

Avaliação da ação antimicrobiana de quatro formulações a base de hidróxido de cálcio utilizadas como medicação intracanal

Evaluation of the antimicrobial action of four calcium hydroxide-based formulations as intracanal medication

Elias Pandonor Motcy de Oliveira*
Luis Eduardo Duarte Irala**
Alessandra Rodrigues dos Santos***
Tiago André Fontoura de Melo****

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar, por meio do método de difusão em BHI ágar, a ação antimicrobiana de quatro formulações a base de hidróxido de cálcio utilizadas como medicação intracanal. Para tanto foram utilizadas três cepas microbianas: *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Com base na análise dos resultados, por meio do teste estatístico Kruskal-Wallis complementado pelo teste de comparações múltiplas ao nível de significância de 5%, foi constatado que o Calen® com ou sem PMCC e o Hydrocal® sem iodofórmio apresentaram ação antimicrobiana contra as três culturas empregadas sem haver diferença estatística significativa. Hydrocal® com iodofórmio não teve ação contra as culturas de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*, somente contra *Bacillus subtilis*.

Palavras-chave: Endodontia. Resistência microbiana a medicamentos. Hidróxido de cálcio.

Introdução

A presença de micro-organismos no interior do canal radicular é um dos fatores determinantes do fracasso do tratamento endodôntico. Aliado a isso, a complexidade presente muitas vezes no interior do sistema de canais, com a presença de istmos, ramificações, reentrâncias e túbulos dentinários, também é um obstáculo para a correta limpeza e sanificação.

Segundo Byström e Sundquist¹ (1981), a presença dessas alterações ao longo do canal radicular propicia um local de proteção aos micro-organismos diante da ação do preparo químico-mecânico. Assim, o emprego de uma medicação intracanal torna-se necessário como medida auxiliar à etapa de preparo para o controle das infecções endodônticas². Em razão disso, a odontologia vem realizando inúmeros estudos com diferentes formulações e medicações intracanaís na busca de um fármaco que proporcione melhores propriedades antimicrobianas e seja biologicamente compatível.

O hidróxido de cálcio há muito tempo vem sendo a medicação de primeira escolha na terapia endodôntica. No entanto, a literatura enfatiza a resistência de alguns micro-organismos à ação deste fármaco^{3,4}. Alguns estudos, como os de Siqueira Jr. et al.⁵ (1997), Dotto et al.² (2006), Manzur et al.⁶ (2007) e Mohammadi e Abbott⁷ (2009), verificaram

* Doutor em Endodontia, professor do curso de Odontologia da Ulbra - RS.

** Mestre em Endodontia, professor do curso de Odontologia da Ulbra - RS.

*** Aluna do curso de graduação em Odontologia da Ulbra - RS.

**** Mestre em Endodontia pela Ulbra - RS.

que a associação do hidróxido de cálcio a outros fármacos apresentou melhores resultados antimicrobianos.

Por esses motivos, justifica-se a preocupação com a realização de novos estudos na busca de um fármaco que seja mais efetivo contra a microbiota existente no interior de canais radiculares infectados. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação antimicrobiana de dois produtos comerciais a base de hidróxido de cálcio puro ou associado ao paramonoclorofenol canforado (PMCC) ou ao iodofórmio sobre cepas microbiológicas, comumente encontradas em canais infectados.

Materiais e método

A análise da ação antimicrobiana das substâncias testadas foi realizada pelo método de difusão junto ao meio de cultura brain heart infusion ágar (BHI ágar, DIFCO®, Maryland, EUA).

As medicações intracanal analisadas foram (Fig. 1):

- A = Calen® (SS White, Rio de Janeiro - RJ, Brasil) – hidróxido de cálcio;
- B = Calen® com PMCC (SS White, Rio de Janeiro - RJ, Brasil) – hidróxido de cálcio associado ao paramonoclorofenol canforado;
- C = Hydrocal® sem iodofórmio (Biodinâmica, Ibiporã - PR, Brasil) – hidróxido de cálcio;
- D = Hydrocal® com iodofórmio (Biodinâmica, Ibiporã - PR, Brasil) – hidróxido de cálcio associado ao iodofórmio.



Figura 1 - Medicações intracanaís analisadas no estudo

Após a confecção do meio de cultura foi realizada a sua deposição junto a quinze placas de Petri estéreis. Como cepas microbianas puras foram utilizados o *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), o *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e a *Candida albicans* (ATCC 10231).

As cepas puras liofilizadas foram, inicialmente, cultivadas isoladamente e, após, diluídas em 10 mL de solução fisiológica estéril com auxílio de uma alça de platina e um tubo de ensaio estéreis junto a um bico de Bunsen, até se obter uma turbidez visual-

mente comparada ao padrão 0,5 da escala de Mac Farland, que é uma escala padrão utilizada em microbiologia e corresponde a aproximadamente 150 milhões de micro-organismos por mililitro de meio. No interior das placas havia 20 mL do meio de cultura BHI ágar.

Cada um dos três tipos de cepas foi espalhado com auxílio de um swab estéril sobre cinco placas contendo BHI ágar. O preparo dos meios de cultura e a semeadura das cepas foram realizados numa capela de fluxo laminar, para que não ocorresse o perigo de contaminação das placas por outro micro-organismo. Após, em cada uma das placas foram confeccionadas quatro escavações junto ao meio de cultura com o auxílio de um punch estéril, padronizando o diâmetro das escavações em 4 mm.

Cada escavação foi, então, preenchida de maneira uniforme por uma das quatro substâncias testadas, ou seja, na mesma placa foram analisados os quatro diferentes medicamentos. Para cada substância foram realizados cinco testes com cada um dos micro-organismos cultivados.

Aguardando-se 30min para que ocorresse a difusão do medicamento no meio, a seguir as placas foram armazenadas numa estufa a 37 °C por 48h. Decorrido o tempo de incubação, foi verificada a presença ou não de halo de inibição para as diferentes medicações analisadas e o seu tamanho. Como instrumento de medida foi utilizada uma régua plástica milimetrada. A verificação do tamanho do halo foi feita em dois sentidos, vertical e horizontal, tendo como ponto de orientação o centro da escavação.

Com relação aos dados obtidos na medição de cada um dos medicamentos, foi feita a média entre as cinco placas e, posteriormente, o valor encontrado foi submetido à análise estatística não paramétrica Kruskal-Wallis, complementada pelo teste de comparações múltiplas ao nível de significância de 5%.

Resultados

As médias dos halos de inibição do crescimento microbiano das três cepas diante das diferentes medicações intracanaís testadas estão expressas na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultado da medição do halo de inibição do crescimento microbiano das três cepas em relação às medicações intracanalais testadas

Medicação	Cepas microbianas					
	Candida albicans		Bacillus subtilis		Enterococcus faecalis	
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
A	14,00 ^A	0,00	19,60 ^{AB}	3,91	21,20 ^A	0,45
B	13,80 ^A	0,45	24,00 ^A	1,00	21,60 ^A	1,52
C	15,00 ^A	0,00	15,00 ^B	1,22	21,60 ^A	3,51
D	0,00 ^B	0,00	17,20 ^B	3,56	0,00 ^B	0,00

A = Calen[®] B = Calen[®] com PMCC C = Hydrocal[®] D = Hydrocal[®] com iodofórmio

Médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem significativamente por meio do teste não paramétrico Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas ao nível de significância de 5%.

Os halos de inibição só não foram verificados na associação do hidróxido de cálcio com o iodofórmio junto ao meio de cultura com cepas de Enterococcus faecalis (Fig. 2) e de Candida albicans (Fig. 3). Já no meio de BHI ágar com cepas de Bacillus subtilis foram verificados halos de inibição em todas as placas de Petri (Fig. 4).

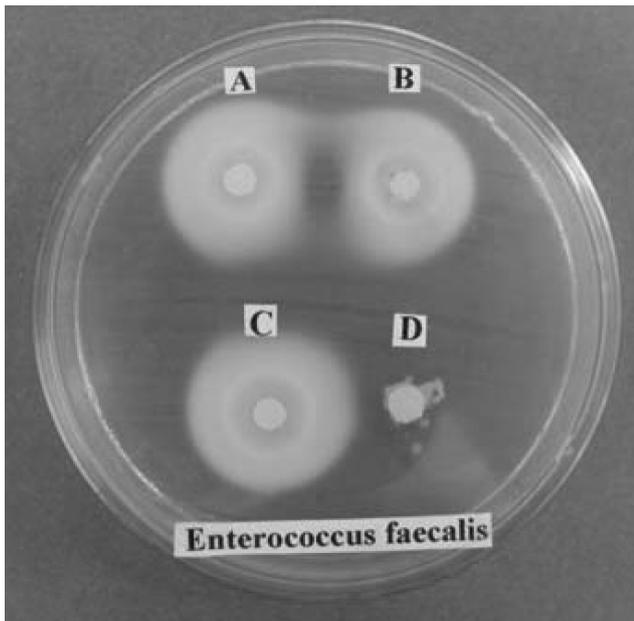


Figura 2 - Ação antimicrobiana das quatro substâncias analisadas junto ao meio de cultura com Enterococcus faecalis

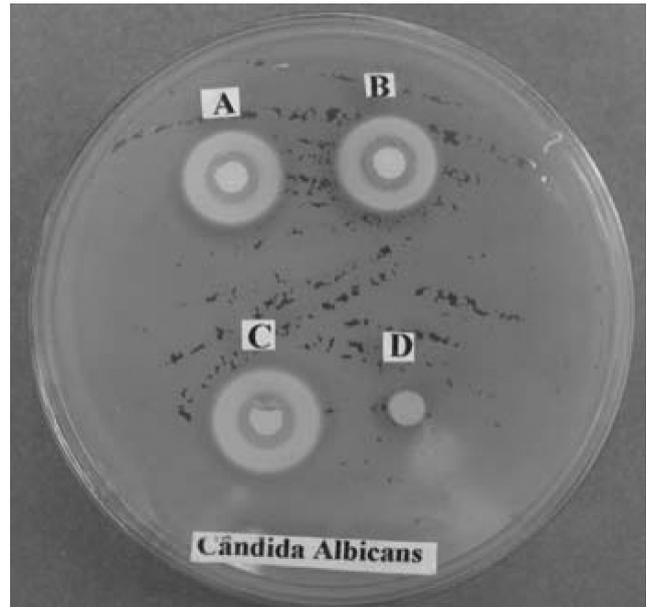


Figura 3 - Ação antimicrobiana das quatro substâncias analisadas junto ao meio de cultura com Candida albicans

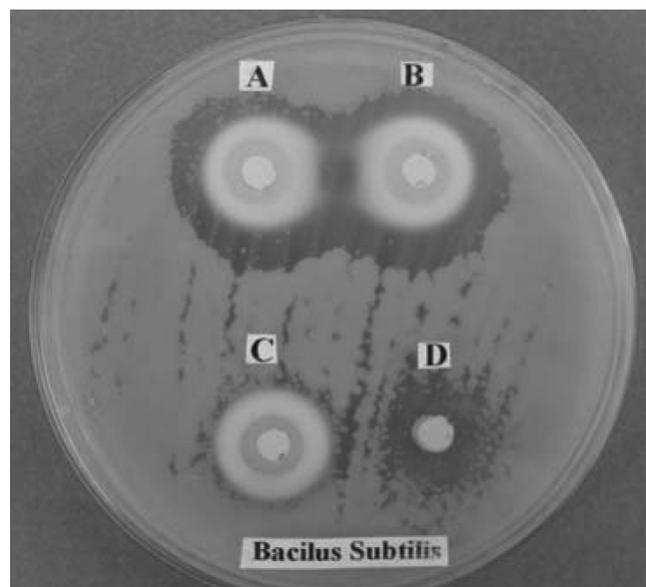


Figura 4 - Ação antimicrobiana das quatro substâncias analisadas junto ao meio de cultura com Bacillus subtilis

Discussão

A possibilidade de contaminação, ou mesmo a permanência de micro-organismos em canais radiculares já infectados durante a terapia, tem sido motivo para que inúmeros estudos sejam realizados na busca de uma medicação intracanal que seja eficaz em relação ao seu aspecto antimicrobiano.

No presente estudo objetivou-se realizar a análise por meio do método de difusão em BHI ágar, pois, segundo Gomes et al.⁸ (2002), é um excelente meio para avaliação da atividade antimicrobiana de materiais e medicamentos odontológicos. Uma das vantagens desse método é que proporciona a análise direta de uma medicação em relação a um micro-organismo específico, indicando a substância mais eficaz na sua eliminação. Essa metodologia também foi utilizada em estudos anteriores^{2,9-12}.

Já para as cepas microbianas foram utilizadas a *Candida albicans*, o *Bacillus subtilis* e o *Enterococcus faecalis*, por serem micro-organismos comumente encontrados em infecções endodônticas primárias^{13,14} e em infecções persistentes¹⁵⁻¹⁷. Essas cepas também foram utilizadas nos estudos de Waltimo et al.¹⁸ (2004), Shabahang et al.¹⁹ (2008) e Maia Filho et al.²⁰ (2008). Não foi empregado um grupo de controle, pois o objetivo foi avaliar a ação dos quatro medicamentos, fazendo uma comparação entre eles.

Com relação aos resultados obtidos, o hidróxido de cálcio puro ou associado ao PMCC (Calen® com ou sem PMCC e Hydrocal™) mostrou uma ação antimicrobiana às três cepas, o que está de acordo com o estudo realizado por Estrela et al.²¹ (2001), os quais verificaram também a formação de halos de inibição sobre os mesmos tipos de micro-organismos.

Por outro lado, Siqueira Jr. e Uzeda²² (1996) observaram, num estudo in vitro sobre túbulos dentinários, que o *Enterococcus faecalis* apresentou grande resistência aos efeitos antimicrobianos do hidróxido de cálcio.

Nas cepas de *Candida albicans* verificou-se um halo de inibição provocado pelo hidróxido de cálcio menor do que o provocado ao *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*, resultados também encontrados por Estrela et al.²³ (2001). Segundo o estudo de Waltimo et al.²⁴ (1999), a *Candida albicans* é muito resistente à ação da medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio.

O medicamento Hydrocal® com iodofórmio não apresentou halo de inibição à *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. Esse fato pode ter ocorrido em razão de o meio de cultura possuir substâncias tamponadoras, levando a com que o medicamento testado, ao se difundir sobre o BHI ágar, tenha alterado a magnitude do pH.

Segundo Estrela et al.²⁵ (2003), o tamanho do halo de inibição depende da solubilidade e da difusibilidade do material testado; portanto, pode não

expressar seu potencial antimicrobiano de forma eficaz.

Na comparação das medicações intracanal analisadas, pode-se observar que o hidróxido de cálcio sem iodofórmio (Hydrocal™) apresentou os melhores resultados, diferentemente do encontrado por Pallotta²⁶ (2002), que verificou que ambas as substâncias (com e sem iodofórmio) apresentam um comportamento antimicrobiano bastante semelhante, a não ser pelo fato de o iodofórmio possuir um comportamento mais eficiente nas condições de anaerobiose.

Conclusões

De acordo com a metodologia utilizada e com os resultados obtidos, é lícito concluir que:

- o Calen® com e sem PMCC e o Hydrocal™ sem iodofórmio apresentaram ação antimicrobiana contra todos os micro-organismos testados sem diferença estatística significativa;
- Hydrocal® com iodofórmio não apresentou ação antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, tendo ação somente contra *Bacillus subtilis*.

Abstract

The objective of this study is to evaluate, by means of BHI Agar diffusion method, the anti-microbial action of four calcium hydroxide-based formulations as intracanal medication. Therefore, three microbial groups were used: *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. Based on the analysis of the results, by means of the Kruskal-Wallis statistical test, complemented by the multiple comparisons test, to a significance level of 5%, it was found that the Calen™, with or without PMCC and Hydrocal™ without iodoform, showed no antimicrobial activity against the 3 cultures used, not showing statistical difference. The Hydrocal™ with iodoform did not act against the cultures of *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*, but against *Bacillus subtilis* only.

Key words: Endodontics. Drug resistance. Microbial. Calcium hydroxide.

Referências

1. Byström A, Sundquist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981; 89(4):321-8.
2. Dotto SR, Travassos RMC, Ferreira R, Santos R, Wagner M. Avaliação da ação antimicrobiana de diferentes medicações usadas em endodontia. *Rev Odonto Ciência* 2006; 21(53):266-9.
3. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002; 28(10):689-93.

4. Haenni S, Schmidlin PR, Mueller B, Sener B, Zehnder M. Chemical and antimicrobial properties of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Int Endod J* 2003; 36(2):100-5.
5. Siqueira Jr. JF, Lopes HP, Magalhães FAC, Uzeda M. Atividade antibacteriana de pastas de hidróxido de cálcio/paramonoclorofenol canforado/glicerina contendo diferentes proporções de iodofórmio sobre bactérias anaeróbias estritas e facultativas. *Rev Paul Odontol* 1997; 19(2):17-21.
6. Manzur A, Gonzalez AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod* 2007; 33(2):114-8.
7. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J* 2009; 42(4):288-302.
8. Gomes BP, Ferraz CC, Garrido FD, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, et al. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *J Endod* 2002; 28(11):758-61.
9. Seabra EJG, Lima IPC, Barbosa SV, Lima KC. Atividade antimicrobiana "in vitro" de compostos a base de hidróxido de cálcio e tergentol em diferentes concentrações sobre bactérias orais. *Acta Cir Bras* 2005; 20(1):12-8.
10. Gomes BP, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102(4):544-50.
11. Neelakantan P, Sajeev K, Subbarao CV. Duration-dependent susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide and chlorhexidine gel used as intracanal medicament: an in vitro evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 104(4):e138-41.
12. Davis JM, Maki J, Bahcall JK. An in vitro comparison of the antimicrobial effects of various endodontic medicaments on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007; 33(5): 567-9.
13. Lana MA, Ribeiro-Sobrinho Ap, Stehling R, Garcia GD, Silva BK, Hamdan JS, et al. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16(2):100-5.
14. Siqueira Jr. JF, Rôças IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93(2):174-8.
15. D'Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic and microaerophilic bacteria. *J Endod* 1999; 25(5):351-3.
16. Siqueira Jr. JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganism associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97(1):85-94.
17. Waltimo TMT, Sirén EK, Torkko HL, Olsen I, Haapasalo MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30(2):96-101.
18. Waltimo TM, Haapasalo M, Zehnder M, Meyer J. Clinical aspects related to endodontic yeast infections. *Endodontic Topics* 2004; 9(1):66-78.
19. Shabahang S, Aslanyan J, Torabinejad M. The substitution of chlorhexidine for doxycycline in MTAD: the antibacterial efficacy against a strain of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2008; 34(3):288-90.
20. Maia Filho EM, Maia CCR, Bastos ACSC, Novais TMG. Efeito antimicrobiano in vitro de diferentes medicações endodônticas e própolis sobre *Enterococcus faecalis*. *RGO* 2008; 56(1):21-5.
21. Estrela C, Estrela CR, Bammann LL, Pécora JD. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. *J Endod* 2001; 27(12):720-3.
22. Siqueira Jr. JF, Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide paste of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod* 1996; 22(12):674-6.
23. Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pécora J. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J* 2001; 34(5):341-5.
24. Waltimo TMT, Sirén EK, Orstavik D, Haapasalo MP. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. *Int Endod J* 1999; 32(2):94-8.
25. Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pécora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Bras Dent J* 2003; 14(1):58-62.
26. Pallotta RC. A utilização do iodofórmio como medicação intracanal. *J Assoc Paul Cir Dent Osasco* 2002; 39:8-9.

Endereço para correspondência

Elias Pandonor Motcy de Oliveira
 Rua Gonçalves Dias, 606 / 1003, Menino Deus
 90130-060 Porto Alegre - RS
 Fone: (51) 9323 6136
 E-mail: eliaspmo@uol.com.br

Recebido: 23.07.2009 Aceito: 14.12.2009