



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Carlos César Velazco Tapia

Avaliação do efeito antimicrobiano de pastas obturadoras
com diferentes veículos, usadas em dentes decíduos com
necrose pulpar

Piracicaba

2016

Carlos César Velazco Tapia

Avaliação do efeito antimicrobiano de pastas obturadoras
com diferentes veículos usadas, em dentes decíduos com
necrose pulpar

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do
título de Mestre em Odontologia – Área de
concentração em Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Maria Puppín-Rontani

Co-orientadora : Profa. Dra. Fernanda Miori Pascon

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO
CARLOS CÉSAR VELAZCO TAPIA E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. REGINA MARIA PUPPIN-RONTANI

Piracicaba

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

V541a Velazco Tapia, Carlos César, 1982-
Avaliação do efeito antimicrobiano de pastas obturadoras com diferentes veículos usadas em dentes decíduos com necrose pulpar / Carlos César Velazco Tapia. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Regina Maria Puppini Rontani.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Hidróxido de cálcio. 2. Iodoformium. 3. Necrose da polpa dentária. 4. Testes de sensibilidade bacteriana. 5. Veículos farmacêuticos. I. Puppini Rontani, Regina Maria, 1959-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of antimicrobial effect of filling materials with different vehicles used in primary teeth with pulp necrosis

Palavras-chave em inglês:

Calcium hydroxide

Iodoformium

Dental pulp necrosis

Bacterial sensitivity tests

Pharmaceutical vehicles

Área de concentração: Odontopediatria

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca examinadora:

Regina Maria Puppini Rontani [Orientador]

Elisa Maria Aparecida Giro

Adriana de Jesus Soares

Data de defesa: 29-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 29 de Fevereiro de 2016, considerou o candidato CARLOS CÉSAR VELAZCO TAPIA aprovado.

PROF^ª. DR^ª. REGINA MARIA PUPPIN RONTANI

PROF^ª. DR^ª. ELISA MARIA APARECIDA GIRO

PROF^ª. DR^ª. ADRIANA DE JESUS SOARES

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, irmãos, amigos, amigas e a todos os que ajudaram-me durante estes 2 anos do mestrado na Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, na pessoa do magnífico reitor, Prof. Dr. José Tadeu Jorge.

A Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP), na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques e do diretor associado, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto; à coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Profa. Dra. Juliana Trindade Napimoga.

As professoras da área de Odontopediatria, Profa. Dra. Regina Maria Puppini Rontani, Profa. Dra. Maria Beatriz Duarte Gavião, Profa. Dra. Marines N. dos Santos, Profa. Dra. Fernanda Miori Pascon e Profa. Dra. Carolina Steiner Alarcón.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela contribuição feita para realizar os testes microbiológicos.

Ao Prof. Dr. Rafael Nóbrega Stipp da Área de Microbiologia Oral da FOP – UNICAMP, pela importante contribuição dada a este trabalho durante o meu mestrado.

Aos meus pais e irmãos.

RESUMO

O objetivo neste estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano da adição de iodofórmio em pastas obturadoras Calen[®] e Ultracal[®]XS, à base de hidróxido de cálcio, contendo diferentes veículos, frente a *Porphyromonas gingivalis* (PG), *Fusobacterium nucleatum* (FN), *Prevotella nigrescens* (PN) e *Enterococcus faecalis* (EF), presentes em dentes decíduos com necrose pulpar, por meio da avaliação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM), Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) e teste de difusão em ágar. Foram constituídos quatro grupos de acordo com as pastas utilizadas: Calen[®]; Calen[®] + iodofórmio; Ultracal[®] XS; e, Ultracal[®]XS + iodofórmio. Um total de 0,125 g de cada pasta foi utilizado nos testes microbiológicos. Um total de 0,0625 g de iodofórmio foi adicionado a 0,0625 g de cada uma das pastas e constituíram os grupos de pastas com iodofórmio. Após a adição do iodofórmio, todas as pastas foram diluídas 1:4 em BHI (*Brain heart infusion*), homogeneizadas em *vortex* e colocadas em placas com 96 poços contendo BHI e os inóculos bacterianos. Como controle positivo do método foi usado meio de cultura sem pastas e a mesma quantidade de bactérias, como controle negativo apenas meio de cultura estéril e como controle de inibição do crescimento bacteriano foi utilizado clorexidina a 0,12%. CIMs, CBMs e testes de difusão em ágar foram avaliadas em triplicata. Os dados da CIM foram submetidos ao teste *Kruskall-Wallis* ($\alpha=5\%$) e CBM e teste de difusão em ágar às análises descritivas. Resultados das CIM mostraram que as pastas apresentaram efeito antibacteriano frente a PG e PN; para FN apenas a pasta Calen[®] + iodofórmio apresentou efeito antimicrobiano, e para EF nenhuma das pastas apresentou. Entretanto, não houve diferença significativa quanto ao efeito antimicrobiano entre as pastas. Resultados das CBM mostraram que as pastas apresentaram efeito bacteriostático para PN e PG, e apenas a Calen[®] + iodofórmio apresentou efeito bacteriostático contra FN, e contra EF as pastas não apresentaram efeito bacteriostático. Testes de difusão em ágar não mostraram efeito antimicrobiano para nenhum micro-organismo. Concluiu-se que as pastas avaliadas não apresentaram diferenças relevantes entre elas quanto à capacidade antimicrobiana frente aos microrganismos analisados e que os

veículos não influenciaram a capacidade antibacteriana das mesmas. As pastas apresentaram capacidade bacteriostática frente à PN e PG, só Calen[®] + iodofórmio apresentou capacidade bacteriostática frente ao FN. Nenhuma delas apresentou efeito antimicrobiano frente ao EF.

Palavras chaves: Hidróxido de cálcio, iodoformium, necrose da polpa dentária, testes de sensibilidade microbiana, veículos farmacêuticos.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the antimicrobial effect of calcium hydroxide-based filling materials and iodoform with different vehicles against microorganism commonly present in primary teeth pulp necrosis through Minimal Inhibitory Concentrations (MIC), Minimal Bactericide Concentrations (MBC) and agar diffusion assay. It was used Calen[®], Ultracal[®]XS, Calen[®]+iodoform and Ultracal[®]XS + iodoform which were exposed to *Porphyromonas gingivalis* (PG), *Fusobacterium nucleatum* (FN), *Prevotella nigrescens* (PN) and *Enterococcus faecalis* (EF) strains. After addition of iodoform all paste were diluted 1:4 in BHI medium (*Brain heart infusion*) homogenized in vortex and put in plates with BHI and bacterial inoculum. As positive control it was use culture medium and the same bacteria amount. As negative control it was used culture medium and as growth inhibitory control 0.12% chlorhexidine. MICs, MBCs and agar diffusion assay were evaluated in triplicate. MIC results was analyzed with *Kruskal-Wallis* test ($\alpha=5\%$) and MBC and agar diffusion assay through descriptive analysis. MIC results showed no significant difference between pastes and bacteria on the study, all pastes showed the same antimicrobial effect. All pastes showed inhibitory effect against PG and PN and only Calen[®]+ iodoform showed antimicrobial effect against FN. All pastes did not show antimicrobial effect against EF. MBC results showed all pastes bacteriostatic effect for PG and PN, only Calen[®]+ iodoform showed bacteriostatic effect for FN and all pastes did not show bacteriostatic effect for EF. Agar diffusion assay did not show antimicrobial effect against evaluated bacteria. It was concluded that pastes did not show antimicrobial difference between them and the vehicles did not influence this antibacterial effect. Pastes showed bacteriostatic and no bactericidal effect for PN and PG and just Calen[®] + iodoform showed bacteriostatic effect against FN. None of pastes showed inhibitory effect against EF.

Keywords: Calcium hydroxide, iodoformium, dental pulp necrosis, microbial sensitivity tests, pharmaceutical vehicles.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
3 PROPOSIÇÃO	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
5 RESULTADOS	32
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

A necrose pulpar causada por invasão bacteriana advinda do processo carioso permite a infecção da dentina radicular por micro-organismos. Esta contaminação não tratada, compromete a polpa dentária estabelecida no interior dos túbulos dentinários, podendo causar disseminação de bactérias da cavidade bucal para a corrente sanguínea, colocando em risco a vida do paciente (Van Velzen *et al.*, 1984; Debelian *et al.*,1994; Schuman e Turner,1994; Brook, 2006; Shinzato, 2009; Clifton, 2012).

Estudos realizados por meio de cultura bacteriológica e *checkerboard DNA-DNA hybridization* demonstraram que a prevalência de micro-organismos em canais radiculares de dentes decíduos humanos com necrose pulpar compreende microbiota polimicrobiana com predominância de micro-organismos anaeróbios. A importância clínica desses achados revela a necessidade do adequado preparo químico-mecânico dos canais radiculares com subsequente obturação dos mesmos com materiais antimicrobianos (De Souza *et al.*,2005; Gomes *et al.*,2013).

Fusobacterium nucleatum, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas nigrescens* estão entre os microrganismos encontrados frequentemente em dentes decíduos com necrose pulpar (Brook, 2003; Gomes *et al.*, 2013; Triches *et al.*, 2014). Estes dentes com necrose pulpar podem ser tratados por meio do tratamento endodôntico, que uma vez descontaminados e restaurados podem permanecer na cavidade bucal exercendo suas funções até a esfoliação (Finucane, 2012).

A manutenção dos dentes decíduos no arco até o período de esfoliação é vital para o correto desenvolvimento maxilo-facial e evitar às consequências da cárie precoce da infância que produzem impactos na qualidade de vida do paciente, dano ao dente permanente sucessor e produzem novas lesões de cárie dental na dentição decídua e permanente, tornando-se um problema de saúde pública mundial (Laing *et al.*, 2009; Barja-Fidalgo *et al.*, 2011). Dessa forma, a limpeza dos condutos radiculares e da área de dentina infectada deve

ser realizada com materiais obturadores que possuam também propriedades antibacterianas (Finucane, 2012).

Contudo, a limpeza dos condutos pode não ser suficiente para impedir a reinfecção radicular. Para evitar esta reinfecção há necessidade de obturação dos mesmos. Em dentes permanentes a obturação geralmente se dá por meio de materiais obturadores a base de óxido de zinco e cones de gutapercha (Mohammadi *et al.*, 2014). Entretanto, em dentes decíduos não existe essa possibilidade devido a rizólise fisiológica e esfoliação dos dentes. Assim, a fim de incrementar o sucesso do tratamento na dentição decídua, pastas obturadoras antimicrobianas são necessárias, permitindo que, enquanto as raízes sofram rizólise, a pasta obturadora seja reabsorvida na mesma velocidade (Barja-Fidalgo *et al.*, 2011).

As pastas obturadoras mais utilizadas tem como base antimicrobianos ou Hidróxido de Cálcio (HC), muitas vezes associado a iodofórmio. Dentre as pastas comerciais à base de HC mais estudadas encontram-se a Metapex[®], Vitapex[®] e Sealapex[®] (Nurko *et al.*, 2000; Mortazavi e Mesbahi, 2004; Cwikla *et al.*, 2005; Hedge, 2012). No mercado brasileiro existem poucas opções comerciais de materiais de obturação de canais radiculares a base só de HC ou associado a iodofórmio como Ultracal[®]XS (Ultradent Products, Inc., US), Hydropast[®] + I (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Brasil) ou Calen[®] (SS White[®] Ltda., Brasil).

A pasta Ultracal[®]XS apresenta na sua composição 35% de HC, 2% de sulfato de bário, água e metilcelulose. Apesar de ter uma formulação de 35% de HC, estudos mostraram maior ou igual eficácia antibacteriana quando comparados com pastas a base de HC a 40% e 50% frente a *Prevotella nigrescens* e *Porphyromonas endodontalis* (Blanscet *et al.*, 2008). A pasta Calen[®] utilizada no Brasil, inicialmente para curativos de demora em dentes permanentes, tem sido estudada desde 1978 como material de obturação e atualmente também é utilizada para a obturação de dentes decíduos. Apresenta na composição: HC (49,77%), óxido de zinco, colofônia e polietilenoglicol 400. Essa composição produz um medicamento com baixa radiopacidade e alta solubilidade. Como forma de melhorar essas propriedades tem sido utilizado sendo espessado com óxido de zinco. Ainda, assim, não

apresenta radiopacidade suficiente para ser bem observado dentro dos canais radiculares. Para aumentar a radiopacidade da pasta e oferecer maior efeito antimicrobiano, o iodofórmio pode ser utilizado como espessante (Leonardo *et al.*, 1978). Desde a metade do século 20, pastas contendo iodofórmio foram indicadas como antissépticos em infecções endodônticas devido à liberação de iodo (Maisto e Capurro, 1964; Maisto e Erausquin, 1965). O iodofórmio é um bactericida que pode ser utilizado para aumentar o efeito antimicrobiano da pasta obturadora por meio da precipitação de proteínas. O alto sucesso clínico e radiográfico das pastas a base de HC associadas ao iodofórmio está relacionado às importantes características do medicamento como a radiopacidade, reabsorção do excesso do material obturador e reparação de tecidos (Estrela *et al.*, 2006; Trairatvorakul *et al.*, 2008; Pavaskar *et al.*, 2014).

Porém, o efeito das pastas não pode ser atribuído apenas aos componentes ativos destas, pois, o veículo tem importante papel na difusão dos princípios ativos para o interior da dentina contaminada e dos tecidos periapicais, produzindo o efeito antimicrobiano (Fava e Saunders, 1999; Robert *et al.*, 2005). Há três tipos de veículos usados: o veículo aquoso como metilcelulose ou solução salina, que promove alto grau de solubilidade quando a pasta permanece em contato direto com o tecido. O veículo viscoso, como polietilenoglicol e propilenoglicol, os quais liberam íons de cálcio e hidróxila que promovem a baixa solubilidade da pasta e assim mantem a pasta na área escolhida por mais tempo, prolongando o tempo de ação; e os veículos oleosos como óleo de oliva ou polidimetilsiloxane não são solúveis em água e promovem a baixa solubilidade da pasta nos tecidos. Portanto, as pastas com este veículo permaneceriam dentro do canal por mais tempo que as pastas com veículos aquosos e viscosos (Lopes *et al.*, 1998; Fava e Saunders, 1999).

Assim, um canal radicular com túbulos dentinários com micro-organismos capazes de desenvolver infecções e re-contaminar um conduto já tratado, sempre foi motivo da busca de novos antimicrobianos pelo fato de afetarem as propriedades físicas e químicas do componente e constitui assim um desafio para o odontopediatra (Fava e Saunders, 1999; Gomes *et al.*, 2004).

Baseando-se na literatura formulou-se a hipótese de que as pastas obturadoras com diferentes concentrações de hidróxido de cálcio, com veículo aquoso e iodofórmio apresentam maior eficácia antimicrobiana que as contendo veículo viscoso.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Doença dental e impacto na condição sistêmica

A cavidade oral como foco de infecção em crianças, foi estudada por Brook *et al.* (2003) e observaram o predomínio de micro-organismos anaeróbios como *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* e *Peptostreptococcus spp.*, em abscessos periapicais e que a penicilina e amoxicilina são medicamentos efetivos frente a maioria de bactérias anaeróbias encontradas nesses casos.

Baseando-se na literatura, Van Velzen *et al.* (1984) e Debelian *et al.* (1994) relataram as vias que relacionam a microbiota oral com doenças sistêmicas, como infecções devido à bacteremia, a lesões imunológicas e a lesões por toxinas bacterianas. Dessa forma, estes estudos apresentaram a relação entre miocardite bacteriana, endocardite infecciosa, uveíte, entre outras afecções, com micro-organismos comumente encontrados na cavidade oral. Eles também relataram que exodontias, tratamentos endodônticos e tratamentos periodontais podem causar translocação de bactérias da boca até a corrente sanguínea. Micro-organismos que entram na corrente sanguínea são eliminados pelo hospedeiro em minutos, porém em pacientes com doenças vasculares, a bacteremia pode ser um perigo, causando endocardite infecciosa ou infarto cerebral. Por tanto, este espalhamento de bactérias da boca pela corrente sanguínea deve ser eliminado, caso contrário pode levar a infecções com comprometimento sistêmico.

Abscessos cerebrais tem uma relação direta com infecções de origem odontogênica, pelo abscesso dentário ou sinusite de origem dental sem tratamento odontológico. Aspirado de pus de seios nasais infectados por infecções odontogênicas associados a abscesso cerebral, mostram micro-organismos anaeróbios. Estes micro-organismos anaeróbios da microbiota oral na maioria dos pacientes confirma uma forte relação entre a sinusite de origem odontogênica e o abscesso cerebral. Assim, existe uma alta mortalidade pelo abscesso cerebral, mas este pode ser tratado com sucesso com uma combinação de antibióticos e cirurgia. Por outro lado, a maior parte da literatura disponível sobre abscessos intracraniais de origem odontogênica cita apenas

os estudos clássicos, portanto é necessária uma atualização da literatura sobre microbiota oral e abscessos cerebrais (Schuman e Turner, 1994; Brook, 2006; Clifton, 2012).

A cárie dental e a doença periodontal apresentam uma forte associação com infecções pulmonares, pela aspiração de micro-organismos orais que multiplicam-se nos alvéolos pulmonares e pela relação do alcoolismo ou diabetes com o hospedeiro. Em crianças, as consequências da cárie precoce da infância, como dor, sepse e perda de espaço, demonstram que a cárie dental tem implicações na saúde dental e geral do paciente e que a falha no cuidado da saúde bucal é considerada uma desvantagem na vida do paciente. Por tanto, a higiene bucal é fundamental como controle de cárie e infecções odontogênicas e assim evitar o alto índice de doença dental e possíveis comprometimentos sistêmicos (Shinzato, 2009; Finucane, 2012).

Pastas obturadoras a base de hidróxido de cálcio utilizadas em dentes decíduos

Maisto e Capurro (1964) propuseram uma pasta obturadora composta por HC e iodofórmio em proporções iguais, usando metilcelulose a 3% como veículo, em tratamentos endodônticos com sobre obturação, em 60 dentes anteriores de pacientes entre 10 e 20 anos com necrose pulpar com controles clínicos e radiográficos. Cada tratamento foi efetuado em uma sessão forçando a sobre obturação. Resultados mostraram que dos 60 dentes, 2 apresentaram reação periapical pós-operatória. Em todos os casos observou-se reabsorção das sobre obturações e também foi reabsorvido o material obturador dentro do canal com velocidade variável entre cada dente. Concluiu-se que os controles radiográficos evidenciaram a reabsorção absoluta da pasta e tolerância clínica ao tratamento. Foi mostrada uma zona livre de microrganismos dentro do canal com esta mistura de materiais ocasionada pelo pH alcalino do HC. O material de obturação contido no canal foi reabsorvido com uma velocidade que varia em relação a amplitude do canal e do forame apical.

Maisto e Erausquin (1965) observaram a reação dos tecidos periapicais frente a pastas reabsorvíveis a base de iodofórmio em dentes de ratos. Foi

realizado o tratamento endodôntico em 90 ratos de ambos os sexos, com peso entre 130 e 160g, com 60 dias de idade. Foram avaliados 3 tipos de pastas: óxido de zinco + iodofórmio, iodofórmio + clorofenol canforado e iodofórmio + HC. Os resultados mostraram que as pastas dos canais radiculares com sobre obturação foram reabsorvidas rapidamente e a reação tissular do periodonto do rato foi similar àquela de seres humanos e do cão, e não apresentou diferença relevante dos tecidos periapicais frente às três pastas testadas. Foi concluído que o material sobre obturado foi reabsorvido rapidamente e não foi evidenciada diferenças na reação dos tecidos periapicais frente as 3 pastas testadas.

Leonardo *et al.* (1978) relataram a comparação de duas técnicas endodônticas: a técnica imediata frente a mediata, com uso do HC em tratamento intracanal em dentes com rizogênese incompleta. Na primeira técnica, que consiste na aplicação de HC na porção ainda incompleta do ápice, e na mesma sessão a obturação definitiva, mostrou sérios inconvenientes por apresentar uma área vazia que permite penetração e decomposição de exsudatos periapicais. Na técnica mediata, o HC é colocado provisoriamente no canal até ser observada a formação completa do ápice radicular e então, realizar a obturação definitiva. Os autores recomendam usar a técnica mediata e evitar os inconvenientes da técnica imediata.

Tchaou *et al.* (1996) compararam a atividade antibacteriana de 9 pastas obturadoras frente a micro-organismos anaeróbios usando testes de difusão em ágar. Duas das pastas iodoformadas (Vitapex[®] e uma mistura de iodofórmio + paramonoclorofenol) mostraram efeito moderado e forte contra os micro-organismos testados. Conclui-se que apesar de ter realizado testes *in vitro*, estas pastas podem ser utilizadas clinicamente em tratamentos de dentes com patologia pulpar.

Em 1999, Fava e Saunders fizeram uma revisão sobre o HC usado intracanal com o objetivo de revisar as várias formulações do HC descritas com específicas referências do veículo usado. Os veículos podem ser classificados em aquosos, oleosos e viscosos. Assim as propriedades químicas do HC mudam, dependendo deste. Uma pasta com veículo aquoso deve ser usada quando se faz necessária uma rápida liberação iônica. Uma pasta com veículo

viscoso deveria ser usada para que a pasta permaneça por um período prolongado de tempo no canal, durante este tempo o pH será mantido na área e para começar uma liberação iônica lenta. O veículo oleoso promove baixa solubilidade e difusão da pasta dentro dos tecidos, assim pastas que contem este veículo podem permanecer por mais tempo no canal que as pastas com veículo aquoso e viscoso. Em conclusão, veículos oleosos e viscosos prolongam a ação do HC comparados com os veículos aquosos.

Leonardo *et al.* (2000) avaliaram a atividade antimicrobiana de 7 pastas obturadoras, entre elas o Calen[®], frente a *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidemidis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*. A atividade antimicrobiana foi avaliada através de testes de difusão em ágar. Todos os materiais apresentaram atividade antimicrobiana frente a todos os micro-organismos, porém os menores halos de inibição foram apresentados pelo *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*.

Foi apresentado por Nurko *et al.* (2000) um caso clínico, de um paciente de 17 meses, de tratamento endodôntico realizado em dentes decíduos anteriores usando Vitapex[®], com controles clínicos e radiográficos (38 meses), Esta é uma pasta intracanal composta por iodofórmio (40,4%), HC (30,3%) e óleo de silicone (22,4%). Foram realizadas as pulpectomias dos incisivos laterais superiores. Nos exames controles posteriores foi observado que o Vitapex[®] usado como material de obturação para tratamento endodôntico em dentição decídua foi reabsorvido intra e extra radicularmente sem aparente efeito nocivo, que provou ser clínica e radiograficamente bem sucedido. Os autores sugerem controles prolongados para avaliar algum efeito no dente permanente sucessor.

Gomes *et al.* (2002a; 2002b) investigaram *in vitro* a atividade antimicrobiana do HC em combinação com veículos viscosos, oleosos e aquosos, frente a *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus Faecalis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens* e *Prevotella denticola*. A atividade antimicrobiana foi testada pelo método de difusão em

ágar. Foi concluído que as pastas com veículos oleosos mostraram significativamente maior zona de inibição em comparação com as pastas com veículos aquosos e viscosos, e que a difusão e atividade antimicrobiana do HC foi afetada pelo tipo de veículo usado.

Mortazavi e Mesbahi (2004) compararam uma pasta iodoformada (Vitapex®) com uma pasta de óxido de zinco/eugenol com o objetivo de realizar um ensaio clínico controlado em 52 dentes decíduos com necrose pulpar de pacientes com idade média de 5 anos, distribuídos em 2 grupos. Todos os pacientes foram controlados clínica e radiograficamente durante 3 meses. Estes resultados mostraram que as taxas de sucesso do Vitapex® e óxido de zinco/eugenol foram de 100% e 78,5%, respectivamente, mostrando diferença significativa. Pode-se concluir que o Vitapex® teve maior sucesso como material obturador em pulpectomias em dentes decíduos necróticos, e, que o material pode ser extruído através do ápice sem representar insucesso do procedimento. Assim, esta pasta iodoformada parece ser um material mais adequado que a pasta de óxido de zinco/eugenol como material de obturação em dentes decíduos.

Um modelo *in vitro* foi desenvolvido por Robert *et al.*, 2005, para estudar o efeito da medicação intracanal em tecido periapical e foi usado para estudar a difusão de 3 pastas à base de HC com diferentes viscosidades: HC + metilcelulose, HC a 10% + água destilada e HC a 91% + água destilada. As pastas foram colocadas em ponteiras imitando o canal radicular as quais foram fixadas em seringas contendo ágar BHI. Íons de OH⁻ e Ca⁺ foram medidos no ágar aos 30 minutos e às 24 horas. Os resultados mostraram que a concentração de Ca⁺ e pH incrementou-se com os maiores tamanhos de abertura, e que o maior pH e difusão de Ca⁺ foi produzido pelo HC a 10%. Resultados sugerem que os íons de OH⁻ devem ser capazes de se difundir rápido através dos canais e dos túbulos dentinários e agir sobre os micro-organismos no nível do sistema de canais radiculares e atingir o periápice para se difundir até as bactérias que estão fora dos canais radiculares.

Em 2005, De Souza *et al.* avaliaram a microbiota predominante em polpas necróticas infectadas e os efeitos da terapia com o HC sobre estes micro-organismos. Para isso, realizaram terapia endodôntica convencional

associada com HC como curativo de demora em 12 dentes unirradiculares com necrose pulpar e lesão óssea periradicular. As espécies prevalentes foram *F. nucleatum* ss. *Vincentii*, *C. sputigena*, *C. ochracea*, *S. constellatus*, *V. parvula*, *P. gingivalis*, *P. melaninogenica* e *S. sanguis*. Esses autores demonstraram que a maioria dos micro-organismos foram reduzidos após o tratamento, em particular *A. gerencseriae*, *A. israelii*, *A. naeslundii*, *C. gingivalis*, *C. ochracea*, *P. gingivalis*, *S. noxia*, *S. sanguis* e *S. oralis*. Por outro lado, *A. actinomycetemcomitans*, *C. sputigena* e *E. corrodens* mostraram-se aumentados em número após a terapia. Estes resultados indicam que a terapia endodôntica convencional com HC reduz espécies patogênicas associados com necrose pulpar, no entanto, apresenta utilização é limitada, porque não elimina todo o espectro de micro-organismos.

O propósito do estudo de Estrela *et al.* (2006) foi verificar a influência do Iodofórmio como potencial antimicrobiano do HC. *S.aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* foram indicadores biológicos. As substâncias testadas foram: HC + solução salina; HC + Iodofórmio + solução salina; Iodofórmio + solução salina. Para o teste de difusão em ágar, 18 placas de *Petri* contendo 20 ml de ágar BHI foram inoculadas com as suspensões microbianas. As pastas contendo HC e solução salina, HC + Iodofórmio e solução salina mostraram significativa atividade antimicrobiana nos métodos experimentais estudados enquanto que a pasta contendo Iodofórmio e solução salina foi ineficaz pelo teste de difusão em ágar. Assim, alguns estudos são necessários para aclarar o real mecanismo de ação da medicação em infecções endodônticas.

O objetivo do estudo de Gomes *et al.* (2006) foi investigar a atividade antimicrobiana do HC misturado com digluconato de clorexidina a 2% em gel frente a *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Enterococcus faecalis*, comparados com HC + água estéril e clorexidina a 2%. Foram usados 2 tipos de métodos: teste de difusão em ágar e teste de contato direto. Os grupos de HC + clorexidina a 2% e clorexidina a 2% mostraram zonas de inibição, o primeiro grupo requereu de 30 segundos a 1 minuto, e o segundo grupo de 1 minuto ou menos, para inibir todos os micro-organismos. O grupo

de HC + água estéril só eliminou os micro-organismos em contato direto. Conclui-se que o HC + clorexidina a 2% mostraram melhor atividade antimicrobiana que HC + água estéril.

Blanscet *et al.* (2008) realizaram um estudo para determinar se pastas de HC com veículo aquoso em diferentes concentrações tem eficácia antibacteriana frente a *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus sanguis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella nigrescens* em modelo de difusão em ágar. As pastas foram a base de HC a 60%, 50%, 40%, 35% (Ultracal[®] XS) e a 30% (Vitapex[®]). Os resultados mostraram que as pastas contendo HC a 50-60% mostraram superioridade sobre as outras; Ultracal[®] XS, com 35% de HC, mostrou o mesmo efeito que a pasta com 50% de HC e por tanto podem ser recomendados como materiais obturadores endodônticos.

O objetivo do trabalho de Trairatvorakul *et al.*(2008) foi comparar o sucesso clínico e radiográfico do óxido de zinco/eugenol e Vitapex[®] em pulpectomias em molares decíduos. Em 6 e 12 meses óxido de zinco/eugenol mostrou taxas de sucesso de 48% e 85% respectivamente em comparação com 78% e 89% do Vitapex[®]. A diferença das taxas de sucesso aos 6 meses foi significativa, porém, não foi aos 12 meses. Foi concluído que o Vitapex[®] alcançou sucesso nas patologias pulpares aos 6 meses em comparação com o óxido de zinco/eugenol mas depois de 12 meses ambos materiais apresentaram similares resultados.

Foi testada a atividade bactericida da pasta Calen[®] por Queiroz *et al.* (2009) frente a 5 cepas encontradas em infecções endodônticas em dentes decíduos (*Kocuria rhizophila*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e os resultados revelaram que Calen[®] e a pasta de óxido de zinco/eugenol mostraram o maior efeito antimicrobiano frente a Sealapex[®] Sealer e EndoREZ[®] Sealer.

Barja-Fidalgo *et al.* (2011) apresentaram uma revisão sistemática, a qual teve como objetivo determinar se existe ou não um material de obturação para dentes decíduos igual ou mais efetivo que a pasta de óxido de zinco/eugenol. Seis ensaios clínicos foram selecionados obedecendo aos critérios de inclusão.

Só 2 artigos mostraram sucesso com diferença significativa entre os testes e os grupos controle. Um artigo revelou que a pasta com HC + Iodofórmio teve melhor desempenho que a pasta de óxido de zinco/eugenol, o outro revelou que o óxido de zinco/eugenol teve o mesmo desempenho que HC + Iodofórmio. Os outros estudos compararam o óxido de zinco/eugenol com uma pasta iodoformada, cimento de HC ou HC + Iodofórmio. mostrando taxas de sucesso das pastas de óxido de zinco/eugenol levemente mais baixas que dos outros grupos de pastas a base de HC e Iodofórmio. Pode-se concluir que parece não existir evidência suficiente para sustentar a superioridade de algum material de obturação sobre o óxido de zinco/eugenol, e que HC+Iodofórmio parecem ser materiais adequados para obturação de dentes decíduos.

Gomes *et al.* (2013) realizaram um estudo para avaliar a frequência de microrganismos na câmara pulpar e intracanal de dentes permanentes infectados usando métodos PCR. Amostras foram coletadas de 15 pacientes e foram encontradas cepas de *Filifactor alocis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella tanneriae*, *Tanarella forsythia*, *Treponema denticola*, e *Treponema socranskii*. Os resultados mostraram que as espécies mais frequentes na câmara pulpar foram *Prevotella nigrescens* (86,7%), *Porphyromonas gingivalis* (73,3%) e *F. alocis* (73,3%) e no canal radicular foram *P.gingivalis* (100%) e *P.nigrescens* (93,3%). Pelos resultados obtidos pode-se concluir que não é possível atribuir uma etiologia endodôntica a um determinado micro-organismo apesar dos modernos métodos de diagnóstico. Os resultados sugerem heterogeneidade bacteriana entre a câmara pulpar e o canal radicular.

Sabrah *et al.* (2013) comparou o efeito antibacteriano do Ultracal® XS, Tri-Mix (ciprofloxacino, minociclina, metronidazol) e dupla pasta antibiótica (metronidazol, ciprofloxacino) frente a *Enterococcus faecalis* e *Porphyromonas gingivalis* por meio do método de concentração mínima inibitória e concentração bactericida mínima. Ultracal® XS não mostrou inibição do crescimento bacteriano dos micro-organismos testados, porém o Tri-Mix e a dupla pasta antibiótica mostraram inibição. Os autores concluíram que estas pastas antibióticas foram mais eficazes frente a *Enterococcus faecalis* e

Porphyromonas gingivalis que o Ultracal® XS, e que a dupla pasta pode ser considerada efetiva e comparável com o Tri-Mix.

Em outra abordagem, Pavaskar *et al.* (2014) avaliaram a eficácia da clorexidina a 2%, Ultracal® XS, Vitapex®, linezolida, e uma combinação de linezolida com HC contra *Enterococcus faecalis* em placas de cultura com ágar. Um total de 30 placas de ágar foram preparadas, de tal modo que cada placa era composta por cinco cavidades contendo os cinco medicamentos. As placas foram incubadas e avaliadas para zonas de inibição após intervalos de 24 horas e 72 horas. Os autores demonstraram que a diferença entre os valores das zonas de inibição em torno dos vários medicamentos depois de 24 horas e 72 horas mostrou-se ser estatisticamente significativo. Uma comparação entre os 5 grupos após 24 horas ou 72 horas, mostrou que cada grupo diferiu significativamente do resto dos grupos, assim a linezolida com HC teve a maior eficácia contra *Enterococcus faecalis*, seguido de linezolida, clorexidina a 2%, Vitapex® e Ultracal® XS utilizando testes de difusão em ágar.

Triches *et al.* (2014) com o objetivo de avaliar o conteúdo microbiano dos canais radiculares de dentes decíduos humanos com necrose pulpar e lesão periradicular, coletaram 24 canais de crianças com média de 6 anos de idade e encontraram que os microrganismos mais frequentes dentro do canal foram *Fusobacterium nucleatum sp., nucleatum, Fusobacterium periodonticum, Prevotella melaninogenica, Prevotella nigrescens* e *Prevotella intermedia*. Os autores concluíram que a natureza da infecção endodôntica é multimicrobiana nos canais radiculares em dentição decídua de dentes com necrose pulpar, com a presença de aeróbios, anaeróbios e outras espécies que fazem difícil a identificação.

Mohammadi *et al.* (2014) baseados na literatura realizaram uma revisão sobre a capacidade obturadora, biocompatibilidade, atividade antimicrobiana, solubilidade e toxicidade de materiais obturadores a base de HC. Capacidade obturadora desses materiais quando comparada a outros não é clara, este pode ser resultado do método de avaliação da filtração e das limitadas amostras de alguns estudos. Com respeito a biocompatibilidade, a maioria de estudos concorda que é aceitável em comparação com outros materiais obturadores. A atividade antimicrobiana é menor que outros materiais similares

especialmente dos que são a base resina e de óxido de zinco/eugenol. Devido aos poucos estudos avaliados, a solubilidade destes materiais é ainda controversa.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de pastas obturadoras à base de hidróxido de cálcio e iodofórmio com diferentes veículos, frente a micro-organismos presentes em canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido utilizando-se de metodologias para avaliação antimicrobiana por meio da avaliação da Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida Mínima e por Difusão em Ágar. A sequência das avaliações pode ser observada no organograma apresentado na Figura 1.

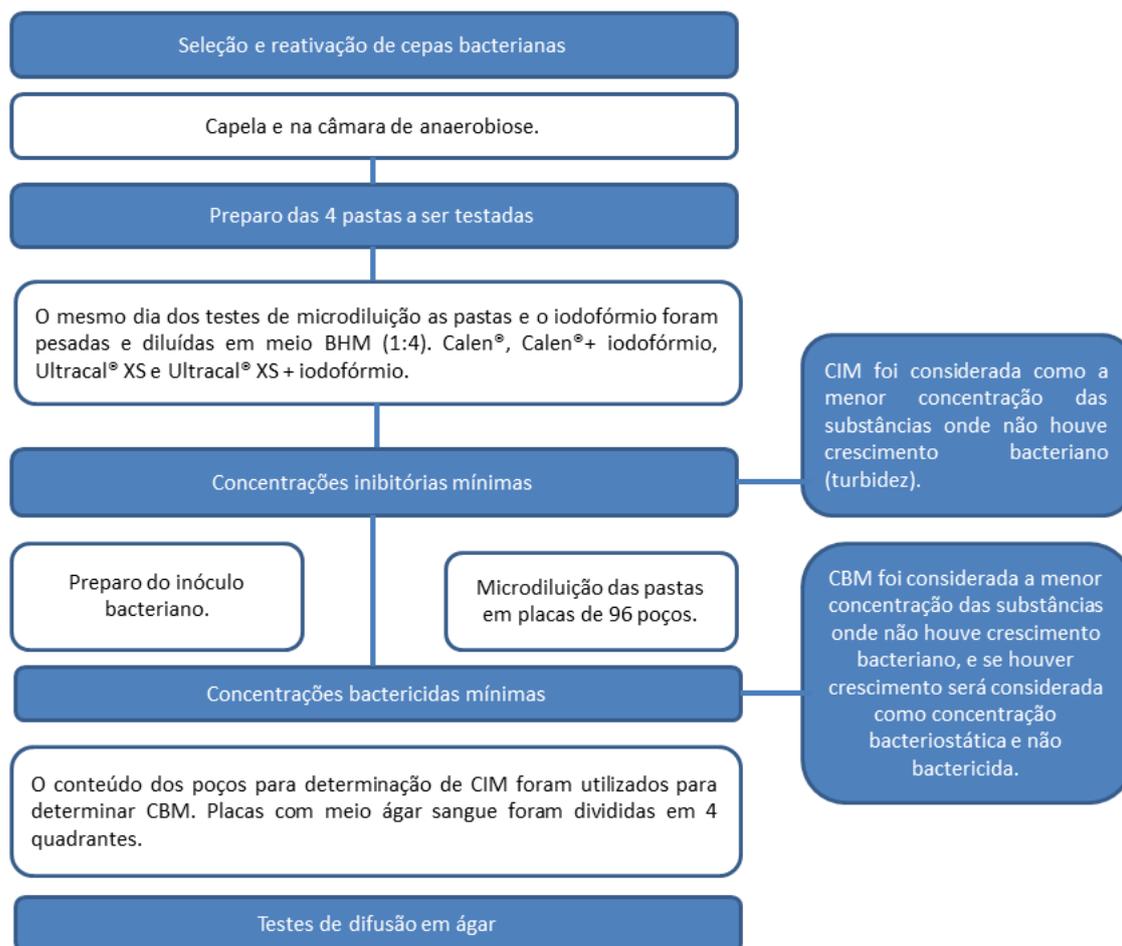


Figura 1 – Sequência metodológica utilizada no estudo.

Espécies bacterianas utilizadas

As espécies *Porphyromonas gingivalis* (cepa ATCC BAA-308), *Fusobacterium nucleatum* (cepa ATCC 33563), *Prevotella nigrescens* (cepa INCSQ 00454) e *Enterococcus faecalis* (cepa ATCC 29212), pertencentes ao acervo de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Oral

da FOP-UNICAMP foram utilizadas neste estudo. Os micro-organismos foram mantidos em meio BHI (*Brain Heart Infusion - Difco Laboratories*) com 20% de glicerol a -20° C. Cada espécie foi reativada em placas com ágar sangue e incubadas na câmara de anaerobiose, cujo tempo de crescimento foi de 72 horas para *Prevotella nigrescens* e *Porphyromonas gingivalis*, e de 24 horas para *Fusobacterium nucleatum* e *Enterococcus faecalis*.

Pastas Obturadoras utilizadas no estudo

Neste estudo foram utilizadas as pastas obturadoras comerciais Calen® e Ultracal® XS. A marca comercial, composição, fabricantes e especificação dos veículos contidos nas pastas obturadoras utilizadas nesta pesquisa estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Marca comercial, composição, veículos e fabricantes das pastas obturadoras estudadas.

Pasta obturadora	Composição	Veículo	Fabricante
Calen®	Hidróxido de cálcio (49,77%), óxido de zinco, colofônia e polietilenoglicol 400.	VISCOSO Polietilenoglicol 400 (PEG 400)	SS White® Ltda., Brasil
Ultracal® XS	Hidróxido de cálcio (35%) sulfato de bário (2%), água e metilcelulose.	AQUOSO Metilcelulose e água	Ultradent® Products, Inc., US

Preparo das pastas obturadoras

As pastas foram utilizadas tomando-se por base o peso obtido em balança eletrônica de precisão (*Bel Engineering Ltda, São Paulo, Brasil*). As pastas comerciais estavam dentro da validade e possuíam fabricação inferior a seis meses. Foram constituídos quatro grupos de acordo com a composição da pasta, pela adição de formocresol: 1. Calen; 2. Calen+iodofórmio; 3. Ultracal XS; 4. Ultracal XS+iodofórmio. Os grupos de pasta contendo iodofórmio foram preparados, sendo o iodofórmio e as pastas comerciais pesados em balança

eletrônica analítica (*Bel Engineering Ltda, São Paulo, Brasil*). O proporcionamento (HC/Iodofórmio) de cada pasta pode ser observado na Tabela 2.

Para o proporcionamento, o iodofórmio foi levado à balança de precisão e foram colocados 0,0625 g no microtubo *ependorf* de 2 ml com ajuda de uma espátula previamente esterilizada para Ultracal[®] XS + Iodofórmio e Calen[®] + Iodofórmio. Depois foram pesados e adicionados 0,0625 g das pastas comerciais em cada microtubo. Então, foram pesados 0,125 g de pasta Calen[®] e Ultracal[®] XS e colocadas em tubos *ependorfs* individuais. Em seguida foi acrescentado 0,375 ml de meio de cultura em cada microtubo e foram homogeneizados em *vórtex* por 180 segundos. Dessa forma, as pastas foram diluídas em uma concentração de 1:4 (peso/volume) em condições assépticas em meio BHM. O meio BHM foi utilizado para diluição das pastas sendo obtido a partir da adição de hemina e menadiona ao meio BHI (Figura 2). Depois de *vortexadas* foram iniciados os testes de CIM.

Tabela 2. Quantidade em gramas (g) de hidróxido de cálcio e iodofórmio em cada pasta a ser avaliada.

	Calen [®]	Calen [®] + Iodofórmio	Ultracal [®] XS	Ultracal [®] XS + Iodofórmio
Pasta comercial	0,125 g	0,0625 g	0,125 g	0,0625 g
Iodofórmio	-	0,0625 g	-	0,0625 g

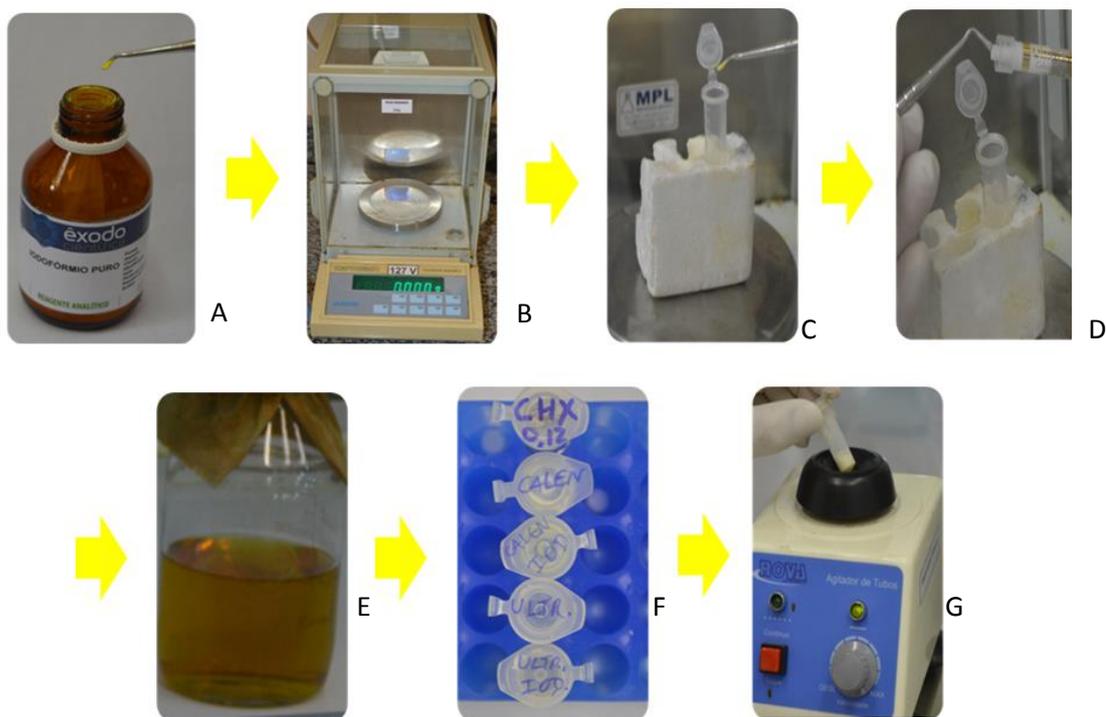


Figura 2 - Preparo das pastas a base de iodofórmio utilizadas no estudo. A- Iodofórmio; B- Balança de precisão utilizada para a pesagem do iodofórmio; C pesagem do iodofórmio ; D – pesagem da pasta a ser testada; E – adição do meio de cultura; F- grupos de pastas; G- homogeneização.

Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) das pastas obturadoras

As CIMs das pastas obturadoras Calen[®], Ultracal[®] XS, Calen[®] + iodofórmio e Ultracal[®] XS + iodofórmio foram determinadas de forma similar para as 4 espécies bacterianas, por meio da microdiluição em caldo. O sobrenadante contendo as substâncias solúveis e meio de cultura foram utilizados para diluição seriada por meio do método de microdiluição em placas de 96 poços.

Para o preparo do inóculo, as cepas dos microrganismos utilizados foram reativadas em ágar sangue. Colônias isoladas de cada cepa foram transferidas para o caldo de BHM (4 ml) e incubadas durante 24 horas na

câmara de anaerobiose Após o crescimento, as culturas de cada cepa foram ajustadas para absorbância a 550 nm. As culturas bacterianas foram então diluídas 1:20 em meio BHM esterilizado e volumes de 100 µL destas diluições transferidos para os poços de cada placa.

Para isto, 100 µL de solução de meio de cultura BHM foram distribuídos em todos os poços da placa, com auxílio de uma micropipeta multi-canal (8 canais). Em seguida, 100 µL da pasta a ser testada foram depositados em cada poço da coluna 1, onde foi homogeneizada por pipetagem, de forma suave e constante até que a diluição se realizasse por completo, sem gerar espuma. (Figura 2). Após o procedimento, cada poço continha 100 µL de meio de cultura mais 100 µL da pasta obturadora testada, totalizando um volume final de 200 µL.

Então, 100 µL do conteúdo de cada poço da coluna 1 foram transferidos para os poços da coluna seguinte. O processo foi repetido até a coluna 10, objetivando a diluição 1:2 nos poços de cada coluna subsequente, de modo a se obter uma concentração decrescente de cada pasta. Os 100 µL finais obtidos após a mistura da coluna 10 foram desprezados.

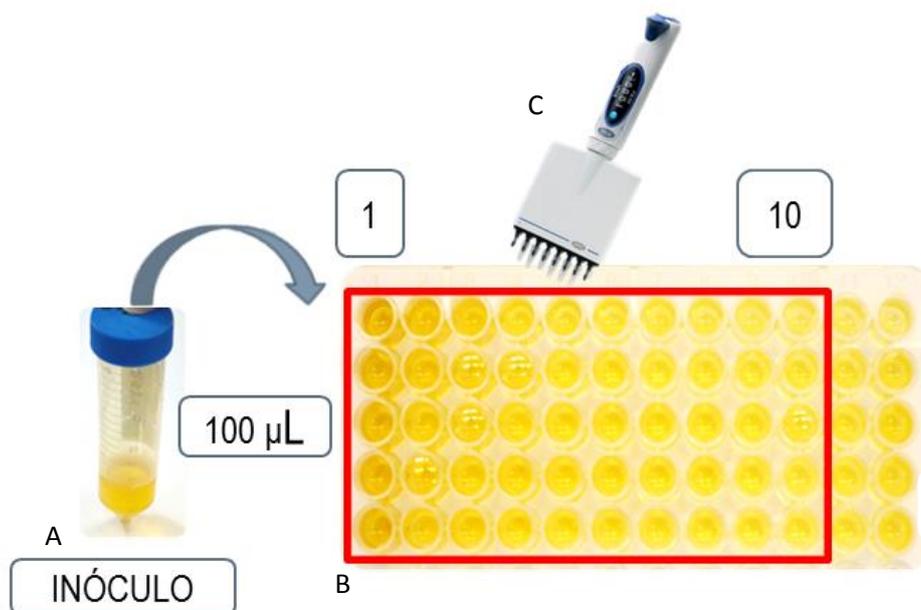


Figura 2 - Adição do inóculo bacteriano na coluna 1 até a coluna 10. A – inóculo; B – Placa com 96 poços; C – micropipeta multicanal (8 canais).

Como controle positivo do crescimento microbiano, a coluna 11 recebeu meio de cultura sem pastas obturadoras e a mesma quantidade de bactérias. Como controle negativo do ensaio, a coluna 12 continha 200 µL apenas de meio de cultura esterilizado, não devendo apresentar crescimento. Ensaio paralelos contendo a diluição das pastas sem inóculo bacteriano foram realizados e incubados nas mesmas condições, para comprovar a ausência de contaminação das pastas.

Como controle da reprodutibilidade dos ensaios e controle da inibição do crescimento, em todos os ensaios foi incluído o digluconato de clorexidina a 0,12% (*Sigma, Aldrich Química SA de CV, México*) e diluições seriadas.

As placas foram incubadas na câmara de anaerobiose durante 24 horas a 37°C. O crescimento microbiano foi determinado no poço onde houve turbidez. Foram definidas como CIM a mínima concentração de cada pasta capaz de inibir o crescimento detectável, por confirmação visual. Os testes foram realizados em triplicata. Após 24 horas de crescimento, a CIM foi considerada como a menor concentração das substâncias onde não houve crescimento bacteriano (turbidez).

Os ensaios de CIM e CBM foram realizados segundo as últimas recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI M07-A9, 9ª Ed. JAN/2012).

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Os poços incubados para determinação da CIM em meio líquido foram utilizados para determinação da CBM. Antes de começar o teste, foi misturado o conteúdo do poço da CIM com a pipeta, depois foram divididas as placas com meio ágar sangue sólido em 4 espaços, onde foi colocado uma alíquota de 25 µL em cada um deles correspondente ao conteúdo dos poços de CIM, CIM + 1, CIM - 1 e CIM - 2 das placas de CIM. Posteriormente, as placas com *Fusobacterium nucleatum* e *Enterococcus faecalis* foram incubadas na câmara de anaerobiose por 48 horas e para *Prevotella nigrescens* e *Porphyromonas gingivalis* foram de 96 horas a 37°C. Os testes de CBM foram realizados em triplicata. CBM foi considerada a menor concentração das substâncias onde não houvesse crescimento bacteriano sobre a superfície do ágar inoculado, e se houvesse crescimento, foi considerada como concentração bacteriostática e não bactericida.

Testes de difusão em ágar

Foram utilizadas 4 placas *Petri* com 20 ml de meio ágar sangue sólido e cada micro-organismo foi espalhado na superfície toda da placa 4 vezes usando um *swab* estéril submerso no inóculo de cada micro-organismo. Para o preparo do inóculo, as cepas foram preparadas usando o mesmo procedimento para fazer o inóculo dos ensaios de CIM. A placa foi dividida em 5 partes, uma para cada pasta testada e outra com digluconato de clorexidina a 0,12%. para o controle de inibição de crescimento e confirmar a validade do teste. Colocou-se em cada divisão um disco de papel filtro esterilizado previamente submerso em cada pasta e em clorexidina. As placas foram mantidas por 24 horas na câmara de anaerobiose a 37°C. A inibição do crescimento microbiano, quando presente, foi observada como um halo translúcido ao redor do disco, devendo ser medido.

Análise estatística

Os dados de CIM foram submetidos ao teste *Kruskall-Wallis* para comparação entre as pastas obturadas considerando cada micro-organismo separadamente ($\alpha=5\%$) (*Bioestat 5.3, Instituto Mamirauá, Belém, PA, Brasil*). Os dados referentes à CBM e difusão em ágar foram analisados de forma descritiva.

5 RESULTADOS

Na tabela 3 podem ser observados os resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima para as diferentes pastas obturadoras analisadas, frente aos microrganismos *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Enterococcus faecalis* e *Fusobacterium nucleatum*.

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) para as pastas obturadoras estudadas frente a *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Enterococcus faecalis*.

	Pastas obturadoras				p
	Calen®	Calen® + Iodofórmio	Ultracal® XS	Ultracal® XS+ Iodofórmio	
PN	0,0026 ± 0,0011	0,0020 ± 0,00	0,0039 ± 0,00	0,0033 ± 0,0011	p = 0,10
FN	0,00 ± 0,00	0,0033 ± 0,0011	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	p = 0,09
PG	0,0026 ± 0,0011	0,0020 ± 0,00	0,0026 ± 0,0011	0,0033 ± 0,0011	p = 0,43
EF	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	

PN=*Prevotella nigrescens*, FN=*Fusobacterium nucleatum*, PG=*Porphyromonas gingivalis*, EF= *Enterococcus faecalis*
 $p < 0,05$ = diferença significativa entre as pastas para cada cepa individualmente.

Não foram observadas diferenças significativas quanto a CIM para as pastas obturadoras avaliadas para cada micro-organismo ($p>0,05$) (Tabela 3). A clorexidina a 0,12% apresentou efeito inibitório contra todas as cepas utilizadas neste experimento.

Na tabela 4 podem ser observados os resultados da avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para as pastas utilizadas, frente os micro-organismos *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Enterococcus faecalis* e *Fusobacterium nucleatum*.

Tabela 4. Concentração Bactericida Mínima (CBM) para as pastas obturadoras estudadas frente aos micro-organismos *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Enterococcus faecalis*.

Micro-organismo	Pastas Obturadoras			
	Viscoso		Aquoso	
	Calen®	Calen® + iodofórmio	Ultracal® XS	Ultracal® XS + iodofórmio
PN	+	+	+	+
FN	-	+	-	-
PG	+	+	+	+
EF	-	-	-	-

PN=*Prevotella nigrescens*, FN=*Fusobacterium nucleatum*, PG=*Porphyromonas gingivalis*, EF=*Enterococcus faecalis*

+ = Presença de efeito bacteriostático

- = Ausência de efeito bacteriostático

Os ensaios de CBM demonstraram crescimento bacteriano evidenciando o efeito bacteriostático, mas não bactericida, de todas as pastas avaliadas para *Prevotella nigrescens* e *Porphyromonas gingivalis*. Além disso, para *Fusobacterium nucleatum* somente a pasta Calen® + iodofórmio mostrou efeito bacteriostático, e para o *Enterococcus faecalis* nenhuma pasta utilizada apresentou evidência de efeito antimicrobiano, ou seja, não apresentaram atividade bactericida e/ou bacteriostática (Tabela 4).

Os testes de difusão em ágar não mostraram efeito antimicrobiano para nenhuma espécie bacteriana. Halo inibitório somente foi observado para o grupo controle positivo (clorexidina a 0,12%).

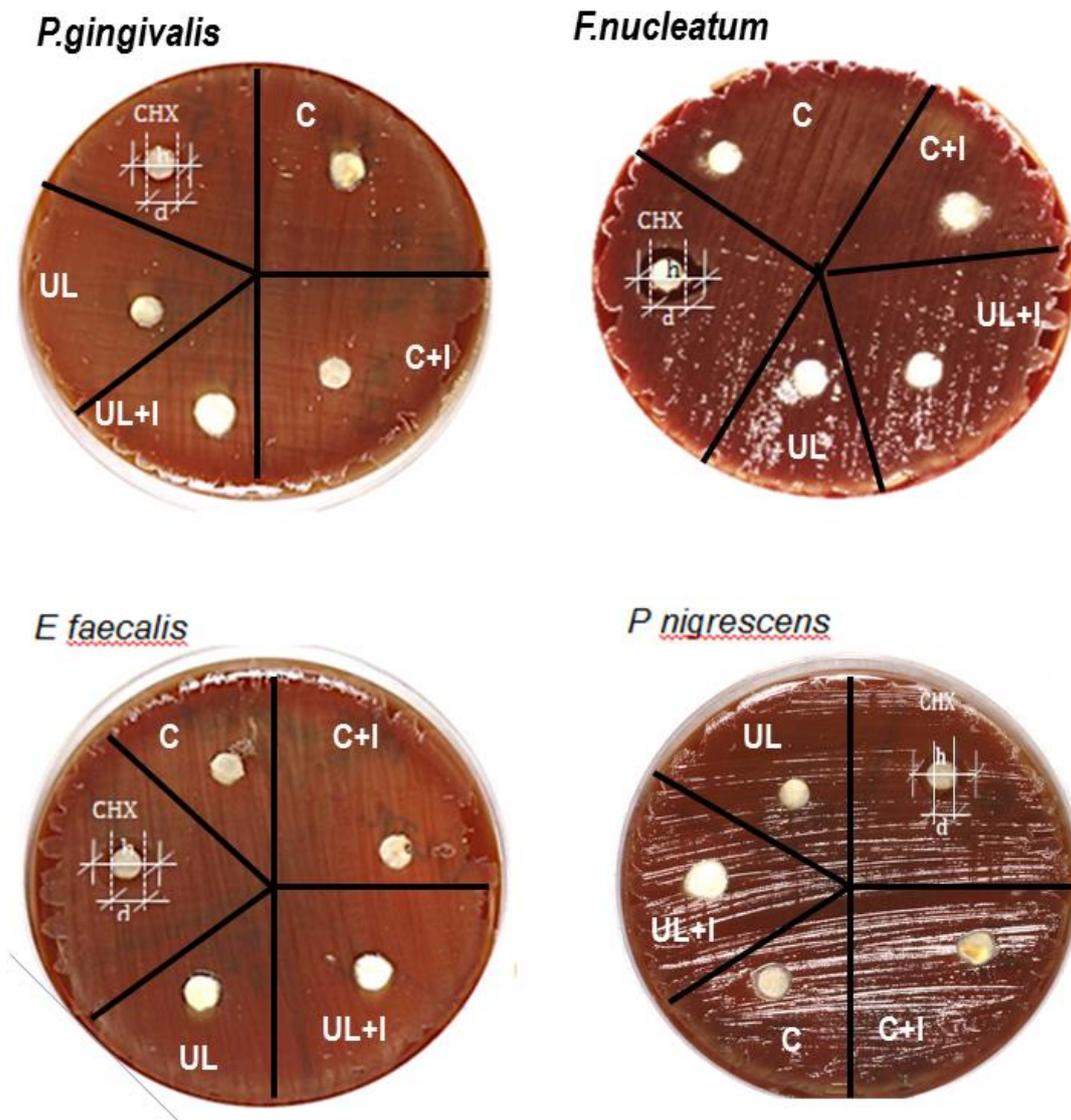


Figura 3 – Zonas de inibição apresentadas pelas diferentes pastas obturadoras contra os microrganismos estudados, nos testes de difusão em ágar - *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *E. faecalis* e *P. nigrescens*. CHX – clorexidina – controle do experimento; h – diâmetro do halo de inibição; d – diâmetro do disco contendo as pastas ou CHX. C - Calen®; C+I - Calen® + Iodofórmio; UL - Ultracal® XS; UL + I – Ultracal® XS + Iodofórmio. Discos contendo pasta não produziram halo de inibição para nenhuma das pastas analisadas contra os micro-organismos testados.

6 DISCUSSÃO

A hipótese de que pastas a base de HC com ou sem iodofórmio, em diferentes concentrações, com veículo aquoso apresentariam maior eficácia antimicrobiana que aquelas contendo veículo viscoso não foi provada. Não houve diferença entre as pastas, considerando-se os veículos presentes na composição das mesmas, frente aos micro-organismos testados.

Entretanto, os resultados de CIM do presente estudo evidenciaram a capacidade inibitória das pastas obturadoras e respectivas associações, frente aos micro-organismos *Prevotella nigrescens* e *Porphyromonas gingivalis*. Porém, frente ao *Enterococcus faecalis* as pastas não apresentaram efeito antimicrobiano, apresentando crescimento bacteriano em todas as diluições. Já em relação ao *Fusobacterium nucleatum*, somente a associação Calen® + iodofórmio mostrou ação inibitória. Resultados de CBMs mostraram crescimento microbiano nas placas de ágar evidenciando efeito bacteriostático, mas não bactericida para as pastas frente às cepas de *Prevotella nigrescens* e *Porphyromonas gingivalis*. Entretanto, da mesma forma que para os resultados da CIM, para *Fusobacterium nucleatum* somente Calen® + iodofórmio mostrou efeito bacteriostático. Para o *Enterococcus faecalis* todas as pastas não apresentaram evidência de atividade bactericida e/ou bacteriostática.

Assim, os resultados demonstraram que não houve influência do veículo contido nas pastas obturadoras sobre o efeito antimicrobiano. Independente do veículo presente na composição das pastas, estas apresentaram efeito antimicrobiano similar.

Excipientes são considerados, nos dias atuais, como constituintes essenciais, que garantem o desempenho do medicamento e otimizam a obtenção do efeito terapêutico. O veículo presente nas pastas obturadoras pode muitas vezes influenciar o efeito antibacteriano de um medicamento por meio da velocidade de dissociação iônica e reabsorção pelos tecidos periapicais. Deste modo, o veículo deveria permitir a liberação lenta de íons cálcio e hidroxila e difusão do medicamento nos tecidos. O presente estudo mostrou ação antibacteriana de pastas com veículo aquoso (metilcelulose e água) e viscoso (PEG 400), sem diferenças relevantes entre elas nos testes de

microdiluição e mostrou efeito bacteriostático, mas não bactericida, nos testes de CBM. Resultados similares foram observados por Siqueira e Uzeda (1997) e Gomes *et al.* (2002b), os quais utilizaram o método de difusão em ágar, semelhante a uma das metodologias empregadas no presente estudo. Isso pode ser explicado uma vez que o HC apresenta baixa solubilidade e não se difunde adequadamente, requerendo tempo maior para alcalinizar o meio de cultura (Siqueira e Uzeda, 1997).

Com relação aos micro-organismos estudados, as pastas avaliadas no presente estudo mostraram efeito bacteriostático contra *Porphyromonas gingivalis*. Esta inibição do crescimento pode ser comparada com resultados de estudos prévios, os quais avaliaram a capacidade antimicrobiana frente a este grupo de micro-organismos utilizando três pastas à base de HC (Barbosa *et al.*, 1997; Siqueira e Uzeda, 1997). Entretanto, resultado diferente foi observado por Sabrah *et al.* (2013), considerando que foram avaliadas CIM, por meio da diluição em caldo, e CBM para avaliar o efeito antimicrobiano da Ultracal® XS frente a *Porphyromonas gingivalis*. Esses autores observaram ausência de inibição de crescimento microbiano, estes resultados foram provavelmente devido a utilização de diferentes diluições entre os estudos, o que pode ter contribuído para observação de resultados distintos.

Considerando *Prevotella nigrescens*, as pastas avaliadas no presente estudo mostraram efeito bacteriostático. Resultados similares foram encontrados por Blanscet *et al.* (2008) quando foi testado o efeito antimicrobiano da Ultracal® XS, que apresentou as maiores zonas de inibição frente a *Prevotella nigrescens* quando comparada a outros materiais à base de HC. De Souza *et al.* (2005) também observaram diminuição significativa de crescimento bacteriano quando HC foi associado à solução salina frente a *Prevotella nigrescens*. Assim, o efeito bacteriostático do HC, no presente estudo foi provavelmente devido à liberação e difusão de íons hidroxila, produzindo um meio altamente alcalino, que poderia causar dano citoplasmático, desnaturação de proteínas e danos ao DNA do micro-organismo (Fava e Saunders, 1999).

Neste estudo, somente Calen® + iodofórmio apresentou efeito bacteriostático contra *Fusobacterium nucleatum*. Resultados similares foram

observados na literatura (Barbosa *et al.*,1997; Siqueira e Uzeda,1997), os quais evidenciaram atividade antimicrobiana do HC + paramonoclorofenol frente ao *Fusobacterium nucleatum*, mas ausência de inibição com HC + glicerina e água. De Souza *et al.* (2005) observaram uma diminuição significativa do *Fusobacterium nucleatum* pela associação do HC + solução salina. No presente estudo, o efeito bacteriostático do Calen[®] + iodofórmio em comparação com a pasta Calen[®] sem iodofórmio frente a *Fusobacterium nucleatum* foi provavelmente devido a adição de iodofórmio que é uma substância antibacteriana usada como antisséptico em infecções endodônticas, pela liberação de iodo. Por outro lado, o efeito inibitório do Calen[®] + iodofórmio em comparação com o Ultracal[®] XS e a Ultracal[®] XS + Iodofórmio, pode ser atribuído a maior concentração de HC contido na pasta Calen[®] + iodofórmio (49,77% frente a 35% do Ultracal[®] XS).

Esta diminuição da capacidade inibitória pode ser devido à combinação de substâncias que podem comprometer a própria capacidade antibacteriana. Nesse sentido, o uso do iodofórmio como antimicrobiano endodôntico é controverso, segundo Seow (1990) observa-se certa perda da capacidade antibacteriana do iodofórmio quando associado ao HC, provavelmente pelas propriedades farmacológicas do HC associadas ao iodofórmio.

Apesar disso, por anos, pastas iodoformadas vem sendo indicadas como antibacterianas pela liberação de iodo. Esta forte propriedade antimicrobiana foi demonstrada em vários estudos (Tchaou *et al.*,1996; Nurko *et al.*,2000; Cwikla, 2005; Trairatvorakul *et al.*, 2008). Entretanto, outros estudos apresentaram nulo ou pouco efeito antibacteriano de pastas obturadoras a base de HC associadas ao iodofórmio (Estrela *et al.*, 2006; Blanscet *et al.*, 2008; Hedge *et al.*, 2012).

No presente estudo, nenhuma das pastas avaliadas apresentou atividade bacteriostática ou bactericida para *Enterococcus faecalis*. Outros estudos também mostraram resultados similares (Barbosa *et al.*,1997; Siqueira e Uzeda, 1997; Gomes *et al.*, 2002a). A atividade inibitória da Calen[®] frente ao *Enterococcus faecalis* foi observada em diferentes ensaios, desde pequenos halos inibitórios em placas de difusão em ágar (Leonardo *et al.*, 2000) até redução absoluta dos micro-organismos (Lima *et al.*, 2013). Entretanto, no estudo de Lima *et al.* (2013) foi observado aumento da quantidade do

Enterococcus faecalis, depois de 7 dias de exposição das cepas às pastas com HC. Por outro lado, Queiroz *et al.* (2009) observaram que o melhor efeito antimicrobiano contra o *Enterococcus faecalis* foi da pasta Calen[®] e Calen[®] + óxido de zinco, sem diferença significativa entre elas. Ultracal[®]XS mostrou o menor efeito antibacteriano, quando comparada com pastas antibióticas (Vitapex[®] e Clorexidina a 2%) contra o *Enterococcus faecalis* em testes de disco difusão em ágar (Pavaskar *et al.*, 2014).

A ausência da inibição do *Enterococcus faecalis* nos testes de microdiluição pode ser devida à sobrevivência da espécie em meio alcalino pela capacidade da bomba de prótons de manter o controle, mantendo a homeostase da membrana celular e do pH interno do micro-organismo (Siqueira e Lopes, 1999). Os resultados do presente estudo sugerem que se o *Enterococcus faecalis* não foi eliminado quando em contato direto com o HC nas placas de microdiluição *in vitro*, é provável que clinicamente também não seja eliminado, devido ao fato que o pH dentro dos túbulos dentinários vai diminuir devido ao efeito tampão da dentina (Cwikla *et al.*, 2005).

Alguns estudos avaliaram a capacidade antimicrobiana das pastas intracanal a base de HC e iodofórmio por meio de testes de difusão em ágar (Estrela *et al.*, 2006; Priya *et al.*, 2010), porém, a interpretação de resultados nestes testes está baseada na suposição que as substâncias antibióticas difundem-se livremente em um meio sólido e em muitos casos esta suposição não é precisa, o que nos leva a uma avaliação imprecisa da susceptibilidade bacteriana aos antibióticos. Estes testes de difusão em ágar tem fatores que afetam a precisão do mesmo como o tempo de armazenamento das placas com meio, temperatura, espessura e uniformidade do ágar e pontos de interrupção nas zonas de inibição (Siqueira e Uzeda, 1997; Leonardo *et al.*, 2000; Pavaskar *et al.*, 2014).

Dessa forma, neste trabalho optou-se pela determinação de CIM, por meio de testes de microdiluição, que apresentam maior sensibilidade que os testes de difusão em ágar, para determinar a concentração mínima de um agente, capaz de impedir o crescimento bacteriano e de CBM, evidenciando a capacidade de eliminar as bactérias, com resultados mais precisos da atividade antibacteriana de medicações. Os testes de difusão em ágar no presente

estudo não mostraram efeito antimicrobiano para nenhuma espécie bacteriana, mas, observou-se diferença dos testes de microdiluição com as mesmas pastas e micro-organismos, que sugerem que a precisão dos testes de difusão em ágar pode ser afetada pelos fatores acima relatados. Halo inibitório só foi evidenciado no grupo controle (clorexidina a 0,12%) para as quatro cepas bacterianas, mostrando assim a fidelidade de nossos testes.

As indicações dos materiais obturadores comerciais de canais radiculares à base de HC não são claras quanto ao efeito antibacteriano. É comum na literatura encontrar descrições como antimicrobiano ou antibacteriano sem conhecer o nível do efeito antimicrobiano destas pastas obturadoras. Para Pavaskar *et al.* (2014), os testes de difusão em ágar não diferenciam as propriedades bacteriostáticas ou bactericidas de medicamentos de uso odontológico, nem fornece dados sobre viabilidade microbiana. No presente estudo, observou-se que as pastas avaliadas apresentaram efeito bacteriostático e não bactericida nas doses apresentadas pelo produto comercial nos testes de CBM. Na literatura pesquisada não foram encontrados dados sobre a capacidade bacteriostática, bactericida ou dose dependente da pasta Calen[®] ou Ultracal[®] XS, sugerindo que novos estudos devem ser conduzidos.

7 CONCLUSÃO

1 Não foram observadas diferenças relevantes entre as pastas estudadas quanto à capacidade antimicrobiana e os veículos presentes não influenciaram a capacidade antimicrobiana das pastas estudadas.

2 As pastas apresentaram capacidade bacteriostática e não bactericida frente a *Prevotella nigrescens* e *Porphyromonas gingivalis*, só Calen® + iodofórmio apresentou capacidade bacteriostática frente ao *Fusobacterium nucleatum* e nenhuma delas apresentou efeito antimicrobiano frente ao *Enterococcus faecalis*.

REFERÊNCIAS

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 May; 23(5):297-300.

Barja-Fidalgo F, Moutinho-Ribeiro M, Oliveira M, de Oliveira B. A systematic review of root canal filling materials for deciduous teeth: is there an alternative for zinc oxide-eugenol? *ISRN Dent.* 2011;367318.

Blanscet ML, Tordik PA, Goodell GG. An agar diffusion comparison of the antimicrobial effect of calcium hydroxide at five different concentrations with three different vehicles. *J Endod.* 2008; 34(10):1246-1248.

Brook I. Microbiology and management of endodontic infections in children. *J Clin Pediatr Dent.* 2003 Fall; 28(1):13-7.

Brook I. Microbiology of intracranial abscesses associated with sinusitis of odontogenic origin. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2006 Dec; 115(12):917-20.

Clifton T. A case of odontogenic brain abscess arising from covert dental sepsis. *Ann R Coll Surg Engl.* 2012 Jan; 94(1):e41-3.

Cwikla S, Bélanger M, Giguère S, Progulske-Fox A, Vertucci F. Dentinal tubule disinfection using three calcium hydroxide formulations. *J Endod.* 2005; 31(1):50-2.

De Souza C, Teles R, Souto R, Chaves M, Colombo A. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiologic evaluation by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. *J Endod.* 2005; 31(2):79-83.

Estrela C, Estrela C, Hollanda A, Decurcio D. Influence of iodoform on antimicrobial potential of calcium hydroxide. *J Appl Oral Sci.* 2006; 14(1):33-7.

Fava LR, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: Classification and clinical indications. *Int Endod J.* 1999; 32: 257-82.

Finucane D. Rationale for restoration of carious primary teeth: a review. *J Irish Dent Assoc.* 2012; 58(1):31-42.

Gomes B, Ferraz C, Garrido F, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *J Endod.* 2002a; 28(11):758-61.

Gomes B, Ferraz C, Garrido F, Rosalen P, Zaia A, Teixeira F, de Souza-Filho F. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *J Endod.* 2002b. 28(11):758-61.

Gomes B, Pinheiro E, Gadê-Neto C, Sousa E, Ferraz C, Zaia A, Teixeira F, Souza-Filho F. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19(2):71-6.

Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J.* 2013; 24(2):89-102.

Hedge S, Arun Kumar MS, Shetty DG. Evaluation of the efficacy of a 5% calcium sodium phosphosilicate (Novamin) containing dentifrice for the relief of dentinal hypersensitivity: a clinical study. *Indian J DentRes.* 2012; 23(3):363-7.

Laing E, Ashley P, Naini F, Gill D. Space maintenance. *Int J Paediatr Dent.* 2009 May; 19(3):155-62.

Leonardo M, Leal J, Esberard R, Lia R. Tratamiento de conductos radiculares de dientes com rizogenesis incompleta. Estudio clínico, radiográfico e histológico. *Revista de la Asociación Odontológica Argentina.* 1978; 66: 85-90.

Leonardo MR, da Silva LA, Tanomaru Filho M, Bonifácio KC, Ito IY. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *J Endod.* 2000; 26(7):391-394.

Lopes HP, de Uzeda M. Recontamination of coronally unsealed root canals medicated with camphorated paramonochlorophenol or calcium hydroxide pastes after saliva challenge. *J Endod.* 1998; 24(1):11-4.

Maisto O, Capurro M. Obturación de conductos radiculares con hidróxido de calcio-iodoformo. *Rev Ass Odontol Argentina*. 1964; 52:167-73.

Maisto O, Erausquin J. Reacción de los tejidos periapicales del molar de la rata a las pastas de obturación, reabsorbibles. *Rev Ass Odontol Argentina*, 1965; 53:12-20.

Mohammadi Z, Karim Soltani M, Shalavi S, Yazdizadeh M. Calcium hydroxide-based root canal sealers: an updated literature review. *Compend Contin Educ Dent*. 2014; 35(5):334-339.

Mortazavi M, Mesbahi M. Comparison of zinc oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. *Int J Paediatr Dent*. 2004; 14: 417–424.

Nurko C, Ranly D, García-Godoy F, Lakshmyya K. Resorption of a calcium hydroxide/iodoform paste (Vitapex®) in root canal therapy for primary teeth: a case report. *Pediatr Dent*. 2000; 22(6):517-20.

Pavaskar R, Chalakkal P, Krishnan R, Sirikonda S, Vasepalli M, Venkataramana P. Study comparing the effectiveness of chlorhexidine, calcium hydroxide and linezolid based medicaments against enterococcus faecalis. *J Clin Diagn Res*. 2014; 8(3):240-242.

Priya M, Sham S, Bhat S, Sundeeep Hegde K. Comparative Evaluation of Bactericidal Potential of Four Root Canal Filling Materials against Microflora of Infected Non -Vital Primary Teeth. *J Clin Pediatr Dent* 2010; 35(1): 23–30.

Queiroz A, Nelson-Filho P, Silva L, Assed S, Silva R, Ito I. Antibacterial activity of root canal filling materials for primary teeth: zinc oxide and eugenol cement, Calen paste thickened with zinc oxide, Sealapex and EndoRez. *Braz Dent J*, 2009; 20(4):290-6.

Robert G, Liewehr F, Buxton T, McPherson J. Apical diffusion of calcium hydroxide in an in vitro model. *J Endod*. 2005 Jan; 31(1):57-60.

Sabrah AH, Yassen GH, Gregory RL. Effectiveness of antibiotic medicaments against biofilm formation of *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Endod*. 2013; 39(11):1385-1389.

Schuman NJ, Turner JE. Brain abscess and dentistry: a review of the literature. *Quintessence Int.* 1994; 2(6):411-3.

Seow WK. The effects of dyadic combinations of endodontic medicaments on microbial growth inhibition. *Pediatr Dent.* 1990; 12(5):292-7.

Shinzato T. Effects and management of odontogenic infections on pulmonary infections. *Journal of pharmaceutical society of Japan.* 2009; 129(12):1461-1464.

Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999; 32(5):361-9.

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.

Tchaou W, Turng B, Minah G, Coll J. Inhibition of pure cultures of oral bacteria by root canal filling materials. *Pediatr Dent.* 1996; 18(7):444-449.

Trairatvorakul C, Chunlasikaiwan S. Success of pulpectomy with zinc oxide-eugenol vs calcium hydroxide/iodoform paste in primary molars: a clinical study. *Pediatr Dent.* 2008; 30(4):303-8.

Triches T, De Figueiredo L, Feres M, De Freitas S, Zimmermann G, Cordeiro M. Microbial profile of root canals of primary teeth with pulp necrosis and periradicular lesion. *J Dent Child.* 2014; 81(1):14-9.

Van Velzen S, Abraham-Inpijn L, Moorer W. Plaque and systemic disease: a reappraisal of the focal infection concept. *J Clin Periodontol.* 1984 Apr; 11(4):209-20.

