

Ação Antimicrobiana de Materiais Empregados na Obturação dos Canais de Dentes Decíduos por Meio da Difusão em Ágar: Estudo *in vitro*

Antimicrobial Action of Root Canal Filling Materials for Primary Teeth using the Agar Diffusion Method: an *In Vitro* Study

Fabiane PIVA^I, Italo Medeiros FARACO JUNIOR^{II}, Carlos Alberto FELDENS^{III}, Cyntia Rodrigues de Araújo ESTRELA^{IV}

^IProfessora das Disciplinas de Clínica Infantil I, II e III e Bases Conceituais em Ortodontia da Universidade Luterana do Brasil, Cachoeira do Sul/RS, Brasil.

^{II}Professor das Disciplinas de Clínica Infantil I e II e Bases Conceituais em Ortodontia da Universidade Luterana do Brasil, Canoas/RS, Brasil.

^{III}Professor da Disciplina de Odontologia e Sociedade III da Universidade Luterana do Brasil, Canoas/RS, Brasil.

^{IV}Mestre em Microbiologia pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTESP), Goiânia/GO, Brasil.

RESUMO

Objetivo: Avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana de materiais obturadores de canais radiculares de dentes decíduos por meio da difusão em ágar.

Método: Os materiais testados foram: pasta Guedes-Pinto, pasta CTZ, OZE, Calen[®], L&C[®] e MTA. Foi utilizada uma mistura microbiana composta por: *Staphylococcus aureus* - ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* - ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853, *Bacillus subtilis* - ATCC 6633, *Candida albicans* - ATCC 10231. Foram utilizadas placas de Petri, contendo BHI ágar inoculadas com 0,1mL da mistura microbiana, nas quais foram confeccionadas cavidades no ágar, sendo estas preenchidas com as respectivas pastas. A leitura dos halos de inibição (mm) foi realizada após 48h/37°C e os resultados submetidos aos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

Resultados: as pastas CTZ e Guedes-Pinto apresentaram halos de inibição estatisticamente maiores que os demais materiais ($p < 0,001$). A L&C[®] e o MTA não apresentaram halos de inibição.

Conclusão: as pastas Guedes-Pinto, CTZ, Calen[®] e o OZE apresentaram ação antimicrobiana por difusão.

ABSTRACT

Objective: To evaluate *in vitro* the antimicrobial action of root canal filling materials for primary teeth using the agar diffusion method.

Method: The tested materials were Guedes-Pinto paste, CTZ paste, ZOE, Calen[™] paste, L&C[™] and MTA. A microbial mixture composed of the following microorganisms was used: *Staphylococcus aureus* – ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* – ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC 27853, *Bacillus subtilis* – ATCC 6633 and *Candida albicans* - ATCC 10231. Petri dishes containing BHI agar inoculated with 0.1 mL of the microbial mixture were used. After solidification of the culture medium, wells were prepared and immediately filled with the respective pastes. The diameter (mm) of the zones of microbial growth inhibition formed around the wells was measured after 48 h at 37°C and the results were analyzed by the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests.

Results: The CTZ and Guedes-Pinto pastes presented significantly larger microbial growth inhibition zones than the other materials ($p < 0.001$). L&C[™] and MTA did not present inhibition zones.

Conclusion: The CTZ, Guedes-Pinto and Calen[™] pastes and ZOE cement presented antimicrobial action by diffusion.

DESCRITORES

Dente decíduo; Tratamento do canal radicular; Microbiologia.

DESCRIPTORS

Deciduous tooth; Root canal therapy; Microbiology.

INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico de dentes decíduos, também denominado de pulpectomia, tem como passos principais a instrumentação, a irrigação e o preenchimento dos canais com um material obturador. Diferentes técnicas de tratamento e medicamentos são propostos na literatura para promover a limpeza e a sanificação dos canais radiculares de dentes decíduos^{1,2}.

No entanto, a peculiar conformação e a topografia dos canais radiculares dos dentes decíduos com curvaturas acentuadas e uma grande quantidade de canais acessórios dificultam o acesso e a instrumentação desses dentes^{3,4}. Além do aspecto anatômico, o processo de rizólise em dentes decíduos ocorre de maneira irregular e nem sempre é detectado radiograficamente. Esse fato faz com que haja dificuldade de se estabelecer um limite apical tanto para a instrumentação quanto para a obturação dos canais, havendo a possibilidade de lesar o periodonto e atingir o germe do dente permanente^{5,6}. O extravasamento de materiais com propriedades não biocompatíveis e não reabsorvíveis também pode afetar as estruturas periapicais e ocasionar a sua permanência no tecido ósseo ou gengival mesmo após a esfoliação do dente decíduo^{7,8}.

Frente a essas características dos dentes decíduos que dificultam a manipulação dos canais, o sucesso do tratamento endodôntico depende de meios que proporcionem a redução ou a eliminação das bactérias não só nos canais radiculares, mas também nos locais em que o preparo químico-mecânico não obteve acesso. Considerando-se estas limitações, a utilização de pastas obturadoras com capacidade antimicrobiana representa um dos aspectos mais importantes para obtenção do sucesso da terapia endodôntica. Além disso, a manutenção das condições de limpeza e de sanificação obtidas durante a instrumentação dos canais são, no decorrer do tempo, mantidas graças não só aos medicamentos contidos no material obturador como também na ação terapêutica de seus componentes no interior do canal. Dentre as características ideais das pastas obturadoras de canais radiculares de dentes decíduos descritas por diferentes autores, destaca-se a capacidade antimicrobiana destes materiais para que se possa obter o sucesso no tratamento endodôntico⁸.

Tendo em vista a importância desta característica, o presente estudo avaliará *in vitro* a capacidade antimicrobiana de seis materiais utilizados como obturadores de canais de dentes decíduos diante de uma mistura microbiana, por meio do método da difusão em ágar.

METODOLOGIA

No presente estudo, foi utilizada uma mistura microbiana composta pelos microrganismos

Staphylococcus aureus - ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* - ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853, *Bacillus subtilis* - ATCC 6633, *Candida albicans* - ATCC 10231. Todas estas cepas isoladas e identificadas pela *American Type Culture Collection* (ATCC), cultivadas e mantidas viáveis no Centro de Ensino e Pesquisa Odontológica (CEPO) em Goiânia/GO.

A preservação das culturas microbianas foi realizada no meio *Brain Heart Infusion* ágar - BHIA (Difco Laboratories, Detroit, USA, lote 0350004). Após 24 horas de incubação à temperatura de 37°C, células microbianas foram suspensas em solução fisiológica a 0,9% (Halex Istar, Goiânia, GO, Brasil) esterilizada. A suspensão de cada cepa microbiana foi ajustada à turvação do tubo nº1 da escala de MacFarland, na concentração aproximada de 3×10^8 células por mL. Para o preparo da mistura microbiana, um inóculo de 1 mL retirado de cada suspensão microbiana foi transferido para um mesmo tubo de ensaio esterilizado, obtendo-se, assim, a mistura teste. A mistura foi utilizada imediatamente após o seu preparo.

Os materiais testados foram: pasta Guedes-Pinto, pasta CTZ, pasta Calen®, pasta L&C®, óxido de zinco e eugenol e MTA. Foram utilizadas 18 placas de Petri com 90mm de diâmetro esterilizadas, nas quais foram vertidos 20 mL do meio BHIA (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA, lote 0350004) esterilizado (1 ATM, 121°C - 20 minutos, Autoclave horizontal, Lister) e resfriado, assim promovendo uma espessura de 4mm de meio de cultura, por placa. A contaminação do meio foi realizada com um inóculo de 100 µL da mistura, utilizando *swabs* descartáveis e estéreis (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil).

Foram realizados orifícios na superfície do ágar com auxílio de perfuradores esterilizados (anéis de cobre), que promoveram cavidades de 4mm de diâmetro. Logo após, os materiais foram manipulados e colocados nas cavidades (4mm x 4mm) preenchendo-as completamente. Após o preenchimento das cavidades com os respectivos materiais, as placas permaneceram 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram transferidas para estufa bacteriológica permanecendo incubadas a 37°C por 48 horas.

Os diâmetros das zonas de inibição do crescimento microbiano foram medidos com auxílio de um paquímetro milimetrada e anotados para serem posteriormente apresentados como resultados.

Foi realizado um controle positivo no qual foi utilizada uma placa contaminada com a mistura microbiana teste para verificar a viabilidade dos microrganismos e um controle negativo, no qual foi utilizada uma placa não contaminada e com as cavidades. Em todas as etapas do experimento, a técnica asséptica foi valorizada, os ensaios conduzidos pelo mesmo operador, e os testes efetuados em dez repetições.

Para a análise dos dados foi utilizado o *software Statistical Package for Social Sciences* 8.0, que descreveu

as médias, os valores mínimos e máximos e os desvios-padrão da variável tamanho do halo de acordo com o material utilizado para o método de difusão. Para verificar a presença de diferença estatisticamente significativa entre os materiais e o tamanho do halo foi empregado o teste Kruskal-Wallis e o teste Mann-Whitney com correção de Bonferroni.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta o tamanho dos halos de inibição.

Tabela 1: Tamanho dos halos (mm) de inibição microbianos com o método de difusão em ágar.

Material	Tamanho do Halo			
	Mínimo	Máximo	Média	Desvio-Padrão
Guedes-Pinto	15	21	18,6	2,63
CTZ	18	21	19,4	0,84
OZE	11	11,5	11,2	0,24
Calen®	6	7	6,6	0,32
MTA	0	0	0	0
L&C®	0	0	0	0

Kruskal-Wallis e Mann-Whitney com correção de Bonferroni.

O teste de Kruskal-Wallis demonstrou que houve diferença significativa em relação ao tamanho do halo de inibição entre os materiais testados ($p < 0,001$). O teste de Mann-Whitney foi aplicado para identificar que materiais diferiram entre si, não participando desta análise o MTA e L&C®, por não terem apresentado halos de inibição. Para diminuir a possibilidade de erro do Tipo I, foi aplicada a correção de Bonferroni, assim, estabeleceu-se um novo valor do $p = 0,008$. O maior halo de inibição entre os materiais testados foi apresentado pelas pastas Guedes-Pinto e CTZ que foi significativamente maior em relação às demais ($p < 0,001$). As pastas Guedes-Pinto e CTZ, por sua vez, não apresentaram diferença significativa entre si. O OZE, por sua vez, apresentou halos de inibição significativamente maiores que os da pasta Calen® ($p < 0,001$).

DISCUSSÃO

A terapia pulpar na dentição decídua continua sendo um assunto bastante estudado, em especial as características dos materiais utilizados nos tratamentos endodônticos. Dentre elas, a capacidade antimicrobiana desses materiais tem papel decisivo no saneamento dos canais radiculares, tendo em vista a conformação e a topografia do sistema de canais dos dentes decíduos e suas ramificações demonstrada na literatura por diversos autores³⁻⁶.

Sabe-se que a realização de um estudo experimental *in vitro* tem limitações quanto à transposição dos resultados para a prática clínica. No entanto, permite controlar alguns fatores que não seriam possíveis em um estudo *in vivo*.

Quanto à análise do método empregado no presente estudo, optou-se por avaliar a ação dos materiais obturadores testados diante do método de difusão em ágar, por ser um modelo experimental efetivo e de fácil execução, amplamente utilizado e descrito na literatura, inclusive nos estudos que avaliaram a ação antimicrobiana de pastas obturadoras de canais de dentes decíduos⁹⁻¹³. No entanto, esse método é quantificado pelo halo de inibição bacteriano, porém, o tamanho do halo formado não necessariamente representa o potencial antimicrobiano de um material, uma vez que substâncias com diferente solubilidade e difusibilidade podem não expressar o seu real poder antimicrobiano por meio desse método¹⁴.

A escolha dos microrganismos do estudo, como indicadores da ação antimicrobiana, foi embasada por estudos da microbiota dos canais radiculares infectados¹⁵⁻¹⁷. Optou-se por utilizar somente a mistura microbiana por se aproximar mais das condições dos canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar e lesão periapical, uma vez que estes parecem apresentar uma microbiota polimicrobiana^{17,18}.

Quanto aos resultados obtidos com a pasta Guedes-Pinto, estes demonstraram que houve grande difusibilidade no meio semi-sólido, apresentando os segundos maiores halos de inibição bacteriana do estudo. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos que testaram a efetividade antimicrobiana da pasta Guedes-Pinto, embora estes tenham utilizado técnicas laboratoriais diferentes e cepas microbianas isoladas^{11,12}. Pesquisa prévia¹³ revelou que o halo obtido pela pasta Guedes-Pinto frente a uma mistura microbiana semelhante foi inferior ao encontrado no presente estudo. Cabe novamente salientar que o tamanho do halo de inibição formado nem sempre expressa o real potencial antimicrobiano de uma substância. Em função de se utilizar uma mistura de microrganismos e não cepas isoladas questionou-se se um ou outro microrganismo contido na mistura não poderia apresentar resistência a referida pasta ou a algum de seus componentes. Para que esta dúvida possa ser esclarecida, o mesmo método deveria ser aplicado com a pasta Guedes-Pinto diante de cepas microbianas isoladas, assim podendo se estabelecer a resistência de um determinado microrganismo à pasta.

Ao se avaliar a pasta CTZ, observou-se que ela apresentou os maiores halos de inibição no presente estudo. Os resultados obtidos com a pasta CTZ neste estudo não surpreenderam, uma vez que esta pasta é composta por dois antibióticos de amplo espectro de ação (tetraciclina e cloranfenicol) e pelo óxido de zinco e eugenol que também apresenta ação antimicrobiana. Estudo

prévio¹³ apresentou resultados semelhantes para essa mesma pasta utilizando uma metodologia semelhante. A pasta CTZ, apesar de poucos estudos descritos na literatura é preconizada como material obturador dos canais radiculares de dentes decíduos por Faculdades de Odontologia Brasileiras^{19,20}. No entanto, o uso clínico desta pasta requer maiores estudos para que se possam identificar outras propriedades essenciais para uma pasta obturadora de canais radiculares de dentes decíduos, tais como a biocompatibilidade aos tecidos periapicais e a proporção ideal de seus componentes para tornar a pasta menos citotóxica possível sem perder sua capacidade antimicrobiana.

Quanto aos resultados obtidos com o óxido de zinco e eugenol (OZE), os halos formados foram semelhantes aos encontrados na literatura^{10,13}. Muito embora o OZE ainda seja o material mais utilizado nos tratamentos endodônticos de dentes decíduos nos Estados Unidos e o segundo material de escolha para o mesmo fim nas Faculdades de Odontologia Brasileiras, ele deixa a desejar quanto às características ideais de um material obturador para dentes decíduos^{19,21}. Isso se deve à ausência de compatibilidade biológica desse material, alto poder irritante aos tecidos periapicais e devido ao fato dele não acompanhar a rizólise do dente decíduo. Esses aspectos fazem com que o uso do óxido de zinco e eugenol seja questionado como material obturador em Odontopediatria^{7,22,23}.

Quanto ao hidróxido de cálcio, certamente dentre os materiais testados neste estudo, é o que dispõe de um número maior de publicações referentes à sua ação antimicrobiana^{13,14,24,25}. No presente estudo, utilizou-se o hidróxido de cálcio em duas composições comercializadas prontas: a pasta Calen[®], que é basicamente composta por hidróxido de cálcio e polietilenoglicol 400, e a pasta L&C[®], também composta por hidróxido de cálcio utilizando como veículo o óleo de oliva. O desempenho da pasta Calen[®] foi semelhante ao reportado na literatura¹⁴, apresentando halos de inibição que variaram entre 6 e 7mm. Todavia, outro estudo²⁶ verificou que os menores halos de inibição do seu experimento foram formados pela pasta Calen[®]. A pasta L&C[®] apresentou resultados desfavoráveis no método testado. Em um estudo realizado em dentes decíduos de cães, no qual foi testada histologicamente diferentes pastas, dentre elas, a pasta L&C, os resultados demonstraram ausência de compatibilidade biológica dessa pasta diante a metodologia empregada²⁷.

Quanto às pastas contendo hidróxido de cálcio, independente do veículo utilizado neste estudo, a pequena ação antimicrobiana do referido material diante da difusão pode estar relacionada com as próprias limitações desse método. Uma vez que o hidróxido de cálcio apresenta baixa solubilidade e difusibilidade no ágar não seria de se esperar um melhor desempenho *in vitro* desse material²⁶.

O MTA apresentou resultados semelhantes ao encontrado na literatura demonstrando apenas um pequeno

halo de difusão no ágar, não inibindo o crescimento microbiano^{24,28}. Entretanto, resultados diferentes foram encontrados²⁹ os quais evidenciaram zonas de inibição microbiana do MTA. De acordo com os resultados deste estudo, observou-se que a pasta CTZ obteve o melhor desempenho diante os microrganismos testados, e a pasta L&C[®] apresentou os resultados menos favoráveis.

Acredita-se que estudos futuros deverão ser realizados para que se possa estabelecer um material que consiga apresentar o maior número de características que se aproximem das ideais para a utilização na obturação dos canais de dentes decíduos.

CONCLUSÕES

- 1) As pastas Guedes-Pinto, CTZ, Calen[®] e o óxido de zinco e eugenol apresentaram ação antimicrobiana pelo método de difusão em ágar;
- 2) O MTA e a pasta L&C[®] não apresentaram ação antimicrobiana pelo método de difusão em ágar.

REFERÊNCIAS

1. Guedes-Pinto AC, Paiva JG, Bozzola JR. Tratamento endodôntico de dentes decíduos com polpa mortificada. Rev Assoc Paul Cir Dent 1981; 35(3):240-5.
2. Bengtson AL, Bengtson NG, Guedes-Pinto AC. Permeabilidade dentinária de dentes decíduos. RGO 1995; 33(3):195-201.
3. Hibbard ED, Ireland RL. Morphology of root canal of the primary molar teeth. J Den Child 1957; 24(4):250-7.
4. Toledo OA. A topografia canalicular do dentes decíduos como contra-indicação do tratamento de canais. Rev Assoc Paul Cir Dent 1961; 15(1):24-8.
5. Benfatti SV, Andrioni JN, Toledo OA. Estudo morfológico dos ápices radiculares de molares decíduos. Arq Cent Estud Odontol UFMG 1967; 4(1):7-16.
6. Sheffer OL, Storrer DLM, Lopes MN. Avaliação da possibilidade do preparo biomecânico dos condutos radiculares em molares decíduos. Dens 1973; 1:147-53.
7. Russo MC, Holland R, Nery RS. Periapical tissue reactions of deciduous teeth to some root canal filling materials: histological study in dog. Rev Fac Odontol Araçatuba 1976; 5(1-20):163-77.
8. Rifkin A. A simple, effective, safe technique for the root canal treatment of abscessed primary teeth. J Dent Child 1980; 47(6):435-41.
9. Guedes-Pinto AC, Querido NBG, Basile Neto J. Estudo do efeito residual sobre microrganismos, de diferentes pastas, utilizadas para "obturações de canais" de dentes decíduos. Rev Fac Odontol São Paulo 1976; 14(2):253-8.
10. Tchaou WS, Turng BF, Minah GE, Coll JA. In vitro inhibition of bacteria from root canals of primary teeth by various dental materials. Pediatr Dent 1995; 17(5):351-5.
11. Bonow MLM, Guedes-Pinto AC, Bammann LL. Antimicrobial activity of drugs used in pulp therapy of deciduous teeth. Braz Endod J 1996; 1(1):44-8.
12. Silva CM, Candelária LFA, Bombana AC. Estudo comparativo da ação antimicrobiana entre cinco pastas de obturação de canais radiculares de dentes decíduos. J Bras Odontopediatr Odontol Bebê 2002; 5(28):502-10.

13. Amorim LFG, Toledo OA, Estrela CRA, Decurcio DA, Estrela C. Antimicrobial analysis of different root canal filling pastes used in pediatric dentistry by two experimental methods. *Braz Dent J* 2006; 17(4):317-22.
14. Estrela C, Estrela CRA, Bammann LL, Pecora JD. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. *J Endod* 2001; 27(12):720-3.
15. Cohen MM, Jores SM, Calisti LP, Mass B. Bacteriologic study of infected deciduous molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1960; 13:1382-6.
16. Marsh SJ, Largent MD. A bacteriological study of the pulp canals of infected primary molars. *J Dent Child* 1967; 34(6):460-70.
17. Silva LAB, Nelson-Filho P, Faria G, Souza-Gugelmin MCM, Ito IY. Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesion. *Braz Dent J* 2006; 17(2):144-8.
18. Pazelli LC, Freitas AC, Ito IY, Souza-Gugelmin MCM, Medeiros AS, Nelson Filho P. Prevalence of microorganisms in root canals of human deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. *Pesqui Odontol Bras* 2003; 17(4):367-71.
19. Kramer PF, Faraco Junior IM, Feldens CA. Estado atual da terapia pulpar nas Universidades Brasileiras - Pulpotomia e pulpectomia em dentes decíduos. *J Bras Odontopediatr Odontol Bebê* 2000; 3(3):222-30.
20. Corrêa Brusco EH, Perussolo B, Scapin HLC, Ferreira SLM. Procedimentos e substâncias empregadas por Faculdades de Odontologia Brasileiras na terapia endodôntica de dentes decíduos pulpectomizados. *J Bras Odontopediatr Odontol Bebê* 2002; 5(23):35-46.
21. Primosch RE, Glomb TA, Jerrell RG. Primary tooth pulp therapy as taught in predoctoral pediatric dental programs in the United States. *Pediatr Dent* 1997; 19(2):118-22.
22. Sadrian R, Coll JA. A long-term followup on the retention rate of zinc oxide eugenol filler after primary tooth pulpectomy. *Pediatr Dent* 1993; 15(4):249-52.
23. Mani SA, Chawla HS, Tewari A, Goyal A. Evaluation of calcium hydroxide and zinc oxide eugenol as root canal filling materials in primary teeth. *J Dent Child* 2000; 67(2):142-7.
24. Estrela C, Bammann LL, Estrela CRA, Silva RS, Pecora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, portland cement, calcium hydroxide paste, sealapex and dycal. *Braz Dent J* 2000; 11(1):3-9.
25. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Garrido FD, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *J Endod* 2002; 28(11):758-61.
26. Estrela C, Pécora JD, Souza-Neto MD, Estrela CRA, Bammann LL. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide pastes. *Braz Dent J* 1999; 10:63-72.
27. Murata SS, Holland R, Souza V, Dezan Junior E, Grossi JA, Percinoto C. Histological analysis of the periapical tissues of dog deciduous teeth after root canal filling with different materials. *J Appl Oral Sci* 2005; 13:318-324.
28. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. *J Endod* 1995; 21(8):403-6.
29. Stowe TJ, Sedgley CM, Stowe B, Fenno JC. The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2004; 30(6):429-31.

Recebido/Received: 05/03/08
 Revisado/Reviewed: 10/07/08
 Aprovado/Approved: 18/08/08

Correspondência:

Fabiane Piva
 Rua Andrade Neves, 585 - Bairro Barcelos
 Cachoeira do Sul/RS CEP: 96508-021
 Telefone: (51) 9245-8839
 E-mail: fabi.piva@ig.com.br