIA, M. G. A., VALADARES, J. O. Ação antibacteriana do hidróxido de cálcio. *Arq. Cent. Estud. Curso Odontol. Univ. Fed. Minas Gerais*, v.21, p.65-8, 1984.
- 14 SCHERER, W., LIPPMAN, N., KAIM, J. Antimicrobial properties of glass-ionomer cements and other restorative materials. *Oper. Dent.*, v.14, p.77-81, 1989.
- 15 SOKAL, R. R., ROHLF, F. J. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. San Francisco: Freeman, 1969.
- 16 SPERANÇA, P. A. et al. Análise da propriedade antimicrobiana da solução (água de cal) e da suspensão (lama de cal) do hidróxido de cálcio. *Odontol. Mod.*, v.12, n.8, p.31-6, 1985.
- 17 TOBIAS, R. S. Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. *Int. Endod. J.*, v.21, p.155-60, 1988.
- 18 TOBIAS, R. S., BROWNE, R. M., WILSON, C. A. Antibacterial activity of dental restorative materials. *Int. Endod. J.*, v.18, p.161-71, 1985.
- 19 TOBIAS, R. S. et al. A further study of the antibacterial properties of dental restorative materials. *Int. Endod. J.*, v.21, p.381-92, 1988.
- 20 TURKHEIM, H. J. Bacteriological investigations on dental filling materials. *Br. Dent. J.*, v.95, p.1-7, 1953.
- 21 WINSLOW, C. E. A., HAYWOOD, E. T. The specific potency of certain cations with reference to their effect on bacterial viability. *J. Bacteriol.*, v.22, p.49-69, 1931.

Recebido em 6.8.1994.