

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**

CAROLINA ANDOLFATTO

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA DE CURATIVOS DE
DEMORA À BASE DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO USADOS EM ENDODONTIA**



ARARAQUARA

2011

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**

CAROLINA ANDOLFATTO

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA DE CURATIVOS DE
DEMORA À BASE DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO USADOS EM ENDODONTIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Professor Doutor Idomeo Bonetti Filho

Co-Orientador: Professor Doutor Paulo Sérgio Cerri

ARARAQUARA

2011

CAROLINA ANDOLFATTO

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA DE CURATIVOS DE
DEMORA À BASE DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO USADOS EM ENDODONTIA**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Professor Doutor Idomeo Bonetti Filho

2º Examinador: Professora Doutora Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

3º Examinador: Professora Doutora Yara Teresinha Corrêa Silva Sousa

Araraquara, 30 de março de 2011

DADOS CURRICULARES

CAROLINA ANDOLFATTO

NASCIMENTO	06.02.1986 – Bariri/SP
FILIAÇÃO	Rubens Pierre Andolfatto Maria Cleusa Mazotti Andolfatto
2004 – 2007	Curso de Graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia de Araraquara– UNESP
2007-2008	Curso de Aperfeiçoamento em Endodontia na Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP
2008-2010	Curso de Especialização em Endodontia na Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP
2009-2011	Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP, Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr-UNESP)

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo dom da vida e por me manter forte durante toda esta caminhada.

Aos meus pais Cleusa e Rubens, pelo o amor incondicional e também pelo incentivo me dado todos os dias.

Ao meu irmão Júnior, pelos conselhos e pela amizade.

Ao meu namorado Arthur, pelo amor e pela paciência que teve comigo durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Professor Doutor Idomeo Bonetti Filho, pelos ensinamentos e por contribuir para minha formação profissional, e Professor Doutor Paulo Sérgio Cerri, pelo empenho e dedicação na realização deste trabalho, principalmente na parte histológica.

Ao Professor Doutor Mário Tanomaru Filho e a Professora Doutora Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, pois sem eles seria impossível o término desta. Obrigado pela paciência e orientação, de maneira especial a Juliane, que despertou em mim um interesse ainda maior pela carreira acadêmica e me ensinou a gostar de microbiologia, além da amizade e carinho depositados na minha pessoa.

Aos demais professores, Professor Doutor Fábio Luis Camargo Villela Bebert, Professor Doutor Renato Toledo Leonardo, Professora Doutora Gisele Faria e Professor Doutor Carlos Milton Kuga, pela convivência agradável e pela contribuição na minha formação profissional durante aulas e clínicas.

Aos colegas de pós-graduação, nível Mestrado e nível Doutorado, pela amizade, pelos encontros festivos, pela ajuda e pelo companheirismo durante esta caminhada. De maneira especial a Ana Lívia, ao Guilherme e a Raqueli que me ajudaram diretamente na confecção desta.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora e da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara-

UNESP, principalmente a Senhora Mara Cândida Munhoz do Amaral, sempre atenciosos e solícitos.

A CAPES pela ajuda financeira durante estes 24 meses.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	10
INTRODUÇÃO.....	13
PROPOSIÇÃO.....	19
CAPÍTULO 1.....	21
CAPÍTULO 2.....	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO.....	84

RESUMO

Andolfatto C. Avaliação histológica e microbiológica de curativos de demora à base de hidróxido de cálcio usados em endodontia [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar a biocompatibilidade, a atividade antimicrobiana e o pH de curativos de demora à base de hidróxido de cálcio usados em endodontia. A análise da biocompatibilidade foi realizada no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Nesta metodologia, três medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio Calen, UltraCal XS e Hydropast após serem colocadas separadamente em tubos de silicone, foram inseridos no subcutâneo de ratos. Os 48 ratos (*Rattus Norvegicus Holtzman*) foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: Grupo Calen (GC), Grupo UltraCal XS (GU) e grupo Hydropast (GH). Após os períodos de 7 e 30 dias estes animais foram mortos, as peças obtidas processadas e realizada análise morfológica e morfométrica. No teste de difusão em ágar com a confecção de poços, cinco curativos de demora, Calen, Calen PMCC, Hydropast, Hydropasi+I e UtraCal XS foram expostos aos microrganismos *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29122), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Candida albicans* (ATCC 10231) para avaliar o poder antimicrobiano destas pastas. E, por fim, a análise do pH foi realizada preenchendo tubos de polivinil (PVC), 10 para cada curativo de demora, Calen, Calen PMCC, Hydropast, Hydropast+I e UltraCal XS. Em seguida, foram mergulhados em frascos plásticos contendo 10 ml de água deionizada, cujo pH foi aferido previamente. Os frascos foram fechados e mantidos em uma estufa a 37°C. Após 12, 24, 48 e 72 horas, o pH das soluções contidas nos frascos plásticos foi medido com auxílio do peagâmetro DMPH-2. De acordo com as

metodologias empregadas, os resultados obtidos no teste de biocompatibilidade, por meio de análises morfológicas e morfométricas mostraram, inicialmente, severa resposta inflamatória nos tecidos que entraram em contato direto com os materiais. A severidade diminuiu com o passar do tempo, destacando a presença de fibroblastos em meio aos feixes de fibras colágenas. Nos três grupos houve redução do número de células gigantes multinucleadas do período de 7 dias para 30 dias. No teste de difusão em ágar, os resultados mostraram que todos os curativos de demora testados possuem efeito antimicrobiano contra os microrganismos utilizados, exceto o Hydropast+I que não apresentou ação sobre o *Enterococcus faecalis*. Por fim, na avaliação do pH, os resultados mostraram que o pH de todas as pastas à base de hidróxido de cálcio são elevados nos diferentes períodos experimentais, menos o pH do Hydropast+I. De acordo com as metodologias empregadas podemos concluir que tanto a pasta Calen quanto a UltraCal XS e a Hydropast apresentaram-se biocompatíveis ao tecido conjuntivo subcutâneo de ratos e que as pastas Calen, Calen PMCC, Hydropast, Hydropast+I e UltraCal XS possuem atividade antimicrobiana sobre as cepas testadas e elevados valores de pH. No entanto, o Hydropast+I não possui efeito antimicrobiano sobre o *Enterococcus faecalis* e apresenta os menores valores de pH.

Palavras-chave: Endodontia; *Enterococcus faecalis*; hidróxido de cálcio; histologia; microbiologia.

ABSTRACT

Andolfatto C. Histological and microbiological evaluation of calcium hydroxide-based intracanal dressing used in endodontics [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP; 2011.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the biocompatibility, the antibacterial activity and the pH of intracanal medicaments based on calcium hydroxide used in endodontics. The analysis of the biocompatibility was performed in the subcutaneous tissue of rats. In the methodology, three intracanal medications to the base of calcium hydroxide: Calen, UltraCal XS and Hydropast were placed in separate silicone tubes and then inserted into the subcutaneous tissue of rats. The 48 rats (*Rattus Norvegicus* Holtzman) were randomly and equally distributed into three groups as follows: Calen group (CG), UltraCal XS group (UG) and Hydropast group (HG). After periods of 7 and 30 days these animals were dead and the specimens were processed and in the end the morphological and morphometric analysis were done. In the agar diffusion method with the construction of wells, five intracanal medicaments (Calen, Calen PMCC, Hydropast, Hidropast + I and UltraCal XS) were exposed to the microorganisms: *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29122), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Candida albicans* (ATCC 10231) to evaluate the antimicrobial power of these pastes. And finally, the pH analysis was performed by filling tubes of polyvinyl (PVC), 10 for each intracanal medication with Calen, Calen PMCC, Hydropast, Hydropast + I and UltraCal XS. Were then immersed in plastic vials containing 10 ml of deionized water, whose pH was previously measured. The vials were sealed and kept in an incubator at 37°C. After 12, 24, 48 and 72 hours, the pH of the solutions contained in plastic bottles

was measured on the pH meter DMPH-2. According to the methodologies employed, the biocompatibility tests results by morphometrical and morphological analysis, initially, showed a severe inflammatory response in tissues that come into direct contact with the three materials. The severity decreased over time, highlighting the presence of fibroblasts among the collagen fibers. All three groups showed a reduction in the number of multinucleated giant cells from 7 to 30 days. In the agar diffusion test, the results showed that all tested intracanal medications have antimicrobial effect against the tested microorganisms, except that Hydropast + I had no effect on *Enterococcus faecalis*. Finally, in the pH evaluation, the results showed that over time, the pH of all pastes of calcium hydroxide increased the pH of less Hydropast + I. According to the methodologies we can conclude that the pastes Calen, UltraCal XS and Hydropast are themselves biocompatible to the subcutaneous tissue of rats. We can also conclude that the pastes Calen, Calen PMCC, Hydropast, Hydropast + I and UltraCal XS have antimicrobial activity against the tested strains and high pH values. However, the Hydropast + I do not have antimicrobial effect on *Enterococcus faecalis* and presents the lower pH values.

Keywords: Endodontics; *Enterococcus faecalis*; calcium hydroxide; histology; microbiology.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O hidróxido de cálcio tem sido estudado por muitos anos como medicação intracanal. Herman²¹ (1920), sugeriu o hidróxido de cálcio para o tratamento da polpa dentária. Desde a sua introdução, o hidróxido de cálcio tem sido o material mais recomendado, por inúmeros autores^{7,8,12,13,14,23,29,44,46,47,49}, como medicação intracanal em dentes despolpados.

Segundo Leonardo²⁷ (2009), a preocupação da endodontia atual, passou a ser a busca de substâncias que, utilizadas topicamente entre sessões como “curativo de demora”, reúnam propriedades antibacterianas, atuando sobre as endotoxinas, propriedades antiinflamatórias e indutoras de tecido mineralizado, de tal forma que a interrelação destas propriedades proporcione, ao medicamento, um efeito benéfico sobre os tecidos vivos da região periapical. Dentre estas substâncias destaca-se o hidróxido de cálcio.

O hidróxido de cálcio apresenta propriedades bastante interessantes como, por exemplo, sua comprovada ação antimicrobiana, sendo, portanto, indicado em casos de necropulpectomias³¹, a biocompatibilidade³⁵, a capacidade de estimular a cicatrização dos tecidos periapicais²⁸, a atividade anti-exudativa¹, a propriedade de dissolução dos tecidos necróticos¹⁹, a capacidade de estimular a mineralização¹⁵, manter a vitalidade do coto pulpar e também diminuir a inflamação no caso do biopulpectomias²⁷.

Byström et al.^{4,5,6,7} (1981, 1983, 1985, 1985) e Yared et al.⁵⁰ (1994) mostraram em seus estudos que a eficácia de medidas como limpeza mecânica, irrigação/sucção com soluções bactericidas e oxidantes enérgicas e a colocação tópica de curativo entre as sessões, reduzem, significativamente, o número de bactérias no interior dos canais radiculares.

Estes estudos mostraram, também, que as bactérias remanescentes crescem e, rapidamente, aumentam em número, no intervalo entre sessões, quando nenhum curativo antibacteriano é colocado no canal radicular de dentes despolpados com reação periapical crônica.

A atividade antibacteriana do hidróxido de cálcio está relacionada à liberação de íons hidroxila, oriundos de sua dissociação. Os íons hidroxila são radicais livres altamente oxidantes que apresentam extrema reatividade, ligando-se a biomoléculas próximas ao seu local de formação, como, por exemplo, na parede celular bacteriana, alterando o formato desta e, portanto, o transporte químico através dela, não permitindo, desta forma, a sobrevivência do microrganismo, além de tornar o meio alcalino, o qual não propicia a proliferação bacteriana^{49,29,25}.

O hidróxido de cálcio também medeia a neutralização do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS)^{44,45,48}, presente na parede celular bacteriana, liberado durante a multiplicação ou morte celular de microrganismos Gram-negativos^{33,3}. O LPS estimula macrófagos que ativam citocinas, como o fator de necrose tumoral^{33,3} e a interleucinas 1, 6 e 8³², responsáveis por iniciar e manter o processo da resposta inflamatória e a reabsorção óssea periradicular^{11,40,42}. No entanto, o hidróxido de cálcio intracanal é capaz de inativar os efeitos induzidos por esta endotoxina⁴⁸, pois hidrolisa o lípide A que é a parte tóxica da endotoxina LPS e neutraliza os efeitos tóxicos residuais decorrentes desta lise celular^{43,44,37,3}.

Os medicamentos aplicados em toda extensão do canal radicular funcionam como uma barreira física impedindo o suprimento de substrato e ocupando espaços, a fim de limitar a multiplicação microbiana. As pastas de

hidróxido de cálcio funcionam como uma barreira físico-química, retardando significativamente a recontaminação do canal, quando da exposição à saliva por perda do selador coronário⁹.

Estas pastas à base de hidróxido de cálcio em suas diferentes formulações apresentam-se biocompatíveis, com resposta tecidual semelhante. No início, causam uma resposta inflamatória intensa, porém a gravidade e a longevidade desta resposta, dependendo da composição da pasta, regridem com o passar do tempo levando ao reparo tecidual³⁶.

A biocompatibilidade do hidróxido de cálcio ocorre quando termina o processo inflamatório, ou seja, quando tecido conjuntivo entra em contato com esta medicação intracanal, o seu pH elevado ocasiona um processo de necrose tecidual, fazendo que ocorra migração das células inflamatórias para o local e em seguida, o processo de reparo²².

Estudos demonstram que o hidróxido de cálcio também tem a propriedade de estimular o reparo. Murakami et al.³⁴ (1997) relataram que o hidróxido de cálcio promoveu o aumento na síntese de colágeno e de proteínas, após sua incorporação em esferas de PMMA (polimetilmetacrilato), durante a osteogênese.

O hidróxido de cálcio P.A. apresenta uma alcalinidade forte, que tem um pH de cerca de 12,5. Por ser um pó, este precisa se associar a diferentes substâncias para poder ser utilizado na prática clínica, assim, estas inúmeras pastas à base de hidróxido de cálcio revelam comportamentos físico-químicos particulares - tensão superficial, radiopacidade, escoamento, viscosidade, solubilidade, dissociação e difusão^{24,39}, sem perder a sua biocompatibilidade aos tecidos periapicais.

A dissociação iônica do hidróxido de cálcio em íons cálcio e hidroxila e seu efeito sobre bactérias e reparo de tecido fazem com que seu uso seja um sucesso. O mecanismo de ação do hidróxido de cálcio é diretamente influenciado pelo seu alto pH. Esta medicação intracanal realiza a ativação de enzimas teciduais, partindo da fosfatase alcalina e também a inativação de enzimas da membrana citoplásmica de bactérias. Estes dois efeitos enzimáticos de mineralização favorecem o processo de reparo do tecido e a ação bacteriológica que altera a integridade de sítios do metabolismo bacteriano, do crescimento e divisão celular, conferindo ao hidróxido de cálcio um importante lugar entre as medicações intracanal¹⁴.

Embora o hidróxido de cálcio seja efetivo na eliminação de muitos tipos de bactérias, estudos têm mostrado que o *Enterococcus faecalis*^{20,38} apresenta-se resistente a esta medicação intracanal. Assim, nos últimos anos, várias pastas à base de hidróxido de cálcio surgem rotineiramente no mercado associadas a novas substâncias que tem como o intuito de melhorar suas propriedades físico-químicas como penetrabilidade, radiopacidade, viscosidade, capacidade de difusão, velocidade de dissociação iônica entre outras e biológicas como o aumento do poder antimicrobiano².

Segundo seu fabricante (Ultradent Products, INC.), a pasta UltraCal XS, chega ao mercado com o propósito de penetrar mais facilmente e de preencher meticulosamente o canal radicular, além de ser mais fácil de ser usada clinicamente, já que vem pronta em uma seringa passando facilmente pela agulha durante o seu uso.

A pasta Hydropast também se apresenta na forma de seringa e agulha e segundo seu fabricante (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda.,

Indústria Brasileira), a utilização do sulfato de bário como radiopacificador melhora as suas propriedades físico-químicas. A outra pasta da Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Indústria Brasileira, a Hydropast + I, contém iodofórmio na sua composição tendo como objetivo aumentar o espectro antimicrobiano. Conforme os idealizadores deste novo produto, o iodofórmio oferece maior poder antimicrobiano que o paramonoclorofenol canforado, utilizado na pasta Calen PMCC (SS White Artigos Dentários Ltda., Indústria Brasileira), indicado nos casos de dentes com lesão periapical.

Assim, frente a estas novas pastas à base de hidróxido de cálcio, parece-nos oportuno o estudo da biocompatibilidade das pastas Calen, UltraCal XS e Hydropast e o estudo do efeito antimicrobiano como também a avaliação do pH das medicações intracanal Calen, Calen PMCC, Hydropast, Hydropast +I e UltraCal XS.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1- Avaliar, in vivo, o comportamento biológico das pastas à base de hidróxido de cálcio Calen (SS White Artigos Dentários Ltda., Indústria Brasileira), UltraCal XS (Ultradent Products, INC.) e Hydropast (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Indústria Brasileira) no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos.

- 2- Avaliar, in vitro, a atividade antimicrobiana das pastas à base de hidróxido de cálcio: Calen, Calen PMCC, Hydropast, Hydropast+I e UltraCal XS sobre os microrganismos *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* pelo teste de difusão em ágar e também a avaliação do pH destas pastas.

AVALIAÇÃO DA REAÇÃO HISTOLÓGICA
PROVOCADA POR DIFERENTES CURATIVOS
DE DEMORA À BASE DE HIDRÓXIDO DE
CÁLCIO EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE
RATOS*

CAPÍTULO 1

*Artigo a ser submetido para publicação no periódico Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology,

Oral Radiology and Endodontics

RESUMO

Objetivo: Avaliar a resposta biológica do tecido subcutâneo de ratos provocada pelos curativos de demora à base de hidróxido de cálcio: Calen, UltraCal XS e Hydropast. **Desenho do estudo:** Foram utilizados no total 48 ratos (*Rattus Norvegicus Holtzman*) com peso, aproximado de 250 g, que receberam ração e água *ad libitum*. Os ratos foram distribuídos eqüitativamente e aleatoriamente em três grupos assim constituídos: Grupo Calen (GC), Grupo UltraCal XS (GU) e Grupo Hydropast (GH). Após a anestesia, por via intraperitoneal, realizaram-se a tricotomia e a desinfecção da pele dorsal com 10% de solução de iodo-povidona. Um corte de aproximadamente 2 cm de comprimento foi realizada na pele com uma tesoura; procedeu-se então a divulsão do tecido com tesoura de ponta romba criando uma bolsa no dorso do animal, próximo à região da cabeça. Posteriormente, um tubo de silicone preenchido com uma das pastas foi cuidadosamente colocado no subcutâneo. Finalmente, procedeu-se a sutura com fio de seda número 4,0 Ethicon. Após 7 e 30 dias ao implante no subcutâneo, oito animais de cada grupo por período experimental foram mortos. Os implantes de silicone com os tecidos adjacentes foram removidos e foram, imediatamente, imersos em solução fixadora para posterior inclusão em parafina. Os cortes obtidos dos implantes no subcutâneo corados com HE foram utilizados para análise morfológica e quantificação do número de células inflamatórias e células gigantes multinucleadas. **Resultados:** as análises morfológicas e morfométricas revelaram uma severa resposta inflamatória nos tecidos que entraram em contato direto com os três materiais, no período de 7 dias. Em todos os grupos, a densidade numérica de células inflamatórias e de células gigantes multinucleadas foi significativamente menor

no período de 30 dias em comparação aos 7 dias. Além da redução no processo inflamatório, o tecido conjuntivo da cápsula exibia diversos fibroblastos em meio aos feixes de fibras colágenas. **Conclusão:** As pastas à base de hidróxido de cálcio Calen, UltraCal XS e Hydropast promoveram uma reação tecidual semelhante mostrando que estes materiais são biocompatíveis.

Palavras-chave: Hidróxido de cálcio, curativo de demora, biocompatibilidade, reação inflamatória, fibras colágenas

INTRODUÇÃO

Após o preparo biomecânico, é importante a colocação de uma medicação intracanal ideal, que apresente propriedades antimicrobianas eficazes e não cause nenhum dano aos tecidos periapicais¹. O medicamento que tem apresentado melhores resultados, tanto radiográficos quanto histológicos, induzindo ao reparo, é o hidróxido de cálcio^{2,3}.

O hidróxido de cálcio tem sido recomendado por mais de 40 anos⁴ por apresentar propriedades antimicrobianas e antifúngicas, capacidade de dissolver tecidos, tratamento de perfurações, além de inativar o LPS (lipopolissacarídeo) bacteriano^{2,5,6,7}.

Esta medicação intracanal ainda possui ações anti-exudativas e antiinflamatórias, além de ser biocompatível, sendo capaz de induzir a formação de tecido mineralizado. Assim, as propriedades exibidas pelo hidróxido de cálcio tornam possível a sua utilização tanto nos tratamentos de biopulpectomia quanto nos de necropulpectomia⁸.

Um estudo utilizando o hidróxido de cálcio mostrou que este promove a desnaturação de mediadores inflamatórios como a interleucina-1 (IL1), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e um peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e, portanto, parece desempenhar um papel no reparo perirradicular⁹.

A associação a diversos tipos de veículos e radiopacificadores ao hidróxido de cálcio tem sido o outro alvo de estudo dos pesquisadores¹², com o objetivo de avaliar a influência destes materiais nas propriedades físico-químicas

e biológicas do hidróxido de cálcio. No entanto, tem sido sugerido que o veículo utilizado pode influenciar na capacidade de ação do hidróxido de cálcio, bem como na sua dissociação iônica e difusão. Além disso, o veículo deve proporcionar alta velocidade de dissociação e difusão ao hidróxido de cálcio, pois ao ser colocado no interior do canal, este se dissocia em íons cálcio e hidroxila, elevando o pH do meio, podendo desta maneira ter ação antimicrobiana e estimular formação de tecido mineralizado atuando assim no reparo apical¹².

A pasta Calen (SS White Artigos Dentários Ltda., Indústria Brasileira), à base de hidróxido de cálcio é indicada como medicação intracanal. Além do hidróxido de cálcio, esta pasta é composta por um radiopacificador, óxido de zinco, colofônia e um veículo, o polietilenoglicol 400. Esta é amplamente utilizada, pois diversos estudos provam sua excelente ação biológica^{10,11}.

Novas pastas à base de hidróxido de cálcio têm surgido com o objetivo de melhorar suas propriedades físico-químicas (como radiopacidade, facilidade de uso) e biológicas (como indutora de reparo, antiinflamatórias, anti-exudativas, antimicrobianos entre outras). Dentre estas, a pasta UltraCal XS a qual, segundo seu fabricante, (Ultradent Products, INC.), apresenta-se com boa viscosidade, exibindo a capacidade de escoar mais facilmente de maneira que preenche meticulosamente o canal radicular. Além disso, por ser comercializada em uma seringa e devido a sua baixa viscosidade passa facilmente pela agulha, facilitando o seu uso.

Outro exemplar é a pasta Hydropast (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda. Indústria Brasileira), que também se apresenta na forma de seringa e agulha e, segundo seu fabricante, a utilização do sulfato de bário como radiopacificador melhora as suas propriedades físico-químicas, além das propriedades biológicas do hidróxido de cálcio.

Portanto, o objetivo deste estudo foi de avaliar, em subcutâneo de ratos, a biocompatibilidade de dois materiais, lançados recentemente, à base de hidróxido de cálcio, utilizados como medicação intracanal, o UltraCal XS e o Hydropast, comparado-os ao Calen, rotineiramente utilizado.

MATERIAL E MÉTODO

-Procedimentos Experimentais

O protocolo referente à pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Proc. CEEA nº 15/2009). Foram utilizados no total 48 ratos (*Rattus Norvegicus Holtzman*) com peso, aproximado de 250 g, que receberam ração e água *ad libitum*. Os ratos foram distribuídos equitativamente e aleatoriamente em três grupos assim constituídos: Grupo Calen (GC), Grupo UltraCal XS (GU) e Grupo Hydropast (GH).

Tubos de silicone com 10 mm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro interno foram esterilizados pela radiação gama-cobalto; subsequentemente, estes tubos foram preenchidos com as medicações intracanal Calen (SS White Artigos Dentários Ltda., Indústria Brasileira), UltraCal XS (Ultradent Products, INC.) ou Hydropast (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Indústria Brasileira). Este preenchimento foi realizado de acordo com as orientações do fabricante; assim, para o Calen foi utilizado uma seringa ML (SS White Artigos Dentários Ltda., Indústria Brasileira) com agulha longa Septoject XL (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, França) e para o UltraCal XS e o Hydropast foram utilizadas agulhas na própria seringa que contém o material e que vem junto com o produto. Os tubos de silicone foram preenchidos com os diferentes materiais e, subsequentemente, foram implantados no subcutâneo dorsal dos ratos.

Após a anestesia, por via intraperitoneal, com 80 mg/kg de peso corporal de cloridrato de cetamina (Syntec, Rhobifarma Indústria Farmacêutica

Ltda, Brasil) associada a 4 mg/kg de peso corporal de xilazina (Syntec, Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda, Brasil), realizaram-se a tricotomia e a desinfecção da pele dorsal com 10% de solução de iodo-povidona (Phoenix SAIC, BA, Argentina). Um corte de aproximadamente 2 cm de comprimento foi realizada na pele com uma tesoura; procedeu-se então a divulsão do tecido com tesoura de ponta romba criando uma bolsa no dorso do animal, próximo à região da cabeça. Posteriormente, um tubo de silicone preenchido com uma das pastas foi cuidadosamente colocado no subcutâneo. Finalmente, procedeu-se a sutura com fio de seda número 4,0 Ethicon (Johnson & Johnson- do Brasil Indústria Comércio Produtos para Saúde Ltda.). Após 7 e 30 dias ao implante no subcutâneo, oito animais de cada grupo por período experimental foram sacrificados com 600mg/Kg de hidrato de cloral ($C_2H_3Cl_3O_2$ – Vetec- Duque de Caxias: Rio de Janeiro/ Brasil). Os tecidos adjacentes com os implantes de silicone foram removidos e foram, imediatamente, imersos em solução fixadora.

-Processamento Histológico e Análise Morfológica

Os espécimes foram fixados em formaldeído 4% tamponado com fosfato de sódio a 0,1 M e pH ajustado em 7,4 por 48 horas. Subsequentemente, os espécimes foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Após a inclusão em parafina, os tubos foram removidos e o espaço deixado pelo tubo foi preenchido por parafina para a obtenção de cortes longitudinais dos implantes no subcutâneo. Os blocos contendo o tecido subcutâneo ao redor dos implantes foram cortados com auxílio de um micrótomo (Microm, modelo HM 325) obtendo-se cortes seriados com 6µm de espessura que foram, então, aderidos a lâminas de vidro. Os cortes aderidos às lâminas foram corados com hematoxilina de Carazzi e eosina (HE).

Para a descrição das alterações morfológicas e captura das imagens, foi utilizado o microscópio Olympus (modelo BX-51, Japão) no qual está acoplada uma câmera de captura DP-71 (Olympus, Japão). A partir dos cortes corados, foi realizada a descrição das alterações ocorridas no tecido subcutâneo adjacente aos implantes dos diferentes materiais. Na análise morfológica, foram considerados os seguintes parâmetros: extensão do processo inflamatório formado em resposta aos materiais, o tipo de células inflamatórias predominantes, presença de células gigantes de corpo estranho e de fibroblastos na cápsula formada na superfície adjacente ao material.

-Densidade numérica de células inflamatórias e de células gigantes multinucleadas

Com o objetivo de avaliar quantitativamente a reação inflamatória, foi estimado o número de células inflamatórias no tecido adjacente ao material implantado no subcutâneo. Foram avaliados três cortes de cada animal, mantendo-se um intervalo mínimo de 100 μm entre os cortes. Com auxílio de um programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus-Japão), as imagens do tecido adjacente ao material implantado foram capturadas, em 40x; nessa área capturada, de aproximadamente 0,09 mm^2 , foi computado o número de células inflamatórias. Portanto, em cada animal o número de células inflamatórias e de células gigantes multinucleadas foram estimados numa área de 0,27 mm^2 . O valor total de células inflamatórias e de células gigantes em cada animal (obtido a partir das três áreas capturadas/animal) foi dividido pela área total (área padrão de, aproximadamente, 0,27 mm^2) obtendo-se, assim, um valor de células inflamatórias/ mm^2 e de células gigantes/ mm^2 . Ao final, foi

estabelecida uma média final para cada grupo experimental de acordo com o período experimental e o material estudado.

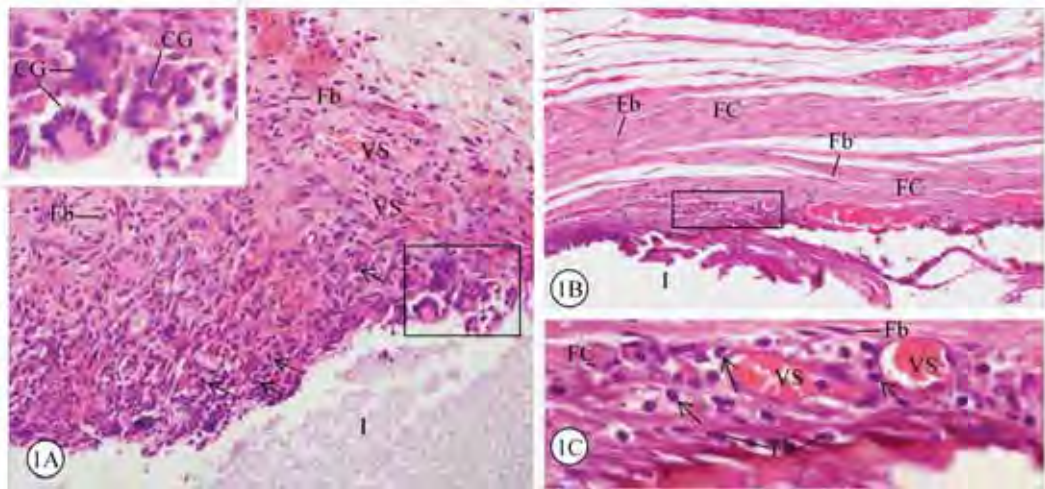
Os resultados obtidos pela análise morfométrica foram submetidos à análise estatística no software SIGMA STAT 2.0 (Jandel Scientific, Sausalito, CA, USA). Os dados foram submetidos à ANOVA e teste de Tukey e o nível de significância aceitável foi 5%.

RESULTADOS

Análise Morfológica

- Grupo Calen

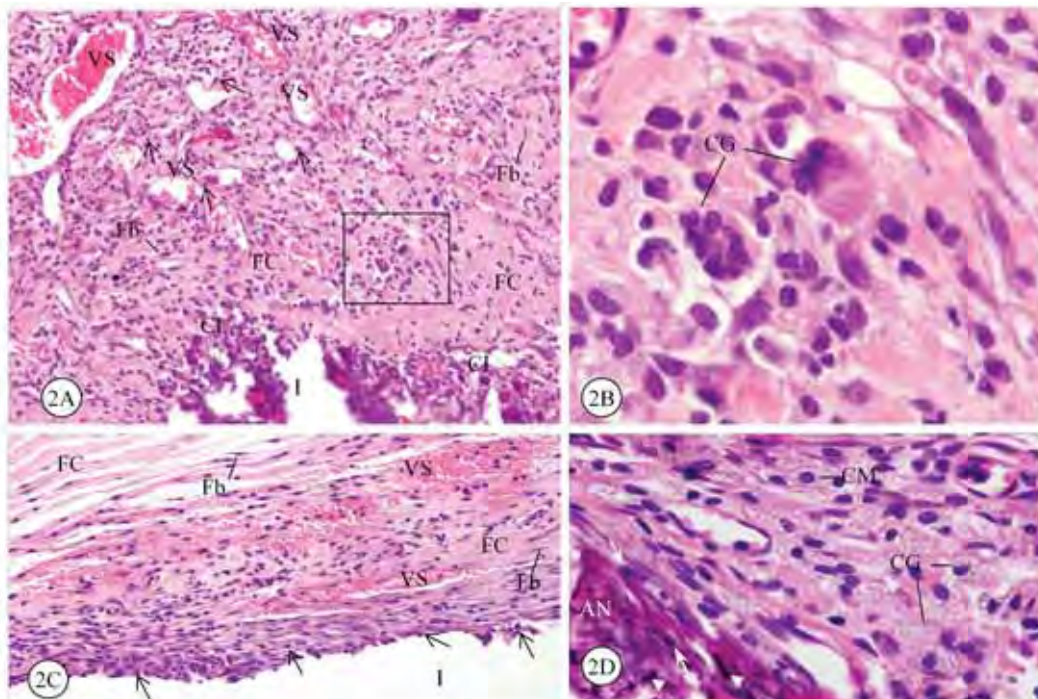
Aos 7 dias, a cápsula formada em resposta ao Calen apresentava, invariavelmente, diversas células inflamatórias mononucleadas na sua porção mais interna, ou seja, em íntimo contato ao material. Células gigantes multinucleadas foram também frequentemente observadas na superfície interna da cápsula. No entanto, na porção mais distante do material, o tecido conjuntivo da cápsula ricamente vascularizado continha diversos fibroblastos (Figura 1A). Após 30 dias, as extremidades dos tubos implantados no subcutâneo apresentaram-se envolvidos por uma cápsula de tecido conjuntivo denso; dessa maneira, a cápsula estava constituída por típicos fibroblastos situados entre evidentes feixes de fibras colágenas (Figuras 1B e 1C). As escassas células inflamatórias estavam situadas, principalmente, nas áreas adjacentes aos vasos sanguíneos (Figura 1C).



Figuras 1A-1C- Fotomicrografias de cortes de porções do subcutâneo mostrando a resposta tecidual adjacente à luz dos tubos de silicone preenchidos com Calen (CA), após 7 (Figura 1A) e 30 dias (Figuras 1B e 1C) ao implante. A **figura 1A** mostra a cápsula de tecido conjuntivo com diversas células inflamatórias (setas), principalmente, na sua porção mais próxima à luz do tubo implantado (I). Diversos fibroblastos (Fb) e vasos sanguíneos (VS) são observados na cápsula, na sua porção mais externa em relação à luz do tubo implantado (I). O detalhe no canto superior esquerdo, área demarcada, mostra células gigantes multinucleadas (CG) na superfície da cápsula, justaposta ao cimento CA. HE. 120x; 210x (*inset*). Na **figura 1B**, a cápsula formada adjacente ao material implantado no interior do tubo (I) exhibe típicos fibroblastos (Fb) situados entre evidentes feixes de fibras colágenas (FC). HE. 60x. A **figura 1C**, uma área ampliada da figura 1B, mostra a porção mais interna da cápsula contendo fibroblastos (Fb) e fibras colágenas (FC); note que as células inflamatórias mononucleadas (setas) são observadas, principalmente, adjacentes aos vasos sanguíneos (VS). HE. 210x.

- Grupo UltraCal XS

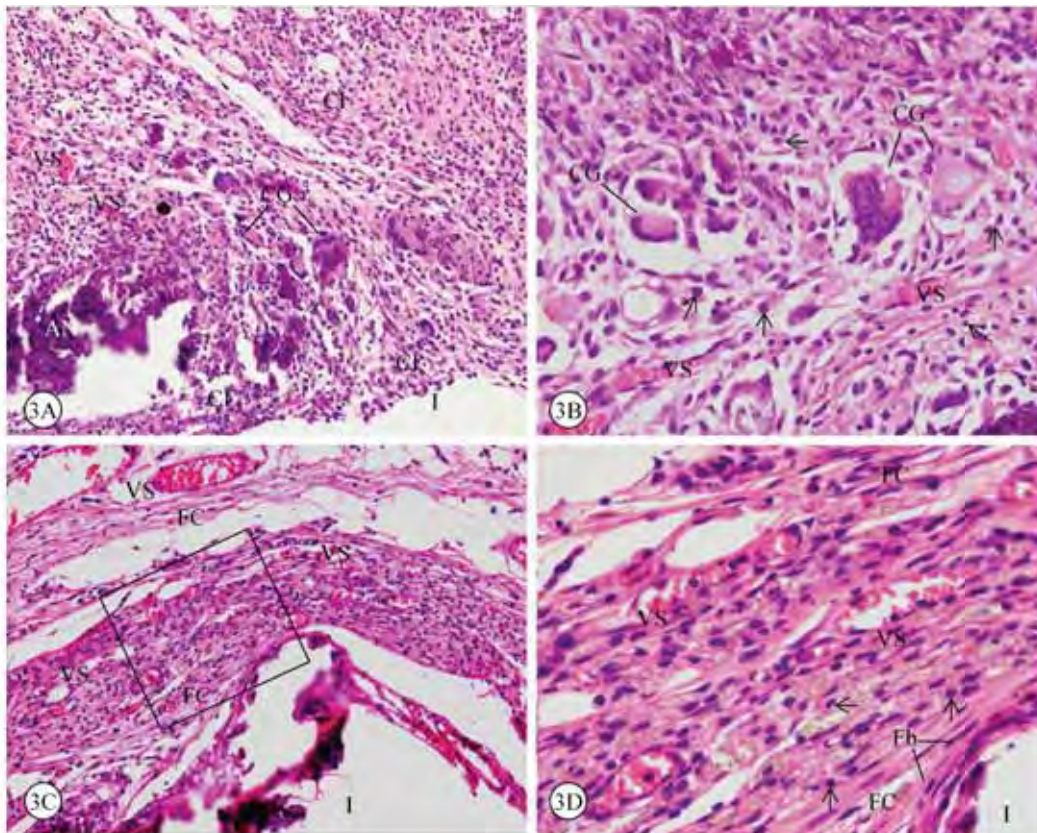
Os implantes contendo o UltraCal XS apresentaram-se, aos 7 dias, envolvidos por uma cápsula com numerosas células inflamatórias, principalmente linfócitos e macrófagos. Embora as células inflamatórias estivessem presentes por toda a extensão da cápsula, uma acentuada concentração destas células foi evidente na porção da cápsula justaposta ao material. Na porção da cápsula mais distante da superfície do material, o tecido conjuntivo continha fibroblastos entre as diversas células inflamatórias e os numerosos vasos sanguíneos; feixes de fibras colágenas também foram observados em algumas áreas da cápsula (Figura 2A). Além disso, típicas células gigantes multinucleadas estavam presentes entre os demais componentes do tecido conjuntivo da cápsula (Figura 2B). Aos 30 dias, o tecido conjuntivo da cápsula, ricamente vascularizado, continha típicos fibroblastos entre as fibras colágenas. As células inflamatórias estavam situadas, em sua maior parte, na porção mais interna da cápsula adjacente ao material implantado (Figura 2C). Na superfície interna da cápsula, em íntimo contato com o material, foram observadas algumas áreas de material amorfo e heterogêneo contendo estruturas fortemente basófilas, ou seja, fortemente coradas pela hematoxilina; algumas vezes, células foram observadas incorporadas neste material (Figura 2D). Além disso, diversas partículas de pequeno tamanho e exibindo coloração castanha foram observadas na cápsula, aparentemente, internalizadas por células gigantes multinucleadas e células mononucleadas arredondadas (Figura 2D).



Figuras 2A-2D- Fotomicrografias de cortes de porções do subcutâneo mostrando a resposta tecidual adjacente à luz dos tubos de silicone preenchidos com UltraCal XS (UC), após 7 (Figuras 2A e 2B) e 30 dias (Figuras 2C e 2D). A **figura 2A** mostra a cápsula exibindo, na sua porção mais interna – junto à luz do tubo implantado (I), inúmeras células inflamatórias (CI). Na maior parte, o tecido conjuntivo da cápsula apresenta fibroblastos (Fb) entre as fibras colágenas (FC); as células inflamatórias (setas) estão situadas, principalmente, próximas aos vasos sanguíneos (VS). HE, 120x. A **figura 2B**, área demarcada em 2A, mostra células gigantes multinucleadas (CG) entre os demais componentes do tecido conjuntivo. HE. 210x. A **figura 2C**, o tecido conjuntivo adjacente à luz do tubo implantado (I) exhibe, em sua maior parte, diversos fibroblastos (Fb) entre os feixes de fibras colágenas (FC). Células inflamatórias (setas) estão presentes, principalmente, na superfície da cápsula justaposta ao material. Note que o tecido apresenta grande quantidade de vasos sanguíneos (VS). HE. 60x. Na **figura 2D**, a superfície da cápsula justaposta ao material implantado apresenta uma área com coloração heterogênea (AN) exibindo estruturas basófilas, fortemente coradas pela hematoxilina (cabeças de setas); alguns núcleos de células (setas) são observados nesta massa amorfa (AN). O tecido conjuntivo que constitui a cápsula exhibe células gigantes multinucleadas (CG) e diversas células mononucleadas (CM) que parecem conter partículas de material no seu citoplasma (coloração castanha). HE. 190x.

- Grupo Hydropast

Aos 7 dias, a cápsula que envolvia o material Hydropast continha diversas células inflamatórias distribuídas por toda sua extensão; inúmeras células gigantes multinucleadas também foram observadas na cápsula (Figuras 3A e 3B). Frequentemente, algumas porções da cápsula exibiram áreas contendo material heterogêneo fortemente basofílico (Figura 3A). Aos 30 dias, embora uma delgada cápsula de tecido conjuntivo denso estava revestindo a superfície do material implantado, diversas células inflamatórias ainda foram observadas na porção externa da cápsula; estas células inflamatórias estavam situadas, principalmente, próximas aos inúmeros vasos sanguíneos. No entanto, o tecido conjuntivo da cápsula continha típicos fibroblastos; além disso, uma aparente redução na quantidade de células gigantes multinucleadas foi também verificada (Figuras 3C e 3D). Frequentemente, partículas de pequeno tamanho exibindo coloração castanha, aspectos similar às partículas do material, estavam dispersas entre os componentes do tecido conjuntivo da cápsula (Figura 3D).



Figuras 3A-3D- Fotomicrografias de cortes de porções do subcutâneo mostrando a resposta tecidual adjacente à luz dos tubos de silicone preenchidos com Hydropast (HP), após 7 (Figuras 3A e 3B) e 30 dias (Figuras 3C e 3D). A **figura 3A** mostra a cápsula formada adjacente ao material implantado (I) contendo diversas células inflamatórias (CI) e células gigantes multinucleadas (CG). Note que a cápsula apresenta uma área contendo massas heterogêneas e fortemente basófilas (AN), coradas pela hematoxilina. VS, vasos sanguíneos. HE. 120x. Na **figura 3B**, podem ser observadas na cápsula formada em resposta ao HP células gigantes (CG) entre as células inflamatórias (setas). HE. 180x. Na **figura 3C**, o tecido conjuntivo que constitui a cápsula adjacente ao tubo implantado (I) contém diversas células e escassas fibras colágenas (FC); muitos vasos sanguíneos (VS) também são observados. HE. 110x. A **figura 3D**, área demarcada na figura 3C, mostra típicos fibroblastos (Fb) entre os feixes de fibras colágenas (FC) na porção mais interna da cápsula, adjacente ao material implantado (I). Partículas de material (coloração castanha) aparecem dispersas entre os fibroblastos (Fb) e vasos sanguíneos (VS) presentes no tecido conjuntivo da cápsula; escassas células inflamatórias (setas) são observadas. HE. 190x.

Análise Morfométrica

A análise da densidade numérica de células inflamatórias na cápsula junto à abertura dos tubos implantados revelou que os materiais promoveram uma reação inflamatória de intensidade semelhante; portanto, diferenças estatisticamente significante não foram verificadas entre os materiais nos períodos estudados. No entanto, uma diminuição estatisticamente significativa no número de células inflamatórias/mm² foi verificada no período de 30 dias em comparação ao de 7 dias, em todos os materiais avaliados (Tabela 1).

Embora diferenças significantes não foram detectadas entre os materiais, deve-se salientar que o Hydropast apresentou uma redução de, aproximadamente, 37% no número de células inflamatórias, de 7 para 30 dias; esta redução foi de, aproximadamente, 65% e de 59% nos materiais Calen e UltraCal XS, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de células inflamatórias por mm² da cápsula em resposta aos materiais Calen, UltraCal XS e Hydropast nos períodos de 7 e 30 dias.

Grupos	Períodos	
	7 dias	30 dias
Calen	2795,10 ± 939,90 ^{a,1}	960,64 ± 433,22 ^{a,2}
UltraCal XS	2397,66 ± 613,14 ^{a,1}	975,99 ± 227,71 ^{a,2}
Hydropast	2248,10 ± 315,41 ^{a,1}	1407,82 ± 870,89 ^{a,2}

Os valores estão expressos como média ± desvio padrão

-Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os materiais no mesmo período experimental.

-Números diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) de cada material nos diferentes períodos experimentais.

De acordo com a Tabela 2, o número de células gigantes/mm² da cápsula formada em resposta aos materiais diminuiu significativamente do período de 7 para o de 30 dias, em todos os grupos. No entanto, o número de células gigantes, nos períodos de 7 e 30 dias, foi significativamente menor no grupo Calen em relação aos demais grupos. Em contraposição, o número de células gigantes foi significativamente maior, no período de 7 dias, no grupo Hydropast em relação aos demais grupos; no período de 30 dias, a cápsula formada em resposta ao UltraCal XS apresentou um número significativamente maior de células gigantes quando comparado ao Calen e ao Hydropast.

Tabela 2 – Número de células gigantes multinucleadas por mm^2 da cápsula formada em resposta aos materiais Calen, UltraCal XS e Hydropast nos períodos de 7 e 30 dias.

Grupos	Períodos	
	7 dias	30dias
Calen	$4,14 \pm 0,90^{a,1}$	$0,92 \pm 0,18^{a,2}$
UltraCal XS	$6,00 \pm 1,03^{b,1}$	$2,77 \pm 1,05^{b,2}$
Hydropast	$8,77 \pm 1,46^{c,1}$	$1,37 \pm 0,87^{c,2}$

Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão

-Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os materiais no mesmo período experimental.

-Números diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) de cada material nos diferentes períodos experimentais.

DISCUSSÃO

Tubos de silicone e/ou polietileno preenchidos com materiais endodônticos implantados no subcutâneo de ratos são, frequentemente, utilizados para avaliar a biocompatibilidade^{13,14}. Os nossos resultados morfológicos e morfométricos indicam que as pastas UltraCal XS e Hydropast são biocompatíveis, apresentando comportamento biológico semelhante ao Calen. Embora aos 7 dias uma intensa reação inflamatória foi verificada na cápsula adjacente aos materiais implantados, as diferenças verificadas na densidade numérica de células inflamatórias não foram estatisticamente significante entre os materiais avaliados. Em contrapartida, uma redução significativa no número de células inflamatórias foi encontrada aos 30 dias, nos três medicamentos, em relação ao período inicial. Além do reduzido número de células inflamatórias, a cápsula adjacente aos materiais apresentava diversos fibroblastos entre os feixes de fibras colágenas, indicando a involução do processo inflamatório e o estabelecimento de um tecido conjuntivo denso caracterizando a biocompatibilidade dos materiais^{10,11}.

A presença de células gigantes multinucleadas, que indica a presença de reação inflamatória crônica, foi encontrada no período de 7 dias no tecido conjuntivo que ficou em contato com os materiais, no entanto, o Hydropast apresentou um número significativamente maior. No período de 30 dias, houve uma redução em todos os materiais estudados no número de células gigantes multinucleadas, indicando uma diminuição do processo inflamatório, porém na cápsula formada em resposta ao UltraCal XS, um número significante maior de células gigantes multinucleadas foi encontrado em relação aos medicamentos Calen e Hydropast. Estas células gigantes multinucleadas formadas em resposta

ao estímulo agressor originam-se da fusão de 20 ou mais macrófagos; estas células podem internalizar as partículas do material e promover a sua digestão¹⁵. É possível que o maior número de células gigantes multinucleadas encontradas no período de 30 dias na pasta UltraCal XS em comparação ao Calen e ao Hydropast seja em decorrência da maior penetrabilidade do UltraCal XS nos tecidos, onde ocorre a sua solubilização. No entanto, estudos para avaliar as propriedades físico-químicas são necessários para melhor compreender a resposta dos tecidos promovida pelo UltraCal XS e Hydropast.

O hidróxido de cálcio tem sido usado em odontologia por mais de um século¹⁶. As medicações intracanal à base de hidróxido de cálcio tem sido indicadas como complemento ao preparo biomecânico para controlar e eliminar bactérias presentes no sistema de canais radiculares^{17,18}. Esta medicação difunde-se pela dentina em áreas onde o preparo biomecânico não pode ser realizado e pode também ter ação como barreira física prevenindo a reinfecção e reduzindo o risco de proliferação dos remanescentes bacterianos¹⁹.

O hidróxido de cálcio possui também ação anti-exudativa²⁰, capacidade de induzir a formação de tecido mineralizado²¹ e é bem tolerado pelos tecidos²², tem a capacidade de dissolver restos necróticos²³ e a capacidade de promover a hidrólise da endotoxina bacteriana (LPS-lipopolissacarídeo) *in vitro*²⁴ e *in vivo*²⁵. Sua utilização como medicação intracanal em endodontia tem levado a um reparo periapical satisfatório²⁶.

Recentemente, diferentes substâncias tem sido associadas ao Ca(OH)_2 em uma tentativa de melhorar sua radiopacidade, viscosidade, fluidez,

espectro da ação antimicrobiana, velocidade de dissociação iônica e outras propriedades físico-químicas, facilitando seu uso na clínica odontológica²⁷.

A pasta Calen utilizada como nosso material comparativo, é um medicamento à base de Ca(OH)_2 associada a um veículo viscoso (polietilenoglicol 400), que proporciona a liberação mais lenta de íons hidroxila, mantendo sua ação por um período mais longo; além disto, esta associação ocasiona uma diminuição na solubilidade da pasta e aumenta a sua penetrabilidade na dentina radicular²⁸. A pasta Calen apresenta pH por volta de 12,4¹⁷, alta atividade antibacteriana²⁸ e biocompatibilidade^{11,17}. Apresenta ainda na sua composição, óxido de zinco como radiopacificador e colofônia. No presente estudo, o Calen também se mostrou biocompatível.

As demais pastas à base de hidróxido de cálcio utilizadas para a avaliação da biocompatibilidade foi a UltraCal XS, composta de hidróxido de cálcio a 35% mais radiopacificador, o qual não teve o nome fornecido pelo fabricante, e o Hydropast que possui hidróxido de cálcio a 38%, sulfato de bário como radiopacificador e propilenoglicol como veículo. Portanto, as modificações incorporadas às pastas UltraCal XS e Hydropast não alteraram de maneira significativa a resposta biológica do tecido conjuntivo do subcutâneo de ratos quando comparada ao Calen. No entanto, o alto valor do desvio padrão obtido em relação à densidade numérica de células inflamatórias indica que a resposta do tecido conjuntivo ao material Hydropast foi mais heterogênea que a resposta promovida pelas outras pastas avaliadas.

O mecanismo de ação do hidróxido de cálcio é diretamente influenciado pelo seu pH elevado²⁹, assim, em contato direto com o tecido

conjuntivo, a alcalinidade do hidróxido de cálcio induz a formação de uma zona de necrose³⁰. Esta necrose refere-se a um conjunto de alterações morfológicas em tecidos vivos resultantes da ação de enzimas em células lesadas. A massa de tecido necrótico é caracterizada pela preservação do contorno básico das células coaguladas por um período de alguns dias; o núcleo torna-se intensamente basofílico, ou seja, picnótico. Como as células necróticas são incapazes de manter a integridade da membrana, o seu conteúdo extravasa e elicia uma resposta inflamatória que leva à remoção dos restos celulares por fagocitose, seguido do reparo¹⁵. A reação inflamatória observada no presente estudo pode ser atribuída à necrose superficial promovida pelos materiais à base de hidróxido de cálcio³¹.

Aos 30 dias, após o período agudo de inflamação, o processo inflamatório foi substituído por tecido conjuntivo contendo suas células típicas – fibroblastos – e feixes de fibras colágenas em íntimo contato com o material implantado no subcutâneo. Estes resultados sugerem que o efeito irritante promovido pelos materiais diminuiu, de maneira a possibilitar a proliferação de fibroblastos e a formação de fibras colágenas, elementos fundamentais para a reparação do tecido conjuntivo, devido à biocompatibilidade do hidróxido de cálcio. Os componentes principais deste reparo são: a angiogênese, migração e proliferação dos fibroblastos, síntese de colágeno e remodelação por tecido conjuntivo. Portanto, este reparo inicia-se com a formação do tecido de granulação e culmina na deposição de tecido conjuntivo fibroso.

Assim, considerando a metodologia empregada e os resultados obtidos, pode-se concluir que as pastas UltraCal XS e Hydropast apresentaram

biocompatibilidade semelhante ao Calen, quando implantadas no subcutâneo de ratos.

REFERÊNCIAS

1. Carrotte P. Endodontics: Part 9. Calcium hydroxide, root reabsorption, endo-perio lesions. *Br Dent J* 2004;197:735-43.
2. Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LAB, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod* 2002;28: 694-6.
3. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LAB. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *J. Endod* 2002;28: 295-9.
4. Spangburg L, Haapasalo M. Rationale and efficacy of root canal medicaments and root filling materials with emphasis on treatment outcome. *Endod Topics* 2002;2:40.
5. Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod* 1993;19:76–8.
6. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, Bonetti-Filho I, Silva LAB. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J* 2003;36:733-9.
7. Law A, Messer H. An evidence-based analysis of the antibacterial effectiveness of intracanal medicaments. *J Endod* 2004;30:689 –94.

8. Leonardo MR, Leonardo RT. Endodontia: Conceitos biológicos e recursos tecnológicos. São Paulo: Artes Médicas; 2009. 234 p.
9. Khan AA, Sun X, Hargreaves KM. Effect of calcium hydroxide on proinflammatory cytokines and neuropeptides. *J Endod* 2008;34:1360-3.
10. Leonardo MR, da Silva LA, Leonardo RT, Utrilla LS, Assed S. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. *J Endod* 1993;19:348–52.
11. Nelson-Filho P, Silva LAB, Leonardo MR, Utrilla LS, Figueiredo F. Connective tissue responses to calcium hydroxide based root canal medicaments. *Int Endod J* 1999;32:303–11.
12. Estrela C. et al. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide pastes. *Braz Dent J* 1999;10:63-72.
13. Olsson B, Sliwkowsky A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod* 1981; 7:355–69.
14. FDI. Federation Dentaire Internationale. Recommended standard practices for the biological evaluation of dental materials. *Int Dent J* 1980; 30:174–6.
15. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. Robbins: Patologia básica. 8ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. 33-86 p.

16. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999;32:361–9.
17. Leonardo MR, Silva LAB, Utrilla LS, Leonardo RT, Consolaro A. Effect of intracanal dressings on repair and apical bridging of teeth with incomplete root formation. *Endod Dent Traumatol* 1993;9:2540.
18. Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod* 1994;20:127-9.
19. Kontakiotis E, Nakou M, Georgopoulou M. "In vitro" study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *Int Endod J*. 1995;28:285-9.
20. Allard U, Stromberg U, Stromberg T. Endodontic treatment of experimentally induced apical periodontitis in dogs. *Endod Dent Traumatol* 1987;3:240-4.
21. Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther* 2006;13:611-20.
22. Murray PE, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12:258-66.

23. Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endod* 1988;14:125-7.
24. De Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Valera MC. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:135-42.
25. Silva L, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod* 2002;28:94-8.
26. Sjogren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991;24:119–25.
27. Basrani B, Ghanem A, Tjäderhane L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. *J Endod* 2004;30:413-7.
28. Leonardo MR. *Endodoncia: tratamento de conductos radiculares*. 1st ed. São Paulo: Artes Médicas, 2005.
29. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Junior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J* 1995;6:85-90.
30. Holland R. Histochemical response of amputated pulps to calcium hydroxide. *Rev Bras Pesq Med Biol* 1971;4:83-95.

31. Faria G, Celes MRN, De Rossi A, Silva LAB, Silva JS, Rossi MA. Evaluation of chlorhexidine toxicity Injected in the paw of mice and added to cultured L929 fibroblasts. J Endod 2007;33:715-22.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E pH DE
CURATIVOS DE DEMORA À BASE DE
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO*

CAPÍTULO 2

*Artigo a ser submetido para publicação no periódico Journal of Oral Science

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram avaliar a atividade antimicrobiana e os valores do pH dos seguintes curativos de demora: Calen, Calen PMCC, Hydropast, Hydropast+I e UltraCal XS. Os microrganismos utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana destas pastas foram: *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29122), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Foi utilizada a técnica de difusão em ágar, pelo método de poço em placas com camada dupla, ou seja, com camada base e camada “seed” de meios de cultura adequados. Os curativos de demora estudados foram aplicados em cada um dos poços em quantidade suficiente para preenchimento. Os testes foram realizados em triplicata. As placas foram mantidas à temperatura ambiente por duas horas, para pré-difusão do material, e depois incubadas a 37 °C por 24 horas. O gel de trifetil-tetrazólico 0,05% foi adicionado para otimizar as leituras das zonas de inibição. Os resultados mostraram que todos os curativos de demora testados apresentam efeito antimicrobiano contra os microrganismos utilizados, exceto o Hydropast+I que não apresentou efeito sobre o *Enterococcus faecalis*. Para determinar o pH destas mesmas medicações foram utilizados 10 (dez) tubos de cloreto de polivinil (PVC) nos quais foram inseridas as medicações. Após o preenchimento, os tubos foram radiografados. Em seguida, foram mergulhados em frascos plásticos contendo 10 ml de água deionizada. Os frascos foram fechados e mantidos em uma estufa a 37°C. Após 12, 24, 48 e 72 horas, o pH das soluções foi medido com o auxílio de peagâmetro. Os resultados foram submetidos ao teste estatístico paramétrico ANOVA e ao teste de comparações múltiplas de Tukey com variância de 5%. O pH observado para as pastas à base de hidróxido

de cálcio foi maior do que o apresentado pelo Hydropast+I ($p < 0,05$). De acordo com as metodologias empregadas podemos concluir que as medicações estudadas apresentam atividade antimicrobiana e altos valores do pH. A Hydropast+I não demonstrou efeito sobre o *Enterococcus faecalis*, obtendo menores valores de pH.

Palavras-chave: Hidróxido de cálcio, curativo de demora, microrganismos, antimicrobiano e pH.

INTRODUÇÃO

Inúmeros estudos (1,2,3,4,5) mostraram que a eficácia do preparo biomecânico com soluções bactericidas e uso de medicação intracanal entre as sessões, reduzem, significativamente, o número de bactérias no interior dos canais radiculares. A identificação de anaeróbios Gram-negativos como microrganismos preponderantes em dentes com necrose pulpar e o conhecimento de suas implicações endodônticas, promoveram alterações na orientação do tratamento dos canais radiculares de dentes com necrose pulpar e reação periapical crônica (6).

Assim, o hidróxido de cálcio é o medicamento que colocado entre sessões reduz significativamente a microbiota residual (7,8). Segundo Karim (9) o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio tem sido avaliado por estudos clínicos, demonstrando sucesso ao descontaminar os canais radiculares depois de um mês de curativo, em 97% dos casos tratados. Este medicamento além de causar uma regressão da lesão periapical pelo seu efeito antimicrobiano, possibilita ainda a capacidade de induzir a formação de tecidos duros e assim a cicatrização periodontal (10).

Seu elevado pH pode influenciar na inibição do crescimento bacteriano, uma vez que pode interferir na atividade enzimática dos microrganismos. A velocidade das reações químicas favorecidas pelas enzimas é influenciada pelo substrato. Estas enzimas podem estar presentes tanto extra como intracelularmente. As enzimas extracelulares atuam sobre os nutrientes, carboidratos, proteínas e lipídeos, que por meio das hidrólises favorecem a digestão. As enzimas localizadas na membrana citoplasmática estão

relacionadas com o transporte de substâncias para dentro e para fora da célula, com a atividade respiratória e com a estruturação da parede celular. O transporte pela membrana é fundamental, pois, para suas complexas reações metabólicas, crescimento e reprodução, há necessidade do controle do fluxo de nutrientes (11,12,13,14).

Outra forma de ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio foi demonstrada por Safavi e Nichols (15,16). Estudando o efeito do hidróxido de cálcio sobre o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, demonstraram que os íons hidroxila podem hidrolisar o LPS presente na parede celular das bactérias, degradando o lipíde A e neutralizando seu efeito residual após a lise celular.

A associação de outras medicações e veículos ao hidróxido de cálcio tem sido alvo de estudos, com o objetivo de avaliar a influência destas associações nas propriedades físico-químicas e biológicas do hidróxido de cálcio. Estrela et al. (17) relataram que o veículo utilizado pode influenciar na capacidade de ação do hidróxido de cálcio, bem como na sua dissociação iônica e difusão. Referiram ainda que a associação com veículos aquosos (água destilada, soro fisiológico e solução anestésica) proporciona ao hidróxido de cálcio melhor ação antibacteriana, pois permite maior velocidade de dissociação e difusão. É interessante que o veículo proporcione alta velocidade de dissociação e difusão ao hidróxido de cálcio, pois ao ser colocado no interior do canal, este se dissocia em íons cálcio e hidroxila, elevando o pH do meio, podendo desta maneira ter ação antimicrobiana e estimular formação de tecido mineralizado e reparo apical. A penetrabilidade desta medicação intracanal é

importante por permitir que o hidróxido de cálcio atinja microrganismos presentes no interior dos túbulos dentinários (17).

No entanto, segundo Leonardo (18), quando associa um veículo viscoso como o polietilenoglicol “400” à pasta à base de hidróxido de cálcio, esta fica por mais tempo na área desejada, prolongando sua ação, diminuindo a solubilização e aumentando a sua penetrabilidade na dentina radicular.

Baseado na justificativa de que embora o hidróxido de cálcio apresente maior eficácia contra os microrganismos anaeróbios, no início da década de 90, Leonardo (19), indica o emprego da associação do hidróxido de cálcio com paramonoclorofenol canforado (PMCC), pois este tem atividade antibacteriana contra alguns anaeróbios facultativos, como os *Enterococcus faecalis*. Assim, a associação das duas substâncias promove maior espectro de atividade antibacteriana.

Outra associação com a intenção de aumentar o espectro antimicrobiano do hidróxido de cálcio é com o iodofórmio. Este, sendo um fármaco eficaz em lesões periapicais (20), também tem sua associação com hidróxido de cálcio sugerida (21).

Uma metodologia *in vitro* para determinar a eficácia antibacteriana de diferentes formulações de Ca(OH)_2 é o método de difusão em ágar. Este método é uma forma em que as formulações diferentes de um composto podem ser testadas contra um grande número de cepas bacterianas individual e dar uma sugestão preliminar dos vários graus de eficácia antibacteriana. As zonas

de inibição são medidas para determinar se um medicamento teste é tóxico para a bactéria que está sendo testada (22,23).

A proposta deste estudo foi avaliar a eficácia antimicrobiana de cinco curativos de demora à base de hidróxido de cálcio: Calen (SS White Artigos Dentários Ltda., Indústria Brasileira), Calen PMCC (SS White Artigos Dentários Ltda., Indústria Brasileira), Hydropast (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Indústria Brasileira), Hydropast+ I (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Indústria Brasileira) e UltraCal XS (Ultradent Products, INC.) e também avaliar *in vitro* o pH destas.

MATERIAL E MÉTODO

A-Teste de difusão em ágar

As seguintes medicações intracanal foram investigadas (Quadro 1): Calen (SS White Artigos Dentários Ltda., Indústria Brasileira), Calen PMCC (SS White Artigos Dentários Ltda., Indústria Brasileira), Hydropast (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Indústria Brasileira), Hydropast+ I (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Indústria Brasileira) e UltraCal XS (Ultradent Products, INC.).

Quadro 1. Materiais testados no estudo.

PRODUTO	COMPOSIÇÃO
Calen	Hidróxido de cálcio; óxido de zinco; colofônia; polietilenoglicol 400 - (SS White Artigos Dentários Ltda., Indústria Brasileira)
Calen PMCC	Hidróxido de cálcio; óxido de zinco; colofônia; polietilenoglicol 400 e paramonoclorofenol canforado (2,5: 7,5) - (SS White Artigos Dentários Ltda., Indústria Brasileira)
Hydropast	Hidróxido de cálcio (38%); sulfato de bário e propilenoglicol (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Indústria Brasileira)
Hydropast+I	Hidróxido de cálcio (38%); iodofórmio (26%) e veículo- (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Indústria Brasileira)
UltraCal XS	Pasta de hidróxido de cálcio a 35% e radiopacificador (Ultradent Products, INC.)

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de difusão em ágar pelo método de poço.

No Quadro 2 estão apresentadas as cepas que foram utilizadas no estudo, sendo procedentes da American Type Culture Collection (ATCC), sendo uma cepa de campo.

Quadro 2. Cepas que foram utilizadas como indicadoras da atividade antimicrobiana, procedência e morfotipo.

Microrganismos	Origem	Morfotipo
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	cg+
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	cg+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	bg-
<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	levedura

Os inóculos foram obtidos pela reativação das cepas indicadoras em caldo apropriado, de acordo com as características fisiológicas, e incubados a 37° C por 24 horas.

Os testes pelo método de poço foram realizados em triplicata, em placas com camada dupla, ou seja, com camada base e camada “seed” de meios de cultura adequados. A camada base foi obtida com 12 mL de meio de cultura esterilizado e resfriado até cerca de 50° C em placas de Petri de 15 x 150 mm esterilizadas. Após solidificação, foram adicionados 8 mL de camada “seed”, que foi obtida pela adição de uma suspensão bacteriana na concentração final de 10⁶ ufc/mL de meio de cultura resfriado até cerca de 50° C.

Após solidificação da camada “seed”, os poços foram confeccionados pela remoção de ágar, com canudos de alumínio de 4 mm de diâmetro esterilizados, a cerca de 15 mm das bordas das placas e em pontos equidistantes. Os curativos de demora estudados foram aplicados em cada um dos poços em quantidade suficiente para preenchimento.

As placas foram mantidas à temperatura ambiente por duas horas, para pré-difusão do material, e depois incubadas a 37 °C por 24 horas.

Decorrido o período de incubação, foram adicionadas alíquotas de 5 ml de gel de TTC preparado com ágar (Difco) a 1,0% com 0,05% de cloreto de trifenil-tetrazólico (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) para coloração das células viáveis e otimização da leitura do halo de inibição. Após a solidificação, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos.

As imagens das placas bem iluminadas e com fundo na cor azul, contrastando com a coloração rósea das colônias vivas após o uso do gel de TTC foram digitalizadas e o diâmetro dos halos de inibição formado ao redor do poço foi mensurado com o auxílio do programa Image Tool (UTHSCSA Image Tool for Windows version 3.00).

Os resultados foram expressos por meio das médias dos halos de inibição de cada produto sobre um determinado microrganismo.

B-Avaliação do pH

Foram utilizados 10 (dez) espécimes para cada grupo. As medicações intracanal Calen, Calen PMCC, Hydropast, Hydropast+I e UltraCal XS (Quadro 1) foram inseridas em tubos de cloreto de polivinil (PVC) medindo 10 mm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro interno. Conforme indicam as instruções dos fabricantes, estes tubos foram preenchidos com as medicações intracanal. Após o preenchimento, ambas as extremidades do tubo foram limpas e os mesmos foram radiografados para avaliação do preenchimento. Em seguida, foram mergulhados em frascos plásticos contendo 10 ml de água deionizada, cujo pH foi aferido previamente. Os frascos foram fechados e mantidos em uma estufa a 37°C. Após 12, 24, 48 e 72 horas, o pH das soluções contidas nos frascos plásticos foi medido com o auxílio do peagâmetro DMPH-2 (Digimed, São Paulo, SP, Brasil). As amostras foram medidas com temperatura estabilizada em 25°C, confirmada por termômetro digital.

Posteriormente às mensurações, que foram realizadas em triplicata, os dados obtidos foram submetidos estatisticamente ao teste estatístico paramétrico ANOVA para comparação dos diferentes tubos entre si e ao teste de comparações múltiplas de Tukey com variância de 5%.

RESULTADOS

A-Teste de difusão em ágar

A tabela 1 mostra a atividade antimicrobiana dos materiais testados e o significado do halo de inibição em milímetros. Os resultados demonstraram que todas as espécies usadas no estudo foram inibidas pelos materiais utilizados, exceto a pasta Hydropast+I que não apresentou atividade antibacteriana sobre *Enterococcus faecalis*.

Tabela 1. Médias das zonas de inibição (em mm)*

Materiais/Microrganismos	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>
UltraCal XS	31±1,41	28,33±0,52	14±1	9±0
Calen	31±0	26,33±0,57	13,66±1,52	9,33±0,57
Hydropast	31±1,41	26±2,64	14±0	10,83±0,28
Calen PMCC	26±1,41	30,33±0,57	22,33±1,52	10±0
Hydropast+I	14,50±2,12	17,33±2,51	9±0	0±0

*Médias da avaliação em triplicata

B- Avaliação do pH

Os valores das médias da cada medicação intracanal em cada período analisado representados na Tabela 2 abaixo indicam que todas as

pastas à base de hidróxido de cálcio possuem elevados valores de pH. O menor pH foi para o Hydropast+I.

Tabela 2. Médias e desvio-padrão dos valores do pH nos diferentes materiais e períodos, letras iguais no mesmo período de tempo significam resultados semelhantes ($p>0,05$).

	UltraCal XS	Calen	Hydropast	Calen PMCC	Hydropast+I
12 horas	11,03±0,31 A	10,91±0,08 A	10,98±0,07 A	10,92±0,06 A	9,45±0,37 B
24 horas	10,94±0,08 A	10,94±0,05 A	10,91±0,07 A	10,94±0,07 A	8,87±0,54 B
48 horas	11,04±0,09 A	11,07±0,04 A	10,93±0,06 A	11,13±0,06 A	8,41±0,48 B
72 horas	11,02±0,06 A	11,11±0,05 A	10,96±0,11 A	11,18±0,08 A	8,24±0,39 B

DISCUSSÃO

O método de difusão em ágar utilizado neste estudo é uma das técnicas mais comumente empregadas para determinar a avaliação da atividade antimicrobiana (24,22,23,25). O período de pré-difusão, o qual consiste em manter a cultura inoculada em temperatura ambiente por duas horas, é uma importante etapa para demonstrar a atividade antimicrobiana de materiais à base de hidróxido de cálcio. Em seu estudo sobre pastas à base de hidróxido de cálcio, Leonardo et al. (26) empregando estas metodologias obtiveram resultados semelhantes aos nossos.

As pastas utilizadas demonstraram diferentes tamanhos de halos de inibição na difusão no ágar. A extensão do halo de inibição não necessariamente reflete o poder antimicrobiano do material, os resultados correspondem a uma média dos halos de inibição já que o teste foi feito em triplicata.

Os microrganismos utilizados em nosso estudo incluem bactérias facultativas e leveduras, estes foram escolhidos, pois predominam em lesões periapicais persistentes ou refratárias (27,28). Sundqvist (6) identificou e evidenciou a presença de anaeróbios Gram-negativos e suas implicações endodônticas no tratamento dos canais radiculares de dentes despolpados, com reação periapical crônica, em razão da elevada prevalência dos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, assim como da comprovada importância das endotoxinas (LPS Bacteriano).

Para otimização da leitura dos halos de inibição utilizamos um gel TTC a 0,05% depois do período de incubação, facilitando a leitura e a análise de células viáveis (26,29).

Os resultados obtidos mostraram que os curativos de demora utilizados apresentam atividade antimicrobiana, porém dependo do potencial de virulência do microrganismo testado esta zona de inibição pode ser maior ou menor. Por exemplo, o *Micrococcus luteus* é mais sensível a estas pastas do que o *Enterococcus faecalis*.

Outro fator que parece interferir no tamanho dos halos de inibição é o antimicrobiano iodofórmio adicionado ao hidróxido de cálcio para aumentar seu espectro. Diversos autores indicam a associação com paramonoclorofenol canforado (19,30), ou com iodofórmio (21,31) para aumentar o poder antimicrobiano do hidróxido de cálcio principalmente em dentes com nítida lesão periapical crônica, que possuem microrganismos como o *Enterococcus faecalis* que são resistentes ao hidróxido de cálcio.

No entanto, esta metodologia de difusão em ágar utilizada neste estudo apresenta várias limitações, o que pode explicar os diferentes resultados ao adicionar agentes microbianos ao hidróxido de cálcio. Dependendo das propriedades físico-químicas do material testado, da velocidade, da taxa de difusão, da quantidade do antimicrobiano em teste, da natureza do meio de cultura, da composição, do pH e da espessura do meio, os resultados podem sofrer alterações (32). Além disso, o teste de difusão em ágar requer cuidadosa padronização da densidade do inóculo, conteúdo de meio, viscosidade do ágar, número e tamanho dos espécimes contidos em cada placa (33, 34, 35, 36, 37).

A variação do pH também reflete no crescimento bacteriano, uma vez que interfere na atividade enzimática (11,12,13,14). Kodukula et al. (12) relatam que em condições de elevado pH (baixa concentração de íons H^+), a atividade enzimática das bactérias é inibida. Aliado a este fato, cada enzima

possui um pH ótimo para a sua ação, segundo o qual reage com uma velocidade máxima. O pH interno das bactérias é diferente do pH externo, sendo que, internamente, seu valor oscila em torno da neutralidade. Aliás, o mecanismo que mantém essa neutralidade ainda é desconhecido. Acrescido a este fato, a diferença do pH interior e exterior da célula pode determinar o mecanismo através do qual a atividade celular é influenciada pela concentração de íons hidrogênio.

Nos resultados de avaliação de pH deste estudo, todos os curativos de demora tiveram pH elevado nos diferentes períodos experimentais, menos o Hydropast+I, sugerindo que o iodofórmio parece prejudicar esta propriedade importante do hidróxido de cálcio. Assim, fica demonstrado que valores altos de pH são necessários para destruir os microrganismos usados neste estudo. Os materiais à base de hidróxido de cálcio tornam o interior dos canais radiculares em um meio impróprio para o desenvolvimento de microrganismos, já que torna o meio alcalino e bactérias precisam de um meio ácido para sobreviver e proliferar (38,39).

De acordo com a metodologia proposta e com base nos nossos resultados, podemos concluir que todos os curativos de demora testados possuem efeito antimicrobiano contra os microrganismos usados neste estudo, exceto o Hydropast+I que não apresentou efeito sobre o *Enterococcus faecalis*. E também que nos diferentes períodos experimentais o pH de todas as pastas à base de hidróxido de cálcio mostraram-se elevados, menos o pH do Hydropast+I que apresentou os menores resultados.

REFERÊNCIAS

1. Byström A, Sundqvist G (1981) Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 4, 321-328.
2. Byström A, Sundqvist G (1983) Bacteriologic evaluation of the effect of 0,5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Med Oral Pathol* 55, 307-312.
3. Byström A, Claesson R, Sundqvist G (1985) The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1, 170-175.
4. Byström A, Sundqvist G (1985) The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 18, 35-40.
5. Yared GM, Boudagher FE (1994) Influence of apical enlargement on bacterial infection during treatment of apical periodontitis. *J Endod* 20, 535-537.
6. Sundqvist G (1992) Ecology of the root canal flora. *J Endod* 18, 427-30.
7. Sjögren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G (1991) The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J*. 24, 119-125.

8. Law A, Messer H (2004) An evidence-based analysis of the antibacterial effectiveness of intracanal medicaments. *J Endod* 30, 689 –694.
9. Karim IE, Kennedy J, Hussey D (2007) The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 103, 560-569.
10. Foreman PC, Barnes IE (1990) Review of calcium hydroxide. *Int Endod J* 23, 283-297.
11. Bazin MJ, Prosser JI (1988) *Physiological models in microbiology*. Flórida, CRC press.
12. Kodukula PS, Prakasam TBS, Anthonisen AC (1988) Role of pH in biological wastewater treatment process. Apud Bazin MJ, Prosser JI. *Physiological models in microbiology*. Florida, CRC Press. 113-134p.
13. Neidhart FC (1990) *Physiology of the bacterial cell – a molecular approach*. Masschesutts, Ed. Sinaver. 226-46 p.
14. Nisengard RJ, Newman MG (1994) *Oral Microbiology and Immunology*. 2^a Ed. Philadelphia, Sauders. 477 p.
15. Safavi KE, Nichols FC (1993) Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod* 19, 76-78.
16. Safavi KE, Nichols FC (1994) Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod* 20, 127-129.

17. Estrela C. et al. (1992) Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide pastes. *Braz Dent J.* 10(2), 63-72.
18. Leonardo MR, Leonardo RT (2009) *Endodontia: conceitos biológicos e recursos tecnológicos.* São Paulo: Artes Médicas. 223-254p.
19. Leonardo MR (2005) Curativo de demora. In: Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares princípios técnicos e biológicos.* São Paulo: Artes Médicas. 997-1048 p.
20. Daniel RLDP, Jaeger MMM, Machado MEL (1999) Emprego do iodofórmio em endodôntia: revisão da literatura. *RPG* 6, 175-179.
21. Rezende TMB, Ruiz PA, Amorim RFB, Carvalho RA (2002) Aplicações terapêuticas do iodofórmio em endodontia. *RBO* 59, 280-283.
22. Barbosa CA, Gonçalves RB, Siqueira JF Jr, Uzeda M (1997) Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine and camphorated paramonochlorophenol as Intracanal Medicament. A Clinical and Laboratory Study. *J Endod* 23(5), 297-300.
23. Basrani B, Tjadhane L, Santos M, et AL (2003) Efficacy of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medicaments against *E. faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 96, 618-624.
24. Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M (1993) In vitro evaluation of effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. *Endod Dent Traumatol* 9, 249-253.

25. Lui JN, Sae-Lim V, Song KP, Chen NN (2004) In vitro antimicrobial effect of chlorhexidine-impregnated gutta percha points on *Enterococcus faecalis*. Int Endod J 37, 105-113.
26. Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru-Filho M, Bonifácio KC, Yto IY (2000) In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. J Endod 26, 391-394.
27. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T (1998) Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J 31, 1-7.
28. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U (1998) Microbiologic analysis of teeth failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 85, 86-93.
29. Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru-Filho M, Bonifácio KC, Ito IY (2001) In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. J Endod 27, 717-719.
30. Estrela C, Bammann LL, Sydney JB, Moura JA (1995) Efeito antibacteriano de pastas de hidróxido de cálcio sobre bactérias aeróbias facultativas. Revis Facul Odontol Bauru 3, 109-114.
31. Cwikla SJ, Bélanger M, Giguère S, Progulske-Fox A, Vertucci FJ (2005) Dentinal tubule disinfection using three hydroxide calcium formulation. J Endod 31, 50-52.
32. Murray PR (2006) Microbiologia Médica. 5ª edição. Editora Mosby Elsevier.
33. Orstavik D (1988) Antibacterial properties of endodontic materials. Int Endod J 2, 161-169.

34. Tobias RS (1988) Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. *Int Endod J* 21, 155–160.
35. Weiss E, Shalhav M, Fuss Z (1996) Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endod Dent Traumatol* 12, 179–184.
36. Estrela C, Bammann LL; Pimenta FC, et al. (2001) Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J* 34, 341-345.
37. Estrela C, Estrela C R Z, Moura J, Bammann LL (2000) Testing calcium hydroxide antimicrobial potential by different methods. *J Dent Res* 79, 529 p.
38. Siqueira JF Jr, Lopes HP, Uzeda M (1998) Recontamination of coronally unsealed root canals medicated with camphorated paramonochlorophenol or calcium hydroxide pastes after saliva challenge. *J Endod* 24, 11-14.
39. Siqueira JF Jr, Uzeda M (1998) Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *J Endod* 24, 663-665.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tema do nosso estudo foi escolhido porque a busca de um medicamento ideal para ser utilizado como curativo de demora tem gerado um número elevado de pesquisas, objetivando encontrar uma medicação que atue efetivamente sobre a variada microbiota dos sistemas de canais radiculares de dentes com lesão periapical crônica, como também, que desempenhe outras funções de interesse clínico, como ter ação anti-exudativa, ser indutor de mineralização, atuar como dissolvente dos restos orgânicos e que tenha condições de estimular o reparo apical e periapical²⁶.

Dentre as substâncias de escolha, destaca-se o hidróxido de cálcio, que, nos últimos anos, vem recebendo maior preferência por parte dos endodontistas americanos¹⁷, e é a medicação intracanal mais indicada por inúmeros autores^{16,18} para o tratamento de dentes despulpados.

Entretanto, surgiu desta forma, o interesse em avaliar novas pastas à base de hidróxido de cálcio que surgem rotineiramente no mercado odontológico com o objetivo de melhorar algumas propriedades físico-químicas, biológicas e microbiológicas que algumas destas pastas ainda carecem. As substâncias acrescentadas ao hidróxido de cálcio são os veículos, os radiopacificadores³⁰ ou ainda antimicrobianos.

As pastas à base de hidróxido de cálcio que não possuem em sua composição agentes que potencializam o seu poder antimicrobiano como o Calen, o UltraCal XS e o Hydropast, mostraram resultados satisfatórios no estudo de biocompatibilidade, no início apresentaram uma reação inflamatória e com o decorrer do período experimental demonstraram um tecido rico

em fibroblastos e feixes de fibras colágenas indicando reparação e portanto a biocompatibilidade dos produtos em questão.

No entanto, baseado na justificativa de que embora o hidróxido de cálcio apresente maior eficácia contra os microrganismos anaeróbios, no início da década de 90, Leonardo²⁵ (2005), voltou a preconizar o emprego da associação do hidróxido de cálcio com paramonoclorofenol canforado (PMCC), pois este apresenta maior atividade antibacteriana contra alguns anaeróbios facultativos, como os *Enterococcus faecalis*. Assim, as associações das duas substâncias iriam conferir um maior espectro de atividade antibacteriana. Já outros autores indicam a associação ao idofórmio^{10,41} para aumentar o poder antimicrobiano do hidróxido de cálcio principalmente em dentes com nítida lesão periapical crônica, que podem possuir microrganismos como o *Enterococcus faecalis* que são resistentes ao hidróxido de cálcio.

Na nossa análise do potencial antimicrobiano utilizando o teste de difusão em ágar com a confecção de poços preenchidos com o Calen, Calen PMCC, Hydropast, Hydropast+I e UltaCal XS, obtivemos como resultados que todas as pastas possuem atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados, exceto o Hydropast+I, que não apresentou efeito sobre o *Enterococcus faecalis*. Porém, este fato pode ser justificado pelas limitações que oferece esta metodologia, pois, dependendo das propriedades físico-químicas do material testado, da velocidade, da taxa de difusão, da quantidade do antimicrobiano em teste, da natureza do meio de cultura, da composição, do pH e da espessura do meio, os resultados podem sofrer alterações³⁵.

A avaliação do pH também é muito importante pois, segundo Estrela et al.¹³ (1994) o pH possui um efeito biológico na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. A análise de uma variedade de fatores isolados correlacionando pH e a atividade de enzimas bacterianas e teciduais, permitiu levantar a hipótese de que o hidróxido de cálcio poderia inativar as enzimas bacterianas de modo irreversível ou definitivo, quando em condições extremas de pH em longos períodos de tempo. Porém, caso o pH retornasse a valores ideais à ação enzimática, a inativação desta seria reversível ou temporária retornando a sua atividade normal. Portanto, o hidróxido de cálcio apresenta duas grandes propriedades enzimáticas: a de inibir as enzimas bacterianas, levando ao efeito antibacteriano e a de ativar as enzimas teciduais, como a fosfatase alcalina, gerando o efeito mineralizador.

Nossos resultados de avaliação do pH demonstraram que todas as pastas testadas, Calen, Calen PMCC, Hydropast, Hydropast+I e UltraCal XS, apresentaram altos valores do pH nos diferentes períodos experimentais, exceto a pasta Hydropast+I, que apresentou os menores valores, sugerindo que o iodofórmio pode prejudicar esta propriedade do hidróxido de cálcio necessitando, portanto, de estudos complementares.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

1. Allard U, Stromberg U, Stromberg T. Endodontic treatment of experimentally induced apical periodontitis in dogs. *Endod Dent Traumatol.* 1987; 3: 240-4.
2. Basrani B, Ghanem A, Tjäderhane L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. *J Endod.* 2004; 30: 413-7.
3. Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod J.* 1997; 30: 155-9.
4. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res.* 1981; 4: 321-8.
5. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0,5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Med Oral Pathol.* 1983; 55: 307-12.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site:

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

6. Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J.* 1985; 18: 35-40.
7. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected roots canals. *Endod Dent Traumatol.* 1981; 1: 170-5.
8. Caliskan MK, Türkün M. Effect of calcium hydroxide as intracanal dressing on apical leakage. *Int Endod J.* 1998; 31:173-7.
9. Chong BS, Pitt Ford TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J.* 1992; 25: 97-106.
10. Cwikla SJ, Bélanger M, Giguère S, Progulske-Fox A, Vertucci FJ. Dentinal tubule disinfection using three hydroxide calcium formulation. *J Endod.* 2005; 31: 50-2.
11. Dwyer TG, Torabinejad M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. *J Endod.* 1981; 7: 31-5.
12. Estrela C, Pesce HF. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide pastes in the presence of connective tissue of the dogs. Part I. *Braz Dent J.* 1996; 7: 41-6.

13. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Jr O. Estudo do efeito biológico do pH na atividade de enzimática de bactérias anaeróbicas. Rev Fac odontol Bauru. 1994; 2: 31-8.
14. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Jr O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. Braz Dent J. 1995; 6: 85-90.
15. Foreman PC, Barnes IE. Review of calcium hydroxide. Int Endod J. 1990; 23: 283–97.
16. Frank AL. Therapy for the divergent pulpess tooth by continued apical formation. J Amer Dent Assoc. 1966; 72: 87-93.
17. Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M. *In vitro* evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. Endod Dent Traumatol. 1993; 9: 249-53.
18. Harrison JW, Madonia JV. The toxicity of parachlorophenol. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1971; 32: 90-9.
19. Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. J Endod. 1988; 14: 125-7.
20. Heling I, Steinberg D, Kenig S, Gavrilovich I, Sela MN, Friedman M. Efficacy of a sustained release device containing chlorhexidine and Ca(OH)₂ in

- preventing secondary infection of dentinal tubules. *Int Endod J.* 1992; 25: 20–4.
21. Hermann BW. Calcium hydroxide als mittel zum behandein und fuëllen Von Zahnwurzelkanaèlen (Dissertation). WuÈ rzburg, Med. Diss. 1920: 29.
 22. Holland R. Histochemical response of amputed pulps to calcium hydroxide. *Rev Bras Pesq Med Biol.* 1971; 4: 83-95.
 23. Holland R, Souza V, Mello W, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni- Filho JA. A histological of the study of the effect of calcium hydroxide in the treatment of pulpess teeth of dogs. *J Brit Endod Soci.* 1979; 12: 15-23.
 24. Leonardo MR. Contribuição para o estudo dos efeitos da biomecânica e da medicação tópica na desinfecção de canais radiculares [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara; 1965.
 25. Leonardo MR. Endodontia: tratamento de canais radiculares. Princípios técnicos e biológicos. 1ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 2005.
 26. Leonardo MR, Leonardo RT. Endodontia: conceitos biológicos e recursos tecnológicos. São Paulo: Artes Médicas; 2009.
 27. Leonardo MR. Endodontia: tratamento de canais radiculares. Princípios técnicos e biológicos. 1ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 2008.
 28. Leonardo MR, Hernandez MEFT, Silva LAB, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a

- histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 680-5.
29. Lopes HP, Siqueira Jr JF. *Endodontia: biologia e técnica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. 650 p.
 30. Manna FF. *Avaliação quantitativa da presença de remanescentes de hidróxido de cálcio associado a diferentes veículos após a fase de remoção da medicação intracanal [Dissertação Mestrado].* Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2009.
 31. Manzur A, Gonzalez AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periperiodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod.* 2007; 33: 114-8.
 32. Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Ptakada H, Nakaoga S, Torri M. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis *J Endod.* 1999; 25: 795-9.
 33. McGee JOD, Isaacson PG, Wright NA. *Oxford textbook of pathology. Principles of pathology.* Oxford: Oxford University Press; 1992. 895p.
 34. Murakami T, Murakami H, Ramp WK, Hudson MC, Nousiainen MT. Calcium hydroxide ameliorates tobramycin toxicity in cultured chick tibiae. *Bone.* 1997; 21: 411-8.

35. Murray PE, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007; 12: 258-66.
36. Nelson-Filho P, Silva LAB, Leonardo MR, Utrilla LS, Figueiredo F. Connective tissue responses to calcium hydroxide based root canal medicaments. *Int Endod J*. 1999; 32: 303–11.
37. Olsen MH, Difiore PM, Dixit SN, Veis AS. The effects of calcium hydroxide inhibition on LPS induced release of IL-1 β from human monocytes in whole blood. *J Endod*. 1999; 25: 289.
38. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol*. 1990; 6: 142-9.
39. Özcelik B, Tasman F, Ogan C. A comparison of the surface tension of calcium mixed with different vehicles. *J Endod*. 2000; 26: 500-2.
40. Pitts DL, Williams BL, Morton-Junior TH. Investigation of the role endotoxin in periapical inflammation. *J Endod*. 1982; 8: 10-5.
41. Rezende TMB, Ruiz PA, Amorim RFB, Carvalho RA. Aplicações terapêuticas do iodofórmio em endodontia. *RBO*. 2002; 59: 280-3.
42. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sc Am*. 1992; 267: 26-33.

43. Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod.* 1993; 19: 76-8.
44. Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod.* 1994; 20: 127-9.
45. Silva LAB, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod.* 2002; 28: 94-8.
46. Siqueira JF Jr, Lopes HP, Uzeda M. Recontamination of coronally unsealed root canals medicated with camphorated paramonochlorophenol or calcium hydroxide pastes after saliva challenge. *J Endod.* 1998; 24: 11-4.
47. Siqueira Jr JF, Lopes HP, Magalhães FAC, Uzeda M. Atividade antibacteriana da pasta de hidróxido de cálcio/PMCC glicerina contendo diferentes proporções de iodofórmio sobre bactérias anaeróbicas estritas e facultativas. *Rev Paul Odontol.* 1997; 19: 17-21.
48. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, Bonetti-Filho I, Silva LAB. Effect of different irrigations solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J.* 2003; 36: 733-9.
49. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LAB. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *J Endod.* 2002; 28: 295-9

50. Yared GM, Boudagher FE. Influence of apical enlargement on bacterial infection during treatment of apical periodontitis. *J Endod.* 1994; 20: 535-7.

ANEXO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Faculdade de Odontologia

Campus de Araraquara

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA


CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nr. 15/2009 referente à pesquisa "Avaliação da reação histológica provocada por diferentes curativos de demora à base de hidróxido de cálcio em tecido subcutâneo de ratos" sob a responsabilidade do Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho , Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri e da acadêmica Carolina Andolfatto, está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP em reunião de 09/11/2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocolo 15/2009 referring to the research "Evaluation of histological reaction caused by different intracanal medication of calcium hydroxide in the subcutaneous tissue of rats" under responsibility of Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho , Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri and Carolina Andolfatto in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Araraquara Dental School-UNESP Ethical Committee for Animal Research (CEUA) in November 09th, 2011.

Araraquara, 10 de Novembro de 2011


Prof. Dra. Eleny Zanella Balducci
Coordenadora da CEUA/FOAr/UNESP

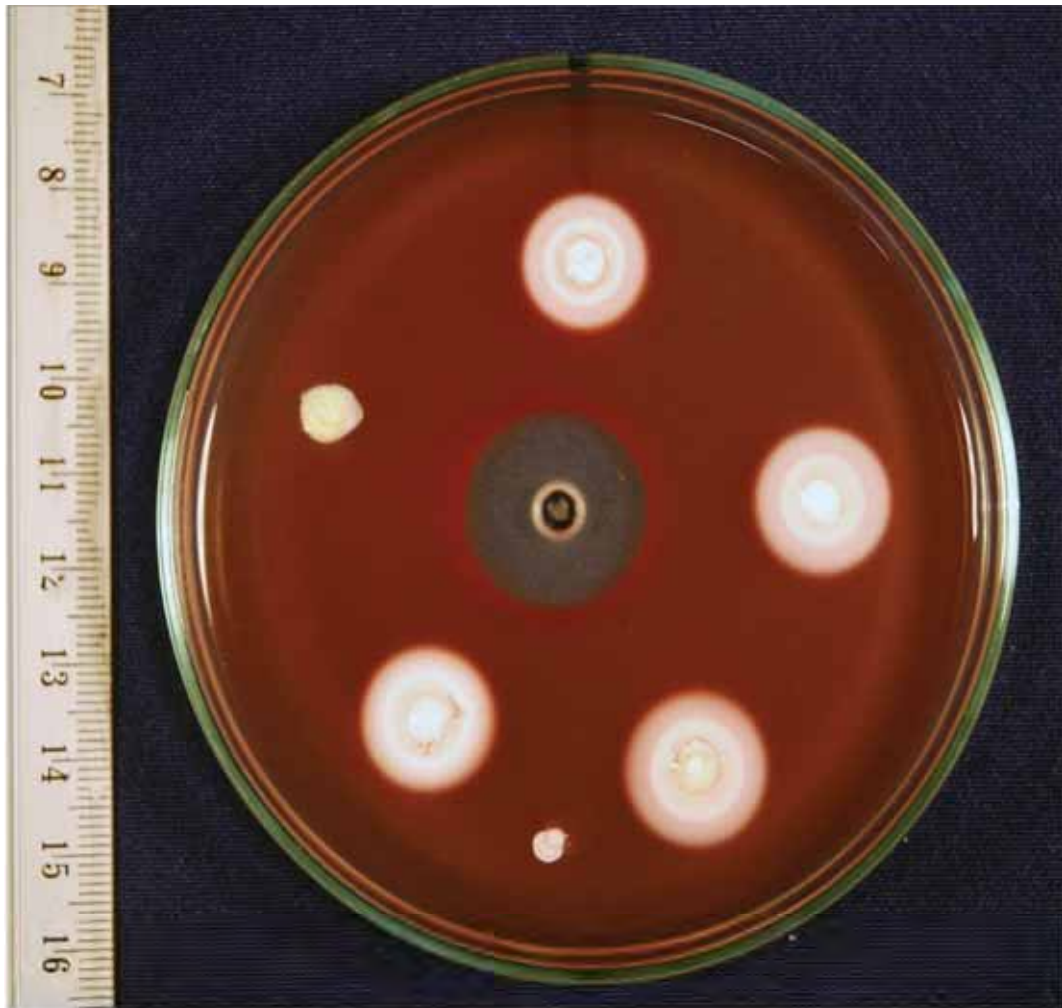


Figura 1- Halos de inibição sobre *Enterococcus Faecalis*

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 30 de março de 2011.

CAROLINA ANDOLFATTO

