

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Janessa Luiza Engelmann

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE UMA
NOVA PASTA PARA OBTURAÇÃO DE
CANALIS RADICULARES DE DENTES
DECÍDUOS**

Passo Fundo

2022

Janessa Luiza Engelmann

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE UMA
NOVA PASTA PARA OBTURAÇÃO DE
CANALIS RADICULARES DE DENTES
DECÍDUOS**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de
Odontologia da UPF, para obtenção do título de
Doutor em Odontologia – Área de Concentração
em Clínica Odontológica, sob orientação do Prof.
Dr. Matheus Albino Souza.

Passo Fundo

2022

Folha reservada para
Ata de aprovação da Banca Examinadora

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.
Após, faça a substituição pela Ata de aprovação fornecida pela
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

Folha reservada para
Ficha catalográfica

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.
Após, faça a substituição pela Ficha Catalográfica fornecida pela
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Janessa Luiza Engelmann

Filiação: Sandro Luiz Engelmann

Janete Terezinha de Lima

Nascimento: 18 de Maio de 1988

2008-2013 Curso de Graduação em Odontologia na

Faculdade de Odontologia - Universidade de Passo Fundo - UPF.

2013-2015 Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas com Ênfase em Odontopediatria, nível Mestrado, na Universidade Federal de Santa Maria – UFSM.

2019-2022 Curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, nível Doutorado, na Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo - UPF

Atuação Profissional

2013-2016 Cirurgiã-Dentista na Clínica Ped & Neo –
Santa Maria, RS.

2016-2019 Membro Colaborador Externo Voluntário
Container de Atendimentos Odontológicos HUSM-EBSERH

2016-2018 Odontopediatra na Clínica Ímpar
Odontologia Especializada, anta Maria, RS.

2018-2020 Odontopediatra em Consultório
Odontológico Particular, Santa Maria, RS.

2020 Odontopediatra Farret Odontologia
Personalizada, Santa Maria, RS.

AGRADECIMENTOS

“Confio em teu poder e em tua bondade, em ti confio com filialidade, confio cegamente em toda situação, Mãe no teu Filho e na Tua Proteção”. Agradecer primeiramente a *Deus* por ter me sustentado até aqui hoje e sempre.

Aos meus Pais Sandro e Janete, cada um a seu modo, por sempre estarem ao meu lado, apoiando e incentivando. Obrigada por tudo, pelas abdições, esforços e por terem dado o melhor de vocês sempre. Eu dedico esse trabalho a vocês. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos Felipe e Thais, por nessa caminhada podermos cada vez mais contar uns com os outros. Vocês são fundamentais e essências na minha vida.

Meu irmão Felipe, mesmo longe sempre presente e sendo o lado racional da família, incentivando a busca por conhecimento e principalmente a cuidar do que conquistamos. Te amo muito Maninho, você é um orgulho pra mim.

Minha irmã Thais, não teria conseguido sem teu apoio essencial nessa trajetória, por diariamente ouvir minhas incertezas, dúvidas, angústias, mas também dividir as alegrias e realizações. Obrigada pela parceria no cuidado com nossos

pequenos de quatro patas Theo e Noel, que são alegria diária em nossas vidas. Admiro a tua coragem e persistência em ir em busca dos teus sonhos. Obrigada por todo suporte e principalmente no final, ser minha motorista particular, certamente depois desse período pode dirigir até ambulância (kkkkkk). Amo muito vocês!

A toda *minha família* sem exceção, especialmente *meus Avós Ricardo e Gerda* que foram tão importantes neste período, sempre com a casa pronta para me receber, com cama limpinha, comida quentinha e muita risada. Muito feliz pela casa de vocês estar no “meio do meu caminho”. Obrigada por tudo, amo vocês!

Ao meu professor e orientador, *Prof. Dr. Matheus Albino Souza*, primeiramente pelo convite para desenvolver um trabalho tão importante e desafiador, por ter “topado” encarar desenvolver esse projeto da Odontopediatria junto com a Endodontia, mesmo dentro das minhas limitações pela distância, sempre houve entendimento, paciência, profissionalismo, sabedoria, organização. Muito obrigada pela oportunidade em fazer parte deste grupo de pesquisa, pelas inúmeras possibilidades de ensino e aprendizagem dentro desse processo, disponibilidade e pela honra em ter sido tua orientada.

À *Professora Charise Bertol e ao Curso de Farmácia da Universidade de Passo Fundo*, pela recepção e pela incansável ajuda desde o início. Obrigada por nos ceder as instalações do Curso de Farmácia e pelo apoio incessante vindo de você. Você foi fundamental no desenvolvimento da nossa Pasta Experimental, foram meses de tentativas, várias formulações frustradas, milhões de mensagens, busca na literatura, e você sempre positiva. Não vou esquecer o dia que acordei as 7h44 da manhã de um domingo (06/12/2020) e mandei uma mensagem com um possível componente para usar na nossa pasta (e foi ele que deu certo)! Muito obrigada por toda tua parceria, paciência, foco e dedicação no desenvolvimento do nosso estudo.

A *Nádia*, auxiliar da farmácia por toda disponibilidade em nos auxiliar sempre, não mediu esforços para deixar sempre tudo pronto e organizado para nossos estudos. Obrigada, tua ajuda foi extremamente importante no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu muito mais que amigo e colega *Moisés*, idealizador deste projeto, que plantou essa idéia inicialmente e foi indispensável para a execução do mesmo. Obrigada pela tua amizade, parceria e todo empenho para chegarmos na formulação “ideal”.

Ao *Prof. Ezequiel* que dedicou seu tempo em nos orientar numa importante etapa da pesquisa, meu muito obrigada por toda paciência, organização, apoio e dedicação com nosso estudo, especialmente pela mediação junto ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo.

Ao *Prof. Huriel*, pelo auxílio e disponibilidade em nos orientar na pesquisa e ao meu super grupo os alunos da graduação *Ana Luisa, Alessandra, Tainara, Felipe, Eduarda*, e as colegas da pós graduação *Karolina B, Mylena e Gabriele*, que se empenharam ao máximo e deram o seu melhor no desenvolvimento deste trabalho, a disponibilidade de vocês no auxílio e execução deste trabalho foi essencial e fundamental, sem vocês eu não teria conseguido. Meu muito muito obrigada!

A *Professora Juliane*, amiga, colega e parceira da Odontopediatria, muito obrigada por me ensinar tanto, pelos conselhos, por dividir as dúvidas da nossa especialidade, e as conquistas também. Obrigada por permitir fazer parte desse grupo tão especial que é a Odontopediatria – UPF.

Aos *colegas de Doutorado Bruna, Diego, Caco* e em especial a *Mariéli* que se tornou uma grande amiga durante essa jornada. Obrigada pelos anos de estudos, cia. Meu desejo de muito sucesso a todos nós.

À todos os *Professores* da Faculdade de Odontologia da UPF e das disciplinas do Doutorado, que me acolheram tão bem no meu retorno a instituição. Me sinto muito feliz e honrada em ter aprendido ainda mais com vocês.

À *secretaria do Mestrado*, em especial, à Fabi sempre disposta a nos receber cheia de carinho, atenção para auxiliar nos mais diversos assuntos relacionados a vida de pós-graduando. Muito obrigada Fabi, tu és indispensável nesta caminhada.

A todos *alunos*, que em algum momento me receberam e acolheram de uma maneira impecável. Obrigada por me permitirem ensinar, mas principalmente aprender com todos vocês.

A *Graciela e ao Gabriel* por me acolherem tão bem em sua casa, por não medirem esforços para que me sentisse a vontade. Obrigada pelo apoio, incentivo, acolhimento e principalmente pelo carinho com que fui recebida durante esses 3 anos de caminhada.

A minha amiga *Manuela Knorr* que mais uma vez abriu as portas da casa dela pra me receber, minha oftalmo preferida, obrigada pela tua amizade e pronta recepção sempre

que precisei. Te amo amiga!

As minhas “manas” *Karen, Kelli e Ana* que estiveram comigo nesta caminhada, me acolheram e tornaram as estadias mensais (as vezes semanais) nesses últimos anos durante uma Pandemia, mais leve! Sempre receptivas, acolhedoras e com uma comidinha boa (e um guaraná Sarandi), vocês são muito especiais na minha vida, obrigada por estarem ao meu lado neste momento tão importante. Eu amo muito vocês 3!

As minhas amigas, comadres, parceiras de trabalho e da vida *Laura, Luiza e Liege*. Obrigada por toda nossa parceria não só de trabalho, mas pela amizade de vocês que foi fundamental neste processo. Amo vocês.

Aos meus colegas *Marcel e Alessandro* da Farret Odontologia pelas palavras de apoio e incentivo sempre. Ter me juntado a vocês só me fez ter vontade de crescer mais. Obrigada pela amizade e parceria nessa jornada de trabalho.

Às minhas queridas secretárias *Andressa, Jenifer, Carline* por todo suporte e cuidado da minha agenda, pacientes e do meu consultório nas minhas ausências. Obrigada por serem muito mais que auxiliares, se tornaram amigas e

indispensáveis na minha vida.

A minha amiga irmã *Ariane* e meus Pais do coração *Arno e Eliane* pelo apoio de sempre, pelo carinho e por serem sempre presentes na minha vida. Amo vocês!

A minha *Teacher Rossina* pelo apoio desde antes de eu entrar no Doutorado, me ajudando nos estudos para a prova e sempre que necessário, me socorrendo e me auxiliando nos trabalhos com a língua inglesa. Obrigada por tudo sempre.

A *Leila*, uma Mãe de coração, que me acolheu inicialmente ainda na época do Mestrado em Santa Maria e desde lá sempre esteve presente na minha vida, e agora não seria diferente, sempre com uma conversa boa e um lugarzinho especial para me receber. Obrigada por ser essa pessoa tão especial e sempre presente. Amo você.

À minha psicóloga *Daniele Londero* imprescindível e essencial nesse processo, sempre pronta para ouvir as minhas angústias, dúvidas, mas também a elaborar processos e celebrar as conquistas. Obrigada por tudo.

Aos meus amigos *Marcos e Igor* pela amizade, sempre prontos para proporcionar momentos de descontração e

alegria.

A *Ir. Ma. Carmem Andreia* que foi um anjo que apareceu na minha vida, sempre com uma palavra de carinho e conforto e que reforça a minha Fé em Deus. Sou grata a Deus por ter você em minha vida Irmã Carmem!

A todos os pacientes e suas famílias pela confiança no meu trabalho, é por todos vocês que sigo sempre buscando ser melhor pessoal e profissionalmente.

Sumário

LISTA DE TABELAS	20
LISTA DE FIGURAS	22
LISTA DE ABREVIATURAS	25
RESUMO	28
ABSTRACT	31
1. INTRODUÇÃO	33
2. REVISÃO DE LITERATURA	40
7.1 ÓXIDO DE ZINCO E EUGENOL	41
7.2 PASTAS IODOFORMADAS	48
7.3 HIDRÓXIDO DE CÁLCIO	55
7.4 CLOREXIDINA.....	66
7.5 SULFATO DE NEOMICINA.....	76
7.6 OTOSPORIN®	85
7.7 SULFATO DE BÁRIO	90
3. PROPOSIÇÃO	99
4. MATERIAIS E MÉTODOS	100
4.1 Formulação Pasta Obturadora Experimental.....	100
4.1.1 Preparo das Formulações.....	100
4.1.2 MÉTODO DE MANIPULAÇÃO DAS PASTAS EXPERIMENTAIS	106
4.1.2.1 Separação/ pesagem dos componentes sólidos.....	106
4.1.2.2 Separação/ medidas componentes -líquidos-.....	107
4.1.2.4 Preparo $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{HCl}$	108

4.1.3 MISTURA DOS COMPONENTES.....	109
4.1.3.1 – Homogeneização inicial - diluição geométrica...	109
4.1.3.2- Incorporação dos demais componentes.....	110
4.1.3.3- Homogeneização final.....	111
4.1.4 ARMAZENAMENTO DAS PASTAS EXPERIMENTAIS	112
4.2 TESTE DE pH.....	113
4.2.1. Preparo do material para o teste	114
4.2.2. Avaliação do pH das Pastas Testadas.....	115
4.3 TESTE DE ESPALHABILIDADE	115
4.3.1 Determinação Espalhabilidade	115
4.3.2 Análise Estatística	118
4.4 TESTE DE RADIOPACIDADE	118
4.4.1 Materiais Testados.....	118
4.4.2 Preparo do Material para o teste.....	119
4.4.3 Tomada Radiográfica	120
4.4.4 Obtenção dos valores de radiopacidade dos materiais..	120
4.4.5 Análise Estatística	122
4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	122
4.5.1 Preparo das culturas.....	122
4.5.2 Avaliação da citotoxicidade – ensaio MTT.....	123
4.5.3 Observação da confluência do tapete celular.....	124
4.5.4 Avaliação Viabilidade Celular.....	125
4.5.5 Análise Estatística	126
4.6 AÇÃO ANTIMICROBIANA – HALO INIBITÁRIO.....	127
4.6.1 Semeadura das Placas.....	127
4.6.2 Leitura dos Halos de Inibição.....	133

4.6.3	Análise Estatística	134
4.7	AÇÃO ANTIMICROBIANA - CONTAGEM UFCs ...	135
4.7.1	Obtenção e Preparo das amostras	135
4.7.2	Preparo do inóculo.....	139
4.7.3	Contaminação dos canais radiculares.....	139
4.7.4	Classificação dos grupos de tratamento	142
4.7.5	Realização das coletas e análise microbiológica	146
4.7.6	Análise estatística	149
5.	RESULTADOS	150
5.1	Formulação Pasta Experimental	150
5.2	TESTE PH.....	179
5.3	TESTE DE ESPALHABILIDADE.....	181
5.4	TESTE RADIOPACIDADE	186
5.5	AÇÃO ANTIMICROBIANA – HALO INIBITÓRIO....	187
5.6	CITOTOXICIDADE	189
5.7	AÇÃO ANTIMICROBIANA – CONTAGEM UFC	190
6.	DISCUSSÃO.....	193

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Materiais utilizados no preparo das formulações	101
Tabela 2: Componentes utilizados para formular 50g das pastas F1, F2, F3, F4 e F5	102
Tabela 3: Componentes ajustados para formular 50g das pastas experimentais F1, F2 e F3:	103
Tabela 4: Componentes ajustados para formular 50g das pastas experimentais F2 e F3:	104
Tabela 5: Componentes utilizados para formular 100g da pasta experimental F1, 50g da pasta experimental F4, e 30g das pastas experimentais F5 e F6:	105
Tabela 6: Materiais Testados	132
Tabela 7: Materiais testados teste de radiopacidade.....	119
Tabela 8: Distribuição dos grupos de acordo com a Pasta Obturadora testada.....	144
Tabela 9: Componentes ajustados para formular 50g das pastas experimentais.....	157
Tabela 10: Componentes ajustados para formular 50g das pastas experimentais F2 e F3:	161
Tabela 11: Componentes utilizados para formular 100g da pasta experimental F1, 50g da pasta experimental F4, e 30g das pastas experimentais F5 e F6:	164
Tabela 12: Média e desvio padrão de halo inibitório (em mm), através do método de contato direto dos protocolos testados com o meio de cultura microbiano.	188
Tabela 13: Média e desvio padrão da taxa percentual de viabilidade celular após tratamento com os protocolos testados.....	189
Tabela 14: Média dos pH das pastas experimentais e das pastas existentes no mercado.....	180
Tabela 15: Média de espalhabilidade das Formulações experimentais.....	183

Tabela 16: Média de espalhabilidade das Pastas comerciais.....	184
Tabela 17: Média da espalhabilidade dos grupos nos diferentes tempos de teste.	185
Tabela 18: - Comparações de médias dos diferentes grupos aos 30 dias de armazenamento	185
Tabela 19: Radiopacidade em milímetro de Alumínio (mm/Al) dos materiais estudados.....	187
Tabela 20: Média, desvio padrão e porcentagem de redução de unidades formadoras de colônia (UFC) em função do grupo e tempo de análise.	191

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Balança Analítica OHAUS.	106
Figura 2: Provetas graduadas de vidro	107
Figura 3: Componentes proporcionados (pó e líquido) para cada formulação de pasta.....	108
Figura 5: Ca(OH) ₂ + HCl manipulados em capela de exaustão	109
Figura 5: mistura e adição dos componentes em gral de porcelana	110
Figura 6: Homogeneização Inicial.....	111
Figura 7: Homogeneização final.....	112
Figura 8: Frascos de polietileno de parede dupla herméticos....	113
Figura 9: E.faecalis.....	127
Figura 10: Placas de Petri.....	128
Figura 11: Agar Mueller Hinton.....	128
Figura 12: Semeadura das placas.....	129
Figura 13: Microdiluição das pastas	130
Figura 14: Preparo dos poços nas placas de Petri.....	131
Figura 15: Preenchimento dos poços.....	133
Figura 16: Leitura halos de inibição	134
Figura 17: Células L929	123
Figura 18: Placas de 96 poços na concentração de 1×10^5	124
Figura 19: Visualização tapete celular em microscópio invertido	125
Figura 20: Medida pH formulações.....	115
Figura 21: Placas para teste de espalhabilidade.....	117
Figura 22: fórmula proposta por Duarte et al., (2009).....	121
Figura 23: Secção na junção amelo cementária.....	135
Figura 24: Padronização das raízes em 15mm	135
Figura 25: Comprimento de trabalho.....	136
Figura 26: Gates/ Limas 1ª série 21 mm.....	137
Figura 27: Raiz dentro do microtubo.....	138
Figura 28: Disposição das amostras em caixa de polipropileno	138
Figura 29: Contaminação dos canais radiculares	140
Figura 30 Renovação caldo BHI	141
Figura 31: Camara Fluxo Laminar	142

Figura 32: Amostras irrigadas com 5 mL de soro fisiológico estéril e secas com cone de papel esterilizado.....	143
Figura 33: Pasta Calen.....	145
Figura 34: Pasta Guedes Pinto.....	145
Figura 35: Pasta Experimental F1 e F5	146
Figura 36: Pasta OZE	146
Figura 37: ponta de papel absorvente em contato com interior canal radicular e após, transferida para um microtubo contendo 1 ml de solução salina estéril.....	147
Figura 38: Material homogeneizado e diluído até 10^{-3}	148
Figura 39: Alíquotas semeadas em placas de Petri contendo PCA	148
Figura 40: Placas em incubação; contagem do número de UFCs	149
Figura 41: Preparo das Pastas.....	151
Figura 42: Aspecto inicial das Pastas Experimentais após manipulação	151
Figura 43: Pasta Experimental F1	152
Figura 44: Pasta Experimental F2	153
Figura 45: Pasta Experimental F3	154
Figura 46: Pasta Experimental F4	155
Figura 47: Pasta Experimental F5	156
Figura 48: Separação materiais para preparo das formulações .	158
Figura 49: Pastas testadas após manipulação em recipientes plásticos com tampa	158
Figura 50: Aspecto físico das pastas experimentais F1, F2 e F3 respectivamente após 30 dias.	159
Figura 51: Pastas Experimentais F2 e F3 após manipulação	162
Figura 52: Pastas Experimentais F2 e F3 após 10 dias.	163
Figura 53: Pasta Experimental F1 após 90 dias.....	163
Figura 54: Pasta Experimental F1	167
Figura 55: Pasta Experimental F4	168
Figura 56: Pasta Experimental F5	169
Figura 57: Pasta Experimental F6	170
Figura 58: Pastas Experimentais F1, F4, F5 e F6 - 7 dias após manipulação.	171

Figura 59: Pastas Experimentais F1, F4, F5 e F6 14 dias após manipulação.....	171
Figura 60: Pastas Experimentais F1, F4, F5 e F6 30 dias após manipulação.....	172
Figura 61: Pasta Experimental F1 após 90 dias armazenada.....	173
Figura 62: Pasta Experimental F4 após 90 dias armazenada.....	174
Figura 63: Pasta Experimental F5 após 90 dias armazenada.....	175
Figura 64: Pasta Experimental F6 após 90 dias armazenada.....	176
Figura 65: Pasta Experimental F1 após aproximadamente 120 e 320 dias respectivamente.....	177
Figura 66: Pasta Experimental F5 após aproximadamente 120 e 320 dias respectivamente.....	178
Figura 67: Radiografia digital das pastas Calen®, F1 e F5.....	186

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - graus Celsius

% - percentagem

- diâmetro

µL - microlitros

BaSO₄ - Sulfato de bário

BHI - brain heart infusion

Ca(OH)₂ - hidróxido de cálcio

CE - composição elementar

CFU- unidades formadoras de colônias

CHX - digluconato de clorexidina

CMD - desbridamento químico-mecânico

DNA - ácido desoxirribonucleico

DMSO – dimetilsulfóxido

DW - água destilada

EDTA- ácido etileno diamino tetracético

E.faecalis - *Enterococcus faecalis*

Ei = espalhabilidade

GPCs - cones de guta-percha

H - horas

H₂O – água

HCl – ácido clorídrico

HPMC - Hidroxipropilmetilcelulose

IMIDA- Imidazolinidil ureia

Log- logarítmo

MET - microscopia eletrônica de transmissão

MEV - microscopia eletrônica de varredura

mg - miligramas

mL- mililitro

min - minutos

mo - micro-organismos

mPa- Mega Pascal

MTT - Tetrazólio [brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5 difenil tetrazólio]

NaCl - cloreto de sódio

NaOCl - hipoclorito de sódio

NaOH - hidróxido de sódio

OZ – óxido de Zinco

OZE – Óxido de Zinco e Eugenol

PBM - preparo biomecânico

PBS – Phosphate-buffered saline

PG – Pasta Guedes Pinto

pH - potencial de hidrogênio

PCA- plate count agar

PCR - reação em cadeia da polimerase

(p/p) — expressa o número de g de componentes em 100 g de mistura.

(p/V) — expressa o número de g de um componente em 100 ml da solução

S-segundos

SCAP - células tronco da papila apical humana

TBS - caldo trípico de soja

TSA -ágar trípico de soja

UFC – Unidades formadoras de colônia

RESUMO¹

Este estudo teve como objetivo formular uma nova pasta para obturação de dentes decíduos e avaliar as diferentes propriedades desta pasta experimental composta por Hidróxido de Cálcio Ca(OH)_2 , Clorexedina (CHX), Sulfato de Neomicina e Sulfato de bário (BaSO_4). Após a formulação da pasta experimental, foram realizadas avaliações de ação antimicrobiana por meio de halo inibitório; e citotoxicidade por meio de ensaio Tetrazólio [brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5 difenil tetrazólio] (MTT). Também foram feitas avaliações físico-químicas de pH, espalhabilidade e radiopacidade. Para o experimento principal, 60 dentes humanos unirradiculares extraídos foram utilizados para a realização da avaliação da ação antimicrobiana por meio da contagem de unidades formadoras de colônias. Seis grupos de tratamentos foram realizados para todas as avaliações, G1: Pasta Calen® (SSWhite, São Paulo, Brasil), G2: Pasta Guedes Pinto (Manipulada Farmácia Buenos Ayres, São

¹ Janessa Luiza Engelmann

Paulo, Brasil), G3: F1 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, CHX, BaSO_4), G4: F5 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, CHX, Sulfato Neomicina e BaSO_4), G5: Pasta OZE, G6: grupo controle soro fisiológico. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, utilizando testes específicos para cada avaliação. Os resultados mostraram que a Pasta Experimental F5 apresentou os melhores resultados nos testes avaliados, manteve bom aspecto físico visual sem alterações significativas no período de acompanhamento. O pH da Pasta Experimental F5 manteve-se alcalino. Quando comparadas as médias de espalhabilidade os dados encontrados neste estudo sugerem que a Pasta Experimental F5 comparada a pasta comercial Calen®, que também é uma pasta a base de hidróxido de cálcio que é disponibilizada pronta para uso, não havendo diferença estatística entre elas. Em relação a radiopacidade apresentou resultado superior a Pasta Calen®, alcançando o valor de 9,4mm/Al. As pastas experimentais apresentarem maior taxa de viabilidade celular juntamente com a Pasta Guedes Pinto. A maior média de halo inibitório foi observada pelas Pasta Experimental F5 > Pasta Experimental F1 > Pasta Guedes Pinto > Pasta Calen® > OZE. Todos os grupos apresentaram diferença estatística entre a coleta inicial e final no experimento de UFC's e nas análises comparativas demonstraram que não houve significância estatisticamente entre os grupos experimentais; ao comparar os grupos experimentais ao controle houve significância estatística sendo Calen®/ Controle ($p < 0.01$);

Pasta Guedes/ Controle ($p<0.01$); Pasta Experimental F1/ Controle ($p<0.01$); Pasta Experimental F5/ Controle ($p<0.01$) e OZE / Controle ($p<0.01$). Conclui-se que a Pasta Experimental F5 possui ação antimicrobiana contra *E. faecalis*, não sendo citotóxica, mantendo seu pH alcalino durante o estudo, espalhabilidade semelhante a Pasta Calen® e radiopacidade superior.

Palavras-chave: Clorexidina, Ca (OH)₂, Endodontia, Dentes decíduos

ABSTRACT²

This study aimed to formulate a experimental filling paste for primary teeth and evaluate the properties this paste composed of Calcium Hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), Chlorhexidine (CHX), Neomycin Sulfate and Barium Sulfate (BaSO_4). Afterwards the experimental paste formulation, biological evaluations were carried out: antimicrobial action through inhibitory halo; and citotoxicity through MTT assay. Also physical chemical properties: pH, spreadability and radiopacity. For the main experiment, 60 extracted single-rooted human teeth were used to evaluate the antimicrobial action by counting colony forming units. 6 treatment groups were performed for all evaluations G1: Calen Paste® (SSWhite, São Paulo, Brazil), G2: Pasta Guedes Pinto (Compounding - Farmácia Buenos Ayres, São Paulo, Brazil), G3: F1 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, CHX, and BaSO_4), G4: F5 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, CHX, Neomycin and BaSO_4), G5: OZE Paste, G6: Control group. The data obtained were submitted to statistical analysis, using specific tests for each evaluation. The results of monitoring that the physical visual Pasta Experimental F5 showed the best results in the tests, maintained significant changes in the period. The pH of Experimental F5 Paste remained alkaline. A variety of materials such as studies of an Experimental F5 Paste was also found in a hydroxide-based paste of material that is made available for use, with no difference between them.

² Janessa Luiza Engelmann

To radiopacity, it presented a better result than Calen® Paste, reaching a value of 9.4mm/Al. Experimental Pastes show the highest rate of cell viability with a Guedes Pinto Paste. The highest inhibitory halo average was observed for Experimental Paste F5 > Experimental Paste F1 > Guedes Pinto Paste > Calen® Paste > OZE. All groups showed a statistical difference between the initial and final collection in the CFU's experiment and the comparative analyzes showed that there was no statistical significance between the experimental groups; when comparing the experimental groups to the control there was statistical significance being Calen® / Control ($p < 0.01$); Guedes/Control Folder ($p < 0.01$); Experimental F1 Paste /Control ($p < 0.01$); Experimental F5 Paste /Control ($p < 0.01$) and OZE/Control ($p < 0.01$). It is concluded that the Experimental F5 Paste has antimicrobial action against *E. faecalis*, not being cytotoxic, maintaining its alkaline pH during the study, spreadability similar to Calen® Paste and superior radiopacity.

Keywords: Chlorhexidine, Calcium Hydroxide, Endodontic treatment, Primary teeth

1.INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento endodôntico em dentes decíduos depende de vários fatores que devem ser levados em consideração no momento da indicação do tratamento. Dentre eles, as particularidades e limitações da anatomia dos dentes decíduos como a divergência das raízes dos molares; complexidade do canal por possuírem vários canais acessórios, o que dificulta o preparo químico-mecânico e conseqüentemente o controle da microbiota; proximidade com germe do dente permanente; zonas de reabsorção fisiológica nem sempre visíveis radiograficamente pelo fato das radiografias periapicais serem bidimensionais, e ainda, condições relativas ao manejo comportamental de pacientes pediátricos. (ANTONIAZZI *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2010).

Levando em consideração as particularidades da dentição decídua, a remoção de tecido pulpar radicular irreversivelmente inflamado ou necrótico, limpeza e desinfecção do sistema de canais utilizando soluções irrigadoras e substâncias auxiliares na limpeza que sejam compatíveis, e o preenchimento final dos canais com um material adequado, faz parte do processo da endodontia de dentes decíduos (CASSOL *et al.*, 2019; LOPES, SIQUEIRA, 2004; THOMAZ *et al.*, 1994).

A obturação dos dentes decíduos é considerada fundamental para o sucesso do tratamento endodôntico. Para que um material obturador seja efetivo são considerados alguns pré requisitos básicos como: ser reabsorvível, radiopaco, bactericida, não contrair, promover adequado preenchimento e aderência às paredes dos canais radiculares, ser facilmente removido quando necessário; quando extravasado não provocar danos aos tecidos periapicais e ao desenvolvimento do germe do dente permanente, e ainda não causar alteração da coloração das estruturas dentárias, especialmente em dentes anteriores (JUNG-WEI CHEN & MONSERRAT JORDEN, 2012; FUKS, 2008, KUBOTA; GOLDEN; PENUGONDA, 1992, MASS; ZILBERMAN, 1989, MORTAZAVI; MESBAHI, 2004, PINTO *et al.*, 2011).

Não existe na literatura uma concordância sobre o protocolo e material obturador ideal para o processo de endodontia de dentes decíduos, bem como os materiais existentes não preenchem todos os requisitos desejáveis para um material obturador satisfatório. A pasta OZE vem sendo substituída por ter limitações no uso e por ser associado a danos quando extravasado aos tecidos periapicais, desencadeando reações inflamatórias de corpo estranho e desvio da posição natural na erupção dos dentes permanentes devido a sua dureza (BARJA-FIDALGO *et al.*, 2011; MORTAZAVI; MESBAHI, 2004, PINTO *et al.*, 2011); As pastas a base de hidróxido de cálcio têm rápida reabsorção e baixa radiopacidade

(CASSOL *et al.*, 2019); as pastas iodoformadas tem odor forte e característico, possibilidade de alteração de cor das estruturas dentárias e potencial alergênico (REZENDE *et al.*, 2002).

No Brasil, a Pasta Iodoformada mais utilizada é a Pasta Guedes Pinto, que tem necessidade manipulação no momento do uso, que além de dificultar o processo, pode gerar alterações na proporção dos componentes modificando as propriedades biológicas e aumentando sua toxicidade (MELLO-MOURA *et al.*, 2011), além disso, a pomada usada na sua composição, Rifocort®, não está mais disponível para comercialização estando disponível apenas em farmácia de manipulação, elevando seu custo e dificultando o acesso a mesma (ANTONIAZZI *et al.*, 2015)

Estudos têm demonstrado uma grande variedade de técnicas e materiais utilizados extremamente distintos entre si, deixando a escolha de um protocolo de endodontia a critério da subjetividade dos profissionais (BERGOLI *et al.*, 2010; ACADEMY OF PEDIATRIC DENISTRY, 2015).

Dentre os componentes presentes nas pastas já comercializadas, as pastas a base de hidróxido de cálcio são indicadas como material obturador na endodontia de dentes decíduos por suas propriedades benéficas e sua atividade antimicrobiana, devido à dissociação iônica dos íons cálcio e hidroxila, sua baixa toxicidade, seu pH, solubilidade, propriedades

antibacterianas, antifúngicas e propriedades de biocompatibilidade (CASSOL *et al.*, 2019; QUEIROZ *et al.*, 2011; QUEIROZ *et al.*, 2009, RANLY; GARCIA-GODOY, 2000). O componente hidróxido de cálcio atua também sobre os tecidos vitais e é capaz de induzir o reparo periapical através da deposição de tecidos minerais e tem um bom potencial para a inativação das endotoxinas (ESTRELA & PESCE, 1996., ESTRELA *et al.*,1997., SIGNORETTI *et al.*,2011., LEONARDO *et al.*, 2000).

A clorexidina (CHX) tem sido amplamente utilizada em endodontia de dentes permanente há muito tempo, especialmente por sua ação antimicrobiana, tendo essa substância uma característica peculiar, a substantividade, que promove atividade antimicrobiana residual a dentina. É um efetivo agente antimicrobiano contra patógenos endodônticos e biocompatível com os tecidos dentais (FERRAZ *et al.*, 2001., MOHAMMADI & ABBOTT, 2009). Estudos tem sugerido a associação entre clorexidina e hidróxido de cálcio com o intuito de aumentar a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio. A presença de CHX acrescenta substantividade à formulação, devido à sua capacidade de adsorção e liberação lenta de moléculas ativas para os tecidos dentários, podendo a clorexidina manter o canal livre de microrganismos, mesmo depois de ser removida do canal (GOMES *et al.*, 2006).

Os componentes do Otoporin[®] são hidrocortisona (corticóide), sulfato de neomicina e sulfato de polimixina B (antibióticos) que são usados associadamente na composição. Essa associação promove uma diminuição da magnitude da reação inflamatória, causada pelo ato cirúrgico e pelo uso de substâncias químicas. Está indicada como curativo de demora em casos de sobre instrumentação e de periodontite apical aguda de etiologia traumática ou química (RUIZ *et al.* 2002). Otoporin[®] reduz a vasodilatação, diminui a exsudação de líquido, e também apresenta uma ação direta vasoconstritora sobre os vasos sanguíneos pequenos (SILVA *et al.* 2004).

O Sulfato de neomicina, componente utilizado no Otoporin[®] é um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro descoberto em 1949, produzida pelo actinomiceto *Streptomyces fradiae*. É usado para tratar algumas infecções de pele, hepáticas ou intestinais e em profilaxia pré cirúrgica. Atua mais sobre as espécies gram-negativas altamente sensíveis que incluem: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp. *Serratia* sp. *Shigella* sp. E *Proteus vulgaris*. Os microrganismos gram-positivos que são inibidos incluem *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* (WAKSMAN, *et al.* 1949).

O Sulfato de bário (BaSO₄) é um dos radiopacificadores da guta percha que vem sendo utilizada como material obturador de

canais radiculares desde 1847. (NASCIMENTO *et al.*, 2010.) A radiopacidade é uma propriedade física desejável aos materiais obturadores utilizados em endodontia, tendo em vista que permite a visualização radiográfica dos mesmos, possibilitando a verificação da qualidade do preenchimento do canal radicular e a observação do limite apical de obturação (VEIGA *et al.*, 2017). O sulfato de bário (BaSO_4) é o agente mais utilizado para conferir radiopacidade a algumas pastas contendo hidróxido de cálcio que já são comercializadas atualmente, como a pasta Ultracal XS® e Hydropast® (LOUREIRO *et al.*, 2018).

O conservante imidazolidinil ureia é um conservante altamente efetivo, biodegradável. Tem uma ampla faixa de atividade contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos. Estável em amplo intervalo de pH (3,0 – 9,0). A sinergia existente entre imidazolidinil ureia e parabenos permite a obtenção de um sistema conservante efetivo contra bactérias, fungos e leveduras (HOWARD, PAYE & BARELA, 2009; CORRÊA, 2005).

O óleo de silicone é qualquer siloxano polimerizado líquido com cadeias laterais orgânicas. Esses polímeros são de interesse comercial por causa de sua estabilidade térmica relativamente alta e pelas suas propriedades de lubrificação (MORETTO *et al.*, 2000).

O ácido clorídrico é amplamente utilizado como agente acidificante em uma variedade de preparações farmacêuticas e alimentícias, pode ser utilizado para redução de pH do hidróxido de cálcio (LEWIS, 1980.; SWEETMAN, 2009).

A hidroximetilpropilcelulose (HPMC) é considerada farmacologicamente como um agente de revestimento; agente emulsificante; agente estabilizador; agente espessante; agente de aumento de viscosidade. A hidroxipropilcelulose é amplamente utilizada como excipiente em uso oral e formulações farmacêuticas tópicas. Também é amplamente utilizado em cosméticos e produtos alimentícios. A hidroxipropilcelulose é geralmente considerada como um material atóxico e não irritante. Não apresenta irritação da pele ou pele sensibilização. As reações adversas à hidroxipropilcelulose são raras (ROWE *et al.*, 2009).

Diante dos problemas expostos, torna-se necessária a busca por um novo material para obturação de dentes decíduos, alternativo as pastas já comercializadas, que seja eficaz e seguro promovendo um melhor desempenho no tratamento endodôntico de dentes decíduos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A busca por protocolos endodônticos seguros e eficazes faz com que cada vez mais se busque por evidências científicas para as técnicas e materiais utilizados em Odontologia. No que diz respeito a área de atuação Endodontia, os avanços e inovações são constantes, e existem protocolos bem embasados e seguros. Já na endodontia de dentes decíduos, essa evolução não ocorre na mesma intensidade e não existe no Brasil um protocolo estabelecido para esta finalidade (JOE EDITORIAL BOARD, 2008; ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY, 2015).

Nos últimos anos, tem se observando um interesse maior pela busca de evidências científicas e por protocolos mais seguros para materiais utilizados na obturação de dentes decíduos. Novas associações têm sido propostas e estudos conduzidos com o intuito de avaliar a segurança e eficácia também dos medicamentos que já vem sendo utilizados (ANTONIAZZI, *et al.*, 2015).

As formas de pastas são as mais utilizadas como material obturador de dentes decíduos. Pastas são consideradas formulações semi-sólidas com alto percentual de sólidos incorporados, mais de 40%, em que o fármaco está contido em uma base adequada

(pomada-base), que pode ser hidrofílica ou hidrofóbica. Essas bases desempenham importante papel na formulação das preparações semissólidas, não existindo uma única base universalmente aceitável como veículo para todas as substâncias ativas ou indicações terapêuticas. A base mais adequada para um fármaco deve ser determinada de forma individual, de modo a fornecer velocidade de liberação, propriedades de adesão após aplicação e textura ideais (ALLEN., *et al.*, 2013).

2.1 ÓXIDO DE ZINCO E EUGENOL

O óxido de Zinco e Eugenol foi o primeiro material proposto para obturação de dentes decíduos. Sagar *et al.*, 1991, avaliaram o óxido de zinco-eugenol iodoformizado quanto ao seu efeito antibacteriano contra as bactérias aeróbias e anaeróbicas obtidas dos canais radiculares dos dentes decíduos; as bactérias eram *Staphylococcus aureus*, *Streptococos*, *E. faecalis*, *Bacteroides melaninogenicus* e também cultura mista obtida de dentes anteriores não vitais infectados. A pasta iodoformada de óxido de zinco e eugenol foi eficaz tanto para as bactérias aeróbicas e anaeróbicas dos canais radiculares de dentes decíduos com período máximo de sustentação de 10 dias; o *Staphylococcus aureus* foi o mais suscetível, enquanto o *E. faecalis* foi o mais resistente.

Huang *et al.*, em 2007, compararam os efeitos de diferentes materiais utilizados para obturação de canais radiculares de dentes decíduos, viabilidade celular de linhagens celulares de osteosarcoma humano. O grupo experimental continha seis tipos diferentes de materiais obturadores do canal radicular, incluindo óxido de zinco (OZn) + eugenol + formocresol (FC), Ca(OH)₍₂₎ + FC, Ca(OH)₍₂₎ + Iodofórmio, Ca(OH)₍₂₎ + Iodofórmio + paramonoclorofenol canforado (PMCC), Ca(OH)₍₂₎ + PMCC e Vitapex. Os testes de viabilidade celular foram realizados utilizando ensaio colorimétrico de brometo de tetrazólio (MTT) em linhas celulares de osteossarcoma humanas (U2OS). Os grupos OZn + eugenol + FC e Ca(OH)₍₂₎ + FC apresentaram as menores taxas de sobrevida ($p < 0,05$). O grupo Ca(OH)₍₂₎ + Iodofórmio + PMCC e Ca(OH)₍₂₎ + PMCC apresentaram taxas de sobrevivência significativamente menores em concentrações acima de 6 microL/mL ($p < 0,05$). Os grupos Ca(OH)₍₂₎ + Iodofórmio e Vitapex apresentaram as maiores taxas de sobrevida ($p < 0,05$). Concluíram então, que o uso de hidróxido de cálcio com iodofórmio como material obturador de canais radiculares de dentes decíduos é a melhor opção comparada aos outros medicamentos testados.

Queiroz *et al.*, em 2009, concluíram que a atividade antibacteriana *in vitro* dos 4 materiais obturadores de canais radiculares para dentes decíduos (óxido de zinco e eugenol (OZE),

pasta Calen espessada com óxido de zinco (Calen/OZ), cimento Sealapex e selante EndoREZ) contra cepas bacterianas comumente encontradas em infecções endodônticas, pode ser apresentada em ordem decrescente de eficácia como segue: OZEE > Calen/OZ > Sealapex > EndoREZ. Neste estudo, foi avaliado *in vitro* a atividade antibacteriana destes 4 materiais obturadores de canais radiculares para dentes decíduos - contra 5 cepas bacterianas comumente encontrado em infecções endodônticas (*Kocuria rhizophila*, *E.faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) utilizando o teste de difusão em ágar (técnica de poço-ágar). Pasta Calen, digluconato de clorexidina a 1% (CHX) e água destilada serviram como controle. Sete poços por placa foram feitos em pontos equidistantes e imediatamente preenchidos com os materiais de teste e controle. Após incubação das placas a 37°C por 24h, o diâmetro das zonas de inibição do crescimento bacteriano produzido ao redor dos poços foi medido (em mm) com um paquímetro digital sob luz refletida. A pasta de Calen e Calen / OZE produziram maiores zonas de inibição do que 1% de CHX quando o microrganismo marcador era *E. faecalis*.

Queiroz *et al.*, em 2011, avaliaram a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos BALB / com materiais obturadores radiculares indicados para dentes decíduos: óxido de zinco / cimento eugenol (OZE), pasta Calen espessada com óxido de zinco (Calen/OZ) e cimento Sealapex. Os camundongos (n =

102) receberam implantes de tubo de polietileno com os materiais, formando assim 11 grupos, como segue: I, II, III: Calen/OZE por 7, 21 e 63 dias, respectivamente; IV, V, VI: Sealapex por 7, 21 e 63 dias, respectivamente; VII, VIII, IX: OZE por 7, 21 e 63 dias, respectivamente; X e XI: tubo vazio por 7 e 21 dias, respectivamente. Os tecidos biopsiados foram submetidos à análise histológica (análise descritiva e análise semi quantitativa utilizando um sistema de pontuação para formação de fibras colágenas, espessura do tecido e infiltrado inflamatório). Uma análise quantitativa foi realizada medindo a área e a espessura do tecido reacionário granulomatoso. Em conclusão, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os materiais com relação ao fibrosamento e à espessura do TGR. Contudo, Calen/OZ apresentou infiltrado inflamatório de menor intensidade, e Calen/OZE apresentou a melhor reação tecidual, seguida por Sealapex e OZE.

Pilownic *et al.*, em 2017, avaliaram o efeito de cinco materiais endodônticos para dentes decíduos em biofilmes de espécies mistas *in vitro*. Cimento de óxido de zinco e eugenol (OZE), Vitapex, pasta Calen espessada com óxido de zinco (OZE), pasta de hidróxido de cálcio puro ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) e iodofórmio foram avaliados. A água estéril foi usada como controle. O biofilme de espécies mistas foi incubado em condições anaeróbias por 21 dias e os espécimes de biofilme foram colocados em contato com os

materiais endodônticos por períodos de sete e 30 dias. O biofilme foi estudado usando microscopia confocal de varredura a laser. Após 30 dias, 69%, 51% e 35% do volume do biofilme vermelho fluorescente, indicando a proporção de bactérias mortas por cimento iodofórmio, Vitapex e OZE, respectivamente. Calen mais OZE e pasta pura de Ca (OH)₂ foram os materiais menos eficazes contra os biofilmes. Pasta de iodofórmio puro e iodofórmio contendo Vitapex foram os materiais mais eficazes contra os biofilmes.

Queiroz *et al.*, em 2011, avaliaram a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos BALB/com materiais obturadores radiculares indicados para dentes decíduos: óxido de zinco / cimento eugenol (OZE), pasta Calen espessada com óxido de zinco (Calen/OZE) e cimento Sealapex. Os camundongos (n = 102) receberam implantes de tubo de polietileno com os materiais, formando assim 11 grupos, como segue: I, II, III: Calen/OZEE por 7, 21 e 63 dias, respectivamente; IV, V, VI: Sealapex por 7, 21 e 63 dias, respectivamente; VII, VIII, IX: OZE por 7, 21 e 63 dias, respectivamente; X e XI: tubo vazio por 7 e 21 dias, respectivamente. Os tecidos biopsiados foram submetidos à análise histológica (análise descritiva e análise semi quantitativa utilizando um sistema de pontuação para formação de fibras colágenas, espessura do tecido e infiltrado inflamatório). Uma análise quantitativa foi realizada medindo a área e a espessura do tecido

reacionário granulomatoso. Em conclusão, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os materiais com relação ao fibrosamento e à espessura do TGR. Contudo, Calen/OZE apresentou infiltrado inflamatório de menor intensidade, e Calen/OZE apresentou a melhor reação tecidual, seguida por Sealapex e OZE.

Thosar *et al.*, 2018, avaliaram o efeito antimicrobiano da pasta contendo cimento de óxido de zinco misturado ao óleo de tomilho com o da pasta contendo óxido de zinco e eugenol contra *S.aureus*, *Escherichia coli*, *E. faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, patógenos comuns do canal radicular de dentes decíduos. O efeito antimicrobiano in vitro foi realizado pelo método de difusão em ágar. Todas as placas foram incubadas a uma temperatura de 37°C. As zonas de inibição em milímetros ao redor dos poços foram calculadas. Foram 6 repetições do teste para cada microrganismo. Zonas de inibição bacteriana foram maiores para a pasta de óleo OZ+Th contra os microrganismos patogênicos *S. aureus*, seguido por *E. Coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* enquanto para a pasta OZ + E, a ordem decrescente de microrganismos patogênicos foi *E. Colli*, *S. Aureus*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*. O presente estudo sugere que o uso de óleo de tomilho quando misturado com óxido de zinco em pó na forma de pasta mostrou zonas mais largas de inibição para *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* em

comparação com o óxido de zinco em pó que foi misturado com óleo de eugenol.

Santos *et al.*, em 2016, utilizaram o teste do micronúcleo na medula óssea de camundongos para avaliar os efeitos genotóxicos e citotóxicos de quatro pastas de preenchimento: óxido de zinco, hidróxido de cálcio PA, agregado trióxido mineral e uma pasta iodofornada (iodofórmio + canfora + paramonoclorofenol + rifamicina + prednisolona). Ratos suíços machos foram divididos em 4 grupos de 10 animais, cada um exposto a uma das pastas e foram subdivididos de acordo com as diluições testadas: 1/10, 1/50, 1/500 e 1/1000 administrados por via intraperitoneal (0,1 ml / 10g de peso). A ciclofosfamida foi o controle positivo. Os controles negativos foram dimetilsulfóxido e solução salina tamponada. Cinco animais foram mortos 24h, e cinco 48h após o tratamento. O material foi processado de acordo com Schmid (1976) e os micronúcleos foram contados em 1000 eritrócitos policromáticos (PCE), sob um microscópio óptico em um teste cego. A citotoxicidade foi avaliada utilizando a razão PCE / eritrócitos normocromáticos (ECN) em 200 eritrócitos. Houve significativamente maior ocorrência de micronúcleos nos animais tratados com a pasta de iodofórmio em todas as diluições testadas, nos dois tempos testados. Maior ocorrência de micronúcleos foi observada entre os animais tratados com óxido de zinco e sacrificados 48 horas após o tratamento, nas diluições 1:50; 1: 500

e 1: 1000. O hidróxido de cálcio PA e o agregado trióxido mineral não apresentaram efeitos genotóxicos ou citotóxicos. A genotoxicidade e a citotoxicidade do óxido de zinco e da pasta de iodoformio constituem um passo inicial para a contraindicação, mas estudos adicionais serão necessários para estabelecer com segurança os riscos envolvidos em seu uso.

2.2 PASTAS IODOFORMADAS

As pastas iodoformadas surgiram como uma opção alternativa a pasta OZE, e os estudos tem mostrado excelentes propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias, bem como boa radiopacidade e fácil reabsorção quando extravasada aos tecidos periapicais (KRAMER *et al.*, 2000; PRIYANKA; GOVARDHAN, 2013). Entretanto, como desvantagem tem odor forte e característico, possibilidade de alteração de cor das estruturas dentárias e potencial alergênico e citotóxico (REZENDE *et al.*, 2002).

No Brasil a pasta iodoformada denominada Pasta Guedes-Pinto tem sido o material obturador de escolha de grande parte das Faculdades de Odontologia (KRAMER *et al.* 2000). A pasta Guedes-Pinto foi proposta por Antônio Carlos Guedes Pinto e colaboradores em 1981 para obturação de canais radiculares de

dentes decíduos e consiste na associação de Rifocort, Paramonoclorofenol e Iodofórmio. A correta proporção deve ser: 23.8% de Rifocort, 7.0% de Paramonoclorofenol e 69.2% de iodofórmio, alterações nesta proporção podem modificar as propriedades biológicas e aumentar a sua toxicidade (MELLO-MOURA *et al.*, 2011),

Amorim *et al.*, em 2006, avaliaram por meio de dois métodos experimentais, a eficácia antimicrobiana de diferentes pastas obturadoras utilizadas em Odontopediatria. Os materiais testados foram: pasta Guedes-Pinto, pasta de óxido de zinco-eugenol, pasta de hidróxido de cálcio, cloranfenicol + tetraciclina + óxido de zinco e pasta de eugenol e Vitapex. Cinco cepas microbianas (*S. aureus*, *E. faecalis*, *P.aeruginosa*, *B. subtilis* e *C. albicans*) obtidas da American Type Culture Collection foram inoculadas em Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 37°C por 24 h. Para o teste de exposição direta (DET), 72 pontos de papel foram contaminados com as suspensões microbianas padrão e expostos às pastas de preenchimento do canal radicular por 1, 24, 48 e 72 h. Os pontos foram imersos em Letheen Broth (LB), seguido de incubação a 37°C por 48 h. Um inóculo de 0,1 mL obtido de LB foi então transferido para 7 mL de BHI, sob condições de incubação idênticas e o crescimento microbiano foi avaliado. O efeito antimicrobiano completo no teste de exposição direta foi observado após 24 horas em todos os indicadores microbianos.

Com base nos resultados deste estudo e dentro das limitações dessa metodologia, pode se concluir através do teste de exposição direta que todas as pastas de preenchimento do canal radicular (GPP, OZEP, CHP, CTZP, Vitapex®) tiveram um efeito antimicrobiano geral contra todos os indicadores microbianos após 24h. No teste de difusão em ágar, todos os materiais induziram a formação de zonas de inibição, exceto Vitapex® (faixa, 6,0-39,0 mm).

Praetzel *et al.*, 2008, compararam a eficácia antimicrobiana da pasta Guedes Pinto imediatamente após a terapia pulpar e em diferentes condições de armazenamento. Utilizaram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Enterococcus faecalis*. Utilizaram a amostra de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. As condições de armazenamento utilizadas foram: à temperatura ambiente - a pasta foi submetida a um processo natural de envelhecimento em temperatura ambiente por um período de 24 horas e 7, 14, 28, 60 e 90 dias (GPRT). Armazenamento em refrigerador: a pasta foi colocada em um processo de envelhecimento natural em um refrigerador a 4°C por um período de 24 horas e 7,14, 28, 60 e 90 dias (GPR). Para realizar a análise do efeito imediato (GPi ou tempo zero) de cada mistura à temperatura ambiente ou do frigorífico, o procedimento de preparação foi semelhante, embora GPR, iodofórmio, Rifocort e Paramonoclorofenol canforado foram armazenados no frigorífico e depois retirados, doseados e

manipulados, e tiveram seu efeito imediato testado após um período de 1 semana com armazenamento de temperatura média de 4°C. A metodologia de teste foi Diluição em Ágar Meio Sólido. Em conclusão, neste estudo a pasta GP mostrou atividade antimicrobiana em todos os tempos experimentais.

Piva *et al.*, no ano de 2009, avaliaram *in vitro* a ação antimicrobiana de materiais obturadores de canais radiculares de dentes decíduos por meio da difusão em ágar. Os materiais utilizados para teste neste estudo 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. Em conclusão neste estudo, as pastas Guedes-Pinto, CTZ, Callen® e o óxido de zinco e eugenol apresentaram ação antimicrobiana pelo método de difusão em ágar; O MTA e a pasta L&C® não apresentaram ação antimicrobiana pelo método de difusão em ágar.

Antoniazzi *et al.*, em 2015, avaliaram o potencial antimicrobiano do preenchimento de pastas, propondo três novas

associações farmacológicas para substituir a pomada Rifocort® com drogas de poder antimicrobiano já estabelecido: Nebacetin® pomada, 2% Gel Gluconato de Clorexidina e Maxitrol® pomada. Uma pasta composta de Iodofórmio, pomada Rifocort® e Paramonoclorofenol Canforado (PMCC) foi utilizada como padrão ouro (G1). As demais associações foram: Iodofórmio, Nebacetin® pomada e PMCC (G2); Iodofórmio, Digluconato de Clorexidina a 2% e PMCC (G3); Iodofórmio, Maxitrol® pomada e PMCC (G4). As associações foram testadas para *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), *Streptococcus oralis* (*S. oralis*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), utilizando os métodos de diluição em meio sólido - ágar de orifício - e diluição de caldo. Todas as pastas tiveram um efeito bacteriostático em todos os microorganismos, sem diferença estatisticamente significativa, em comparação com o G1. Todas as associações foram bactericidas para *E. coli*, *S. aureus*, *S. mutans* e *S. oralis*. Apenas G3 e G4 eram bactericidas para *E. faecalis*, enquanto nenhum produto era bactericida para *B. subtilis*.

Pires *et al.*, em 2016, avaliaram a citotoxicidade, estresse oxidativo e genotoxicidade *in vitro* de quatro pastas de iodofórmio e três pastas de hidróxido de cálcio. Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e DNA de timo de bezerro puro (dsDNA) foram expostos a extratos das pastas. A citotoxicidade foi

avaliada com o ensaio MTT. A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi avaliada usando um ensaio DCFH-DA, e a peroxidação lipídica foi avaliada usando um ensaio TBARS. A genotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio alcalino cometa e o teste de capacidade genomodificadora (GEMO). Todos os testes foram realizados após 24h e 72h de exposição celular, exceto GEMO. A exposição a pastas de clorexidina, Guedes-Pinto e hidróxido de cálcio resultou em um aumento significativo de ROS após 24h ($P < 0,05$), enquanto que as pastas de iodofórmio e Calen espessada com óxido de zinco aumentou significativamente as EROs após 72h ($P < 0,05$). O ensaio cometa revelou que a exposição dos PBMCs às pastas de iodofórmio não danificou o DNA em nenhum período de tempo ($P > 0,05$). No entanto, a pasta de clorexidina causou danos no DNA em dsDNA ($P < 0,05$). Já as pastas de hidróxido de cálcio causaram danos no DNA em ambos os testes ($P < 0,05$). Em conclusão neste estudo de Pires *et al.*, em 2016, as pastas variaram em sua capacidade de induzir citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo. As pastas Guedes-Pinto, Maxitrol e Sulfato de Neomicina + Bacitracina apresentaram melhor biocompatibilidade *in vitro*.

Pilownic *et al.*, 2017, realizaram um estudo com a finalidade de avaliar o pH, radiopacidade, efeito antimicrobiano, citotoxicidade e biocompatibilidade de materiais obturadores de dentes decíduos, o cimento de óxido de zinco e eugenol (OZE),

Vitapex e pasta Calen espessada com óxido de zinco (OZ), comparativamente a um novo material experimental a ser lançado no mercado à base de MTA. A radiopacidade foi testada usando uma escala milimetrada de alumínio, com um sensor digital. O pH dos materiais também foi avaliado nos períodos de 1, 4, 12h; 1, 3, 7, 15, e 30 dias (n=5). O teste de contato direto foi utilizado para avaliação da atividade antimicrobiana dos materiais contra uma cepa de *Enterococcus faecalis* após incubação por 1, 4, 12, e 24h (n=5). Para avaliação da citotoxicidade foi utilizado o teste de MTT para avaliação da viabilidade celular. No teste de biocompatibilidade, ratos Wistar receberam implantes subcutâneos contendo cada material obturador (n=5). Após biópsia, os tecidos foram submetidos à avaliação histológica em períodos de 15, 30 e 60 dias. O material experimental apresentou a menor radiopacidade (3.28 mm Al) e apresentou um pH superior a 12,0 durante todo o período experimental. O material experimental apresentou o maior efeito antimicrobiano, eliminando mais de 99,97% das bactérias em um período de 4 h. O Vitapex permitiu uma maior viabilidade celular em comparação aos demais materiais avaliados. Inicialmente, os testes de biocompatibilidade demonstraram inflamação de moderada a severa em todos os grupos. Após 60 dias, apenas o grupo Calen+OZ apresentou inflamação moderada, enquanto os outros materiais demonstraram predominantemente a indução de inflamação leve. Os resultados demonstraram que o

material experimental à base de MTA exibiu comportamento satisfatório com relação às propriedades avaliadas. Este estudo sugere que estudos adicionais, *in vivo*, são necessários para uma melhor avaliação do material.

2.3 HIDRÓXIDO DE CÁLCIO

O hidróxido de cálcio apresenta-se como um pó branco, alcalino (pH 12,8), pouco solúvel em água (solubilidade de 1,2 g/litro de água, à temperatura de 25° C). A ação do hidróxido de cálcio se dá pela liberação de íons cálcio e hidroxila. Trata-se de uma base forte, é obtido a partir da calcinação, aquecimento do carbonato de cálcio, até sua transformação em óxido de cálcio (cal viva). Com a hidratação do óxido de cálcio chega-se ao hidróxido de cálcio e a reação entre este e o gás carbônico leva à formação do carbonato de cálcio (ESTRELA *et al.*, 1999).

Lin *et al.*, em 2003, testaram o efeito individual e combinado de hidróxido de cálcio e clorexidina contra *E. faecalis*. O teste de difusão em ágar foi realizado em placas Mueller-Hinton. Os discos de papel foram impregnados com: (a) CaOH em pó com água estéril; (b) Pulpdent; (c) 0,12% de Peridex; (d) pó de CaOH com Peridex; e (e) Pulpdent com Peridex. Ampicilina serviu como controle. As placas foram incubadas a 37°C por 72 h. Peridex

mostrou zonas de inibição significativamente maiores em comparação com CaOH. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre Peridex e a combinação de CaOH e Peridex.

Barreto *et al.*, 2005, cita em seu estudo que a propriedade biológica do hidróxido de cálcio se deve a ativação da fosfatase alcalina pela elevação do pH (entre 8.6 e 10.3) produzido pela dissociação iônica. Essa enzima tem a capacidade de induzir os íons fosfato a reagirem com os íons cálcio, formando precipitados de fosfato de cálcio (hidroxiapatita), fato que caracteriza o processo de mineralização. Nesta revisão da literatura pode-se inferir que os íons hidroxila difundem-se pela dentina, elevando o pH do meio até valores que chegam a 12.6, produzindo um ambiente alcalino, o que favorece a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio e possibilitando a ativação da fosfatase alcalina, uma enzima fundamental para o processo de reparo ósseo. Além disso, os íons cálcio, também produzidos pela dissociação iônica do hidróxido de cálcio, permitem a redução da permeabilidade de novos capilares no tecido de granulação de dentes desvitalizados, diminuindo a quantidade de líquido intercelular e ativando a aceleração da pirofosfatase, a qual exerce um papel no processo de mineralização.

Jhamb *et al.*, 2010, avaliaram e compararam os efeitos antibacterianos da clorexidina e hidróxido de cálcio em

Enterococcus faecalis. O teste de difusão em ágar foi utilizado para avaliar os efeitos antibacterianos dos seguintes agentes antibacterianos: hexidina: gluconato de clorexidina a 0,2%; periogard: gluconato de clorexidina a 0,12%; hidróxido de cálcio em pó mais água estéril; metapaste mais água estéril; hidróxido de cálcio mais hexidina; hidróxido de cálcio mais periogard; metapaste mais hexidina; metapaste mais periogard. O tamanho médio das zonas de inibição após 72 horas foram: Hexidina: 5 mm; Periogard: 4,25 mm; Hidróxido de cálcio com água estéril: 0,5 mm; Metapaste adicionado de água estéril: 0,5 mm; Hidróxido de cálcio com hexidina: 4,7 mm; Hidróxido de cálcio com Periogard: 4 mm; Metapaste com Hexidina: 4,65 mm; Metapaste com Periogard: 4 mm. Concluíram neste estudo que a Clorexidina e suas preparações são agentes antibacterianos mais potentes contra *E. faecalis* em comparação ao hidróxido de cálcio.

Silva *et al.*, em 2010, avaliaram a resposta dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães após o preenchimento de canais radiculares com diferentes materiais. Quarenta raízes de pré-molares de cães foram preparadas biomecanicamente e distribuídas em 4 grupos preenchidos com: Grupo I: hidróxido de cálcio comercial e pasta à base de polietilenoglicol (Calen) espessada com óxido de zinco; Grupo II: pasta composta por iodofórmio, Rifocort e paramonoclorofenol canforado; Grupo III: cimento de óxido de zinco e eugenol; Grupo IV: solução salina estéril. Após 30 dias, as

amostras foram submetidas a processamento histológico. Os achados histopatológicos revelaram que nos Grupos I e IV as regiões apical e periapical exibiram aparência normal, com grande número de fibras e células e sem reabsorção de tecidos mineralizados. No Grupo II, observou-se discreto infiltrado inflamatório e discreto edema, com fibrogênese discreta e reabsorção óssea. O grupo III apresentou região periapical alterada e espessamento do ligamento periodontal com presença de células inflamatórias e edema. Pode-se concluir neste estudo, que a pasta Calen espessada com óxido de zinco produziu a melhor resposta tecidual, sendo o material mais indicado para preenchimento de canais radiculares de dentes decíduos com vitalidade pulpar.

Harini *et al.*, 2010, avaliaram a eficácia antibacteriana de quatro materiais obturadores do canal radicular, nomeadamente hidróxido de cálcio, óxido de zinco e eugenol, Vitapex e Metapex contra amostras microbianas obtidas diretamente de canais radiculares necróticos de dentes decíduos. Os espécimes microbianos foram coletados com pontos de papel estéreis, de 15 dentes posteriores superiores e inferiores mandibulares de crianças selecionadas aleatoriamente na faixa etária de 4-10 anos com dentes primários não vitais infectados, necessitando de procedimento de pulpectomia. Os espécimes microbianos coletados foram submetidos à análise microbiológica e o potencial antimicrobiano dos materiais obturadores dos canais foi testado

pela técnica de difusão em ágar. Organismos aeróbicos foram isolados em todos os casos, organismos anaeróbicos foram isolados em 80% dos casos e *Candida albicans* foi isolada em um caso. A OZE apresentou atividade inibitória superior contra a maioria dos organismos isolados, seguida por Vitapex, Hidróxido de Cálcio e Metapex, em ordem decrescente.

Em 2012, Lacativa *et al.*, avaliaram, pela técnica do implante intra-ósseo (teste de implante de tecido ósseo em cobaias é um teste secundário recomendado pelo Departamento Técnico do IDEO relatório nº 9 (6), que permite testar um material como ele é utilizado e preparado em situações clínicas, após as recomendações do fabricante), os materiais mais utilizados na terapia pulpar em odontopediatria: hidróxido de cálcio (HC), pasta Guedes Pinto e pasta CTZ, de acordo com recomendações do FDI (1980) e ANSI / ADA (1982). Trinta porquinhos-da-índia, 10 para cada material, divididos em períodos experimentais de 4 e 12 semanas receberam um implante em cada lado da sínfise da mandíbula. No final dos períodos de observação, os animais foram sacrificados e as amostras foram preparadas para exames histológicos de exame de rotina. Os resultados obtidos neste estudo concluíram que a Pasta Guedes Pinto demonstrou níveis aceitáveis de biocompatibilidade nos dois períodos analisados quando em contato próximo com tecido ósseo; O HC apresentou um alto grau de toxicidade no período experimental de quatro semanas, mas esse perfil mudou

significativamente em 12 semanas, quando HC apresentou evidência de biocompatibilidade; A pasta CTZ não apresentou níveis aceitáveis de biocompatibilidade nos dois períodos testados. De acordo com o IDE (6) e ANSI / ADA (7) critérios, HC e CTZ não devem ser usados em contato com tecido periapical devido ao potencial altamente irritante desses materiais.

Lima *et al.*, em 2013, compararam através de um ensaio clínico randomizado de boca dividida a eficácia de gel de clorexidina a 1%, hidróxido de cálcio/paramonoclorofenol canforado (Callen PMCC) e um tratamento endodôntico de sessão única contra *Streptococcus Mutans* e bactérias anaeróbias encontradas em primeiros molares com polpa necrótica, bem como avaliar taxas de sucesso clínico após 12 meses. Amostras intracanal pré e pós-tratamento foram coletadas de 37 dentes (de 21 crianças) para análise do número de estreptococos mutans e bactérias anaeróbicas. Critérios clínicos e radiográficos foram analisados para determinar o resultado do tratamento. O gel de clorexidina reduziu significativamente os níveis de *Streptococcus mutans* ($P = 0,010$), enquanto o Callen PMCC reduziu significativamente os níveis de bactérias anaeróbias ($P = 0,002$). Não foram observadas diferenças na redução de *Streptococcus mutans* ($P = 0,187$) e anaeróbios ($P = 0,564$) entre os grupos. As taxas de sucesso clínico foram de 85,71% (Callen PMCC), 78,57% (gel de clorexidina) e 77,77% (tratamento em única sessão). Os dentes tratados com

Callen PMCC apresentaram a maior taxa de sucesso clínico. O gel de clorexidina a 1%, bem como o hidróxido de cálcio / paramonoclorofenol canforado, apresentaram eficácia limitada na redução de bactérias dos canais radiculares de primeiros molares necróticos.

Guo *et al.*, em 2014, avaliaram a degradação do Ca(OH)_2 no lipopolissacarídeo (LPS) extraído de *Porphyromonas endodontalis* (Pe) in vitro e estimaram a influência do P e LPS pré-tratado com Ca(OH)_2 na proliferação de células MC3T3-E1. O efeito do Ca(OH)_2 na proliferação de células MC3T3-E1 foi detectado pelo ensaio metil tiazolil tetrazólio (MTT). Em seguida, o P e LPS foi tratado com Ca(OH)_2 por 30 minutos ou 60 minutos a 37 °C in vitro e a atividade do P e LPS foi avaliada pelo teste (CE TAL). Finalmente, as células MC3T3-E1 foram expostas a P e LPS pré-tratado com 15% de Ca(OH)_2 por 1, 3 e 5 de a proliferação celular foi medida usando o ensaio MTT comparando com o grupo controle de P e LPS. Comparado com o controle negativo, a exposição de células a 5%, 10% e 15% de Ca(OH)_2 promoveu bastante a proliferação de células MC3T3-E1. Pe LPS tratado com 10% e 15% Ca(OH)_2 apresentou os melhores resultados pelo CE TAL e diferença significativa em comparação ao grupo controle P e LPS. Quando 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de P e LPS foi pré-tratado com 15% de Ca(OH)_2 , não foi observada inibição da proliferação de células

MC3T3-E1. O Ca(OH)_2 desintoxica o P e LPS in vitro, atenua o impacto do P e LPS na proliferação celular MC3T3-E1.

Lima, *et al*, em 2015, avaliaram a biocompatibilidade de duas pastas formuladas para preencher os canais radiculares de dentes decíduos. Um grupo de estudo de 54 ratos recebeu implantes de tecido subcutâneo de tubos de polietileno contendo CTZ ou pasta de hidróxido de cálcio ou, como controle negativo, tubos vazios. A biocompatibilidade foi avaliada nos dias 7, 21 e 63, resultando em um total de nove grupos de seis animais cada. Após os intervalos experimentais, as áreas dos implantes foram removidas e submetidas ao processamento histológico. Após a coloração dos tecidos com HE e tricrômio de Masson, dois patologistas realizaram uma análise histológica das amostras de maneira cega. A formação de fibras de colágeno, a espessura do tecido e a infiltração de células inflamatórias foram analisadas qualitativamente. A morfometria quantitativa foi realizada para a espessura, comprimento do perímetro e área de tecido da região em contato direto com o tubo aberto. Aos 7 dias, todos os grupos apresentaram infiltrados inflamatórios agudos graves. A inflamação foi reduzida aos 21 dias no grupo da pasta CTZ. Infiltrados inflamatórios crônicos leves foram observados após 63 dias nos grupos de pasta CTZ e Ca(OH)_2 ; esses grupos também mostraram uma diminuição significativa na densidade das fibras de colágeno ($P < 0,05$), o que não foi observado no grupo controle. A

espessura média do tecido, o comprimento do perímetro e a área em contato com o tubo diminuíram durante os períodos experimentais em todos os grupos. Concluíram então que, as pastas CTZ e hidróxido de cálcio demonstraram biocompatibilidade com tecido subcutâneo neste modelo experimental.

Dianat *et al.*, em 2015, compararam a atividade antimicrobiana de nano partículas de hidróxido de cálcio (NHC) e hidróxido de cálcio contra *E. faecalis*. A atividade antimicrobiana do NHC contra *E. faecalis* foi avaliada por dois testes independentes: a concentração inibitória mínima (CIM) do medicamento intracanal e o teste de difusão em ágar (ADT). A eficiência do medicamento nos túbulos dentinários foi avaliada em 23 blocos dentários humanos que foram inoculados com *E. faecalis*. Os blocos dentários foram divididos em um grupo controle (irrigação com solução salina) e dois grupos experimentais recebendo CHC e NHC como medicação intracanal. Concentração mínima inibitória (CIM) para NCH foi 1/4 da CIM para CH. NCH com água destilada (DW) produziu a maior zona de inibição no teste de difusão em ágar. O NHC apresentou maior atividade antimicrobiana em amostras de dentina de profundidades de 200 e 400 μm em comparação ao HC. A atividade antimicrobiana do NHC foi superior ao HC no meio de cultura. Nos túbulos dentinários, a eficácia do NHC foi novamente melhor que o HC nas amostras de 200 e 400 μm . Este estudo conclui que

Nanopartículas de hidróxido de cálcio têm atividade antimicrobiana superior contra *E. faecalis* em comparação com o hidróxido de cálcio convencional, nos meios de cultura bem como nos túbulos dentinários.

Tabrizzadeh *et al.*, 2015, avaliaram o efeito antimicrobiano de Hidróxido de Cálcio (HC) + betametasona e solução salina de HC contra *Enterococcus faecalis* usando o teste de difusão em ágar e medindo a zona de inibição microbiana (ZIM). Foram preparadas quatro placas contendo caldo de Mueller-Hinton e meio de cultura de *E. faecalis*. Em cada placa, foram criados 5 orifícios (5×3 mm) e uma mistura cremosa de HC + betametasona foi inserida nos orifícios. Dois furos com discos de ampicilina e dois furos vazios foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. As placas foram incubadas por 24h e, em seguida, o diâmetro do ZIM microbiano foi medido. A mistura de HC + betametasona apresentou bons efeitos antimicrobianos contra *E. faecalis*.

Ooi *et al.*, 2019, compararam a atividade antimicrobiana da pediocina com clorexidina e hidróxido de cálcio contra os biofilmes de *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus epidermidis*. Os canais radiculares preparados de 80 dentes foram contaminados com *E. faecalis* (n = 40) e *S. epidermidis* (n = 40) por 21 dias para criar biofilmes. As amostras de cada grupo foram alocadas aleatoriamente nos quatro subgrupos (n = 10), de acordo com o

protocolo de descontaminação: Grupo 1: Pediocina 1%, Grupo 2: CHX 2%, Grupo 3: Ca(OH)₂ e Grupo 4: solução salina (controle negativo). Não houve crescimento bacteriano nas amostras tratadas com pediocina, CHX ou Ca(OH)₂.

Siqueira & Lopes em 1999, em uma revisão crítica da literatura salientaram que as propriedades físico-químicas do hidróxido de cálcio podem limitar sua efetividade na desinfecção do sistema de canais radiculares. O hidróxido de cálcio tem um grande valor em endodontia, sendo indicado para várias condições clínicas, porém, não é uma medicação eficaz contra todas as espécies bacterianas encontradas nas infecções radiculares, e suas propriedades físico-químicas podem limitar sua eficácia na desinfecção de todo o sistema de canais radiculares a curto prazo. Dessa forma, justifica-se sua associação à outra substância objetivando aumentar a atividade antimicrobiana.

Souza-Filho *et al.*, 2008, avaliaram a atividade antimicrobiana e o pH das seguintes substâncias: gluconato de clorexidina 2% gel (CHX), hidróxido de cálcio Ca(OH)₂ e sua combinação com iodofórmio e óxido de zinco. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em ágar e foram testados os seguintes microrganismos: *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Os níveis de pH foram determinados imediatamente após o preparo,

após 24 horas e uma semana, o pH médio de todos os medicamentos permaneceu acima de 12,0 durante todo o experimento, exceto o gel CHX (pH = 7,0). Todos os medicamentos testados apresentaram atividade antimicrobiana, porém a mais eficaz contra os microrganismos testados foi CHX, seguida de sua associação ao Ca(OH)_2 e iodofórmio. Estes resultados permitiram concluir que todos os medicamentos tiveram atividade antimicrobiana, no entanto, a maior foi da CHX gel 2%, seguido da associação com o Ca(OH)_2 e iodofórmio.

2.4 CLOREXIDINA

É um anti-séptico químico, com ação antifúngica e bactericida, capaz de eliminar tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas. Quando utilizada em altas concentrações sua ação antimicrobiana se dá pela ligação de moléculas catiônicas às paredes celulares das bactérias que são carregadas negativamente, levando ao rompimento da parede celular interferindo no mecanismo de transporte e favorecendo a coagulação do citoplasma pela alta afinidade às proteínas. Possui também ação bacteriostática quando usada em baixas concentrações, onde substâncias de baixo peso molecular escapam pela membrana citoplasmática, inibindo a proliferação bacteriana (GREENSTEIN *et al.*, 1986; LINDSKOG *et al.*, 1998).

Sua toxicidade conforme a DL 50 é de 1.800 mg/kg/dia (peso corporal) o que a torna praticamente atóxica, além de não ser poluente e não exalar gases. A Clorexidina possui pH de 5 a 8, sendo a faixa entre 5 e 7 a de maior eficácia antibacteriana (Zerella *et al.*, 2005, Anvisa, 2017). A fórmula gel da clorexidina possui baixa toxicidade aos tecidos periapicais; ela se adere as paredes do canal radicular e aos túbulos dentinários mantendo o agente ativo e sua atividade antibacteriana residual na superfície da dentina após uma semana de exposição da sua exposição; também é solúvel em água, facilitando sua remoção (BASRANI *et al.*, 2002., FERRAZ *et al.*, 2001).

Ferraz *et al.*, 2001 estudaram o gluconato de clorexidina na forma gel como irrigante endodôntico. A habilidade antimicrobiana e de limpeza mecânica da substância tendo como base o gel natrosol foi avaliada *in vitro*. Setenta dentes humanos extraídos com acesso coronário realizado foram contaminados com *E. faecalis* e posteriormente divididos em três grupos de acordo com o irrigante a ser utilizado: clorexidina 2% gel, clorexidina 2% líquida e NaOCl 5,25%. Após o preparo, coletas com cone de papel absorvente foram realizadas em cada um dos espécimes, e colocadas em frascos contendo o meio de cultura BHI estéril para avaliar o crescimento microbiano. Os resultados mostraram não haver diferença significativa entre as três substâncias testadas. A clorexidina 2% gel apresentou os melhores resultados com relação

à limpeza das paredes dentinárias, provavelmente em função das propriedades mecânicas do gel.

Tanomaru Filho *et al.*, em 2002, avaliaram a resposta inflamatória a soluções de irrigação injetadas na cavidade peritoneal de camundongos. Sessenta camundongos receberam injeções intra-peritoneais de 0,3 mL de hipoclorito de sódio a 0,5%, digluconato de clorexidina a 2,0% ou solução salina tamponada com fosfato (PBS, controle). Cinco animais de cada grupo foram sacrificados aos 4, 24, 48 h e 7 dias após a injeção. O líquido da cavidade peritoneal de cada animal foi coletado para a contagem total e diferencial de células inflamatórias e vazamento de proteínas. O grupo da solução de hipoclorito de sódio a 0,5% apresentou maior migração de neutrófilos e células mononucleares para a cavidade peritoneal de 48 a 168h ($P < 0,05$). Houve um aumento significativo no vazamento de proteínas para a cavidade peritoneal após 4 a 48h no grupo hipoclorito de sódio a 0,5% em comparação ao grupo controle. O vazamento de proteínas foi semelhante em todos os grupos às 168 h. O grupo de clorexidina a 2,0% teve resultados semelhantes aos do grupo controle em todos os períodos de tempo. A solução de hipoclorito de sódio a 0,5% induziu uma resposta inflamatória; no entanto, a solução de digluconato de clorexidina a 2,0% não induziu uma resposta inflamatória significativa.

Gomes *et al.*, 2006, mostraram em seu estudo que as pastas manipuladas com Ca(OH)_2 adicionadas com gel de clorexidina a 2% foram eficazes contra todos os microrganismos testados, incluindo *Enterococcus faecalis*, mostrando maiores zonas de inibição e tempos mais curtos para eliminá-los, do que aqueles feitos com água estéril como veículo. Além disso, a presença de Ca(OH)_2 na formulação da pasta atua como uma barreira física, que permanecerá no canal radicular por mais tempo, impedindo a reinfecção do canal radicular, interrompendo o suprimento de nutrientes para as bactérias restantes e atrasando a recontaminação. Além disso, a presença de clorexidina acrescenta substantividade à formulação, devido à sua capacidade de adsorção e liberação lenta de moléculas ativas para os tecidos dentários. Portanto, a clorexidina poderia manter o canal livre de microrganismos, mesmo depois de ser removida do canal. A substatividade da Clorexidina sustenta a atividade antimicrobiana ao longo de período de 48 horas, 72 e até 7 dias depois de ser removida do canal radicular.

Barbin, *et al.*, 2008 objetivaram em seu estudo determinar se a paracloroanilina (PCA) e/ou espécies reativas de oxigênio (ROS) são gerados pela clorexidina (CHX) sozinha ou após CHX ser misturado com hidróxido de cálcio em diferentes períodos de tempo. A espectrometria de massa foi realizada para detectar PCA em amostras de 0,2% de CHX e Ca(OH)_2 misturado com 0,2% de

CHX. Cromatografia líquida de alta eficiência foi usada para confirmar a presença de CHX na mistura com Ca(OH)_2 . As amostras foram analisadas imediatamente após a mistura e após 7 e 14 dias. Durante os intervalos do experimento, as amostras foram mantidas a $36,5^\circ\text{C}$ e 95% de umidade relativa. PCA foi detectado na solução de CHX a 0,2% após 14 dias. A mistura de CHX com Ca(OH)_2 liberou ROS em todos os momentos, mas nenhum vestígio de CHX estava presente na mistura resultante da degradação imediata do CHX. O estudo sugere que se deve enfatizar que métodos experimentais, indicadores biológicos, concentração e tempo de exposição podem influenciar a magnitude de os efeitos antimicrobianos medidos de várias substâncias. Essa medição deve ser levada em consideração para a escolha de um agente antimicrobiano em uma concentração que possa ser eficaz contra o alvo microrganismos, sem causar danos sistêmicos ao paciente. Mais pesquisas são necessárias para avaliar a concentração de CHX que é segura para uso humano e contempla as propriedades ideais.

Signoretti *et al.*, 2011 avaliou a influência do gel de clorexidina a 2% (CHX) no pH, liberação de cálcio, e capacidade de Ca(OH)_2 de reduzir endotoxinas. A liberação de cálcio foi verificada por espectrofotometria de absorvância atômica e o pH foi medido com um medidor de pH. Para quantificação da endotoxina, dentes humanos extraídos previamente contaminados

com endotoxina padrão foram preenchidos com: solução salina Ca(OH)₂ do grupo I; grupo II, Ca(OH)₂ CHX; e grupo III, CHX por 14 dias, a endotoxina restante foi quantificada usando teste quantitativo cromogênico. Os resultados mostraram que a associação de hidróxido de cálcio com clorexidina aumenta a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio, o que resulta em atividade mais eficaz contra microorganismos resistentes sem interferir nas propriedades biológicas de hidróxido de cálcio.

Basrani *et al.*, em 2003, avaliaram a eficácia do hidróxido de cálcio (associado ou não a clorexidina 0,2% gel) e da clorexidina (0,2% e 2% em gel ou solução), através do teste de difusão em ágar e crescimento microbiano após inoculação em canais radiculares de dentes humanos extraídos. Para mensuração da densidade óptica, as amostras foram coletadas dos canais infectados após sete dias da colocação da medicação e foram cultivadas por 24 horas para detecção de bactérias viáveis. No teste de difusão em ágar, a clorexidina foi eficaz contra *Enterococcus faecalis* proporcionalmente a concentração, entretanto o hidróxido de cálcio não apresentou efeito. No teste de crescimento microbiano, a clorexidina apresentou resultado significativamente melhor contra *E. faecalis* que o hidróxido de cálcio ($P < .05$), mas não houve diferenças significativas entre as formas e concentrações de clorexidina. Os 17 autores ainda ressaltam que a clorexidina aplicada como gel ou solução pode alcançar irregularidades do

sistema de canais radiculares melhor que a pasta de hidróxido de cálcio.

Basrani *et al.*, 2004 avaliaram as as propriedades físico-químicas (pH, ângulo de contato, tempo, radiopacidade e viscosidade) da clorexidina (CHX) em forma de gel em diferentes concentrações e medicamentos contendo hidróxido de cálcio. Neste estudo, os resultados mostraram que CHX não afetou o pH, a radiopacidade e o tempo de presa dos medicamentos contendo hidróxido de cálcio ($p < 0,05$). Esta pesquisa mostrou que a CHX em diferentes concentrações e em combinação com o hidróxido de cálcio tem propriedades físico-químicas satisfatórias para ser usado como uma medicação intracanal.

Vouzara *et al.*, em 2016, avaliaram a capacidade de irrigantes do canal radicular comumente usados para induzir efeitos citotóxicos, quando aplicados isoladamente ou em combinação. A hipótese testada foi de que os irrigantes eram menos citotóxicos quando aplicados em combinação do que independentemente. As células MRC5 foram cultivadas como culturas de monocamada a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ no ar e 100% de umidade relativa. As células foram expostas a hipoclorito de sódio (NaOCl), ácido etilendiaminotetracético (EDTA), clorexidina (CHX) e suas combinações (NaOCl/EDTA, NaOCl/CHX, EDTA/CHX) em diluições em série. O meio de crescimento foi o meio Eagle

modificado por Dulbecco, suplementado com soro fetal bovino a 10% e antibióticos e foi usado como controle. O efeito na sobrevivência celular foi estimado após 6 e 24h de exposição por meio do ensaio de sulforodamina B, em referência aos controles. As curvas dose-resposta foram plotadas e doses inibitórias de 50% (IC50) foram submetidas a análise estatística (anova e teste de comparação post hoc; $P < 0,05$). A análise da sobrevivência celular e interação dos irrigantes foi realizada usando o software analisador de efeito de dose CalcuSyn para calcular um índice de combinação (IC). Os irrigantes testados eram citotóxicos de maneira dependente da dose e do tempo. O CHX foi o irrigante mais citotóxico testado, seguido pelo NaOCl, enquanto o EDTA foi o irrigante menos citotóxico testado. A diferença entre CHX e NaOCl foi significativa ($P < 0,05$), bem como entre NaOCl e EDTA ($P < 0,05$). Com base na modelagem CalcuSyn, um efeito principalmente antagônico foi registrado com as combinações NaOCl/CHX e NaOCl/EDTA. A combinação EDTA/CHX teve um aditivo ao efeito antagônico. CHX foi significativamente mais citotóxico que NaOCl e EDTA. NaOCl foi significativamente mais citotóxico que EDTA. A ação combinada dos irrigantes não produziu um aumento significativo em sua citotoxicidade.

Botton *et al.*, em 2016, avaliaram a toxicidade *in vitro* de soluções irrigantes e associações farmacológicas utilizadas na pulpectomia de dentes decíduos. Foram realizados testes de

viabilidade celular (MTT), peroxidação lipídica (TBARS), cometa alcalina de cometa e GEMO para avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade de soluções: hipoclorito de sódio (1% e 2,5%), 2% de clorexidina, 6% de ácido cítrico e 17% EDTA, que foram testados, individualmente e em associação, expondo células mononucleares do sangue periférico humano (MTT, TBARS e ensaio de cometa alcalino), às 24 e 72 h, e dsDNA (GEMO). Todas as soluções de irrigação e associações farmacológicas reduziram a viabilidade celular às 24 h ($P < 0,05$). Essas reduções foram mantidas após 72 h, exceto EDTA e associações de hipoclorito de sódio (1% e 2,5%) com EDTA e de clorexidina com EDTA. A peroxidação lipídica às 24 h foi causada por EDTA e por hipoclorito de sódio a 2,5% com EDTA; também foi causado às 72 horas por hipoclorito de sódio (1% e 2,5%) e pelas três associações com ácido cítrico ($P < 0,05$). Todos os grupos causaram danos ao DNA quando avaliados pelo ensaio do cometa alcalino, às 24 e 72 h ($P < 0,05$). No ensaio GEMO, todos os grupos causaram danos ao dsDNA ($P < 0,05$), exceto a clorexidina com EDTA. Todos os grupos apresentaram algum nível de toxicidade. Dentre as principais soluções, a clorexidina apresentou menor potencial citotóxico. O EDTA foi o menos citotóxico das soluções auxiliares de irrigação, e a associação dessas duas soluções mostrou o menor potencial de toxicidade entre todos os grupos.

Widbiller *et al.*, em 2019, avaliaram as propriedades antibacterianas de irrigantes utilizados para desinfecção em procedimentos endodônticos regenerativos incluindo clorexidina (CHX). Neste estudo, foi hipotetizado que o CHX tem um efeito direto quando aplicado nas células-tronco da papila apical (SCAPs) e um efeito indireto quando os SCAPs são expostos à dentina previamente condicionada com CHX. A toxicidade celular foi avaliada *in vitro* usando o teste de fluorescência verde CellTox (Promega, Madison, WI) e CellTiter-Glo (Promega) após os SCAPs serem expostos diretamente a uma faixa de concentração dinâmica de CHX; culturas de explantes de papila apicais foram coradas com ApopTag (Merck Millipore, Billerica, MA) após cultura com CHX. Além disso, lajes padronizadas de dentina humana foram tratadas com CHX e enxaguadas consecutivamente em EDTA, L- α -lecitina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) ou L- α -lecitina seguida de EDTA. Os SCAPs foram cultivados nas lajes por 5 dias, e a viabilidade celular foi determinada (efeito indireto). A exposição direta de SCAPs ao CHX afetou altamente a viabilidade celular em concentrações acima de 10-3%, enquanto que concentrações mais baixas não tiveram efeito adverso. Durante os 60 minutos iniciais, concentrações de 10-2% de CHX ou superior resultaram em toxicidade precoce pronunciada com um efeito máximo dentro de 15 minutos após a exposição. Da mesma forma, as placas de dentina condicionadas ao CHX foram

prejudiciais à sobrevivência do SCAP; no entanto, os efeitos deletérios foram completamente revertidos por neutralização com L- α -lecitina. Em conclusão, CHX usado em concentrações clinicamente relevantes afeta a sobrevivência do SCAP direta e indiretamente. Esses efeitos podem ser contornados pela limitação do tempo de irrigação (efeitos diretos) e neutralização subsequente com L-a-lecitina (efeitos indiretos). Portanto, o CHX pode ser irrigante promissor, porém mais estudos são necessários para determinar a resultado regenerativo após a desinfecção com CHX em uma situação in vivo.

2.5 SULFATO DE NEOMICINA

A neomicina é um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro descoberta em 1949, produzida pelo actinomiceto *Streptomyces fradiae*. É usado para tratar algumas infecções de pele, hepáticas ou intestinais e em profilaxia pré-cirúrgica. Atua mais sobre as espécies gram-negativas altamente sensíveis que incluem: *Escherichi acoli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebisiella* sp., *Salmonella* sp., *Serratia* sp., *Shigella* sp. e *Proteus vulgaris*. Os micro-organismos gram-positivos que são inibidos incluem *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*. (WAKSMAN, et al.1949).

Ela está na composição do Otosporin® em associação com a hidrocortisona (corticóide), e sulfato de polimixina B atuando ambos como antibiótico. O Otosporin® já é utilizado em Endondia como curativo de demora em casos de sobreinstrumentação e de periodontite apical aguda de etiologia traumática ou química (RUIZ *et al.* 2002). Atua também reduzindo a vasodilatação, a exsudação de líquido, e também apresenta uma ação direta vasoconstritora sobre os vasos sanguíneos pequenos (SILVA *et al.* 2004).

Joslin, *et al.*, em 1989, desenvolveram um ensaio microcalorimétrico de fluxo para Neomicina, o qual é monitorado por meio da interação do antibiótico com *Bacillus pumilus* como organismo de teste. O ensaio tem melhor reprodutibilidade (desvio padrão relativo 2,3%) e é mais sensível que o bioensaio microbiológico convencional (0,5-2 microgramas ml⁻¹). Os efeitos das combinações com bacitracina de zinco, com sulfato de polimixina B e com bacitracina de zinco e sulfato de polimixina B (ambos em proporções equimolares) e nas proporções presentes na preparação comercial TrisepR (ICI, Macclesfield, Reino Unido) também foram investigados. Sinergia foi observada para as combinações de Neomicina com os outros dois antibióticos em misturas binárias nas proporções relativas encontradas em TrisepR. A adição de todos os três antibióticos nos níveis usados no TrisepR não mostrou sinergia. No entanto, a adição de todos os três

antibióticos em concentrações equimolares mostrou sinergia. É sugerido que a microcalorimetria pode ser útil em experimentos *in vitro* para explorar as proporções relativas necessárias para o efeito máximo em combinações de antibióticos.

Booth, *et al*, em 1994, avaliaram o sulfato de neomicina, bacitracina e sulfato de polimixina B combinados em preparações tópicas para fornecer um espectro antimicrobiano complementar para a prevenção de infecções de feridas menores. A conveniência da inclusão de sulfato de neomicina tem sido questionada, pois pode causar sensibilização por contato. Para avaliar o valor da neomicina, titulações de xadrez de microdiluição foram usadas para determinar as interações *in vitro* entre combinações de dois e três antibióticos contra cepas de referência de bactérias comumente associadas a infecções de feridas. Usando índices de concentração inibitória fracionária (FIC) ($<0,5$ indica sinergismo com combinações de duas drogas), a combinação de neomicina / bacitracina foi sinérgica para *S. aureus* e *Ps. aeruginosa*; neomicina / polimixina B foi sinérgica para *E. faecalis*, e a combinação bacitracina / polimixina B foi sinérgica contra *Ps. aeruginosa*. Uma combinação de três drogas de neomicina / bacitracina / polimixina B teve valores de FIC de <1 para todos os organismos, indicando sinergia e substanciando o papel clínico do sulfato de neomicina nas formulações tópicas atuais.

Pastores., *et al.*, em 1995, avaliaram o efeito tóxico de três potenciais produtos químicos de sensibilização por contato [o antibiótico aminoglicosídico sulfato de neomicina, o anestésico local benzocaína e o sensibilizador primário 2,4-dinitrobenzeno 1-sulfonato, sal de sódio (DNBS)] em queratinócitos humanos em cultura foi examinado. Os três produtos químicos foram comparados com relação ao seu potencial citotóxico (determinado por ensaio de coloração com violeta de cristal), seu potencial de ruptura da membrana ([3h] ensaio de liberação de ácido araquidônico), e seus efeitos na expressão do mRNA da interleucina 1 α (IL-1 α) [reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR)]. Nas concentrações utilizadas, o sulfato de neomicina (0,004–0,32%) e a benzocaína (0,0165–0,165%) não apresentaram citotoxicidade relevante ou perturbação da membrana. Por outro lado, DNBS (0,001-1%) causou uma resposta citotóxica dependente da dose significativa em concentrações superiores a 0,1%, enquanto o ensaio de liberação de ácido araquidônico [3 h] indicou ausência de atividade de perturbação da membrana em toda a faixa de concentrações de DNBS examinado. Os efeitos dos três sensibilizadores na expressão do mRNA de IL-1 α foram variados; o sulfato de neomicina causou uma indução dependente da dose de mRNA de IL-1 α , a benzocaína não afetou significativamente seu sinal e o DNBS suprimiu a expressão do gene IL-1 α .

Grzybowska, *et al*, em 2004, analisaram a interação da atividade da neomicina com o segundo antibiótico em medicamentos multiantibióticos distribuídos na Polônia em padrões e cepas bacterianas clínicas. Os resultados do tabuleiro de damas para todas as cepas demonstraram sinergismo para 2,5% das combinações, apenas para cepas padrões. Em um caso de *Salmonella Enteritidis*, em combinação de neomicina com bacitracina, foi observado efeito de inibição. Os efeitos aditivos foram predominantes - 49%. Em 18% dos efeitos neutros foram mostrados, mas em 26% das combinações os índices FIC não foram possíveis de calcular, devido à resistência das cepas clínicas à concentração mais alta de pelo menos um antibiótico. Em combinação de aminoglicosídeo (neomicina) com antibióticos beta-lactâmicos (ampicilina, procaína penicilina) *in vitro*, nenhuma sinergia foi observada para todas as cepas examinadas. Os melhores resultados foram alcançados para combinações de neomicina com antibióticos peptídicos (polimixina, gramicidina e bacitracina) - 5 para todos os 6 efeitos de sinergia observados. 5% das combinações, apenas para cepas padrões.

Schaefer, *et al*, em 2012, avaliaram tratamentos para a otite externa aguda. Uma preparação ótica de neomicina / polimixina B / hidrocortisona seria uma terapia de primeira linha devido à sua eficácia e baixo custo. Antimicrobianos tópicos ou antibióticos, como ácido acético, aminoglicosídeos, polimixina B e quinolonas,

são o tratamento de escolha em casos não complicados. Esses agentes vêm em preparações com ou sem corticosteróides tópicos; a adição de corticosteroides pode ajudar a resolver os sintomas mais rapidamente. No entanto, não há boas evidências de que uma preparação antimicrobiana ou antibiótica seja clinicamente superior a outra. A escolha do tratamento é baseada em uma série de fatores, incluindo o estado da membrana timpânica, perfis de efeitos adversos, problemas de adesão e custo. As preparações de neomicina / polimixina B / hidrocortisona são uma terapia de primeira linha razoável quando a membrana timpânica está intacta.

Arbid, *et al.*, em 2013, avaliaram o Vicine que é hidrolisado pela microflora em um composto divicina altamente reativo, gerador de radicais livres que causa mortalidade e outros efeitos adversos. Este estudo em ratos estabeleceu o efeito de um antibiótico de amplo espectro e mal absorvido, sulfato de neomicina, sobre a toxicidade de vicine. Os resultados mostraram redução extrema na taxa de mortalidade no grupo pré-tratado com neomicina. Hemoglobina Concentração de (Hb), valor de hematócrito (Hct) e contagem de glóbulos vermelhos (RBCs) diminuíram significativamente após a injeção de vicino e a melhora desses valores no grupo pré-tratado com neomicina. Os mesmos resultados foram observados em glóbulos brancos (WBCs). Os resultados mostraram uma diminuição significativa no nível de glicose e voltaram ao normal no grupo pré-tratado com neomicina.

A glutationa (GSH) diminuiu significativamente no grupo vicino e voltou ao valor normal no grupo pré-tratado com neomicina. O peróxido lipídico (TBARs) aumentou significativamente no grupo tratado com vicine e grupo pré-tratado com neomicina diminuiu para o nível normal. A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6-PD) foi significativamente reduzida e retornou ao nível normal em ratos pré-tratados com neomicina. A proteína sérica e a globulina diminuíram significativamente, mas a albumina sérica mostrou diminuição insignificante nos grupos vicino e neomicina em comparação ao controle. Alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) diminuiu significativamente no grupo vicino. O grupo pré-tratado com neomicina mostrou significativamente aumento das atividades de AST e ALT em comparação com o grupo vicino. Em conclusão, o pré-tratamento com neomicina de ratos injetados com glicosídeo vicine diminuiu em grande medida seus efeitos tóxicos e de mortalidade e é útil no favorecimento e na anemia hemolítica.

Zhang *et al.*, em 2015, avaliaram a toxicidade dos antibióticos aminoglicosídeos (AG) em ambientes aquáticos e suas misturas mudam com o tempo e se as misturas de antibióticos AG exibem uma interação toxicológica. Neste artigo, quatro antibióticos AG, sulfato de apramicina, diidroestreptomicina, sulfato de canamicina e sulfato de neomicina, foram selecionados como componentes da mistura para construir seis sistemas de

mistura binários. Cinco raios com diferentes razões de concentração foram projetados usando o procedimento de design de raios de equipartição direta para cada sistema. As toxicidades de antibióticos únicos e suas misturas binárias para *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67 (*V. qinghaiensis*) em cinco pontos de tempo, 0,25, 2, 4, 8 e 12 h, foram determinados pelo método de análise de toxicidade em microplaca dependente do tempo. Verificou-se que os antibióticos AG e suas misturas binárias apresentam toxicidade dependente do tempo para *V. qinghaiensis*, ou seja, sua toxicidade aumenta com o tempo. Tomando a adição da concentração como referência do aditivo, verificamos que as toxicidades de todas as misturas são aditivas de concentração, ou seja, a aditividade não muda com o tempo, concentração e razão de concentração.

Sun., *et al.*, em 2019, avaliaram a neomicina que pertence à família dos antibióticos aminoglicosídeos contendo desoxistreptamina. É amplamente utilizado para infecções bacterianas, visando a maioria das bactérias gram-negativas e algumas bactérias gram-positivas. Também foi relatado que a neomicina mostra atividade antiviral. Avaliamos a toxicidade do sulfato de neomicina e investigamos seu efeito na imunidade não específica e na infecção viral em carpa cruciana (*Carassius auratus gibelio*). A concentração segura de sulfato de neomicina para carpa cruciana foi determinada como sendo 102,9 mg / kg in vivo. Em ensaios de dano oxidativo, o sulfato de neomicina

aumento de superóxido dismutase e atividade da catalase e diminuição do malondialdeído no fígado da carpa cruciana. Em ensaios imunes ao sangue não específicos, a contagem de leucócitos e o conteúdo do complemento aumentaram significativamente após o tratamento com sulfato de neomicina, enquanto nenhuma alteração significativa foi observada na atividade antibacteriana ou da lisozima. Em um teste de desafio, o sulfato de neomicina protegeu a carpa cruciana da infecção do herpes vírus ciprinídeo 2 (CyHV-2) e inibiu a replicação do CyHV-2. No ensaio de citotoxicidade, baixas concentrações de sulfato de neomicina não apresentaram citotoxicidade nas células das barbatanas da carpa cruciana. Os resultados do presente estudo indicam que a administração oral de sulfato de neomicina reduziu o dano oxidativo, aumentou a imunidade e forneceu proteção contra CyHV-2 em carpa cruciana.

Blanchard, *et al.*, em 2015, fizeram uma triagem de uma biblioteca de drogas aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) revelou que o antibiótico sulfato de neomicina potencializa a atividade antimicrobiana da mupirocina, enquanto outros antibióticos da biblioteca não. Estudos preliminares do mecanismo de ação indicam que a atividade potencializadora da neomicina pode ser mediada pela inibição da função RNase P do organismo, uma enzima que se acredita participar da via de processamento do tRNA imediatamente a montante do alvo primário da mupirocina.

A atividade antimicrobiana melhorada de neomicina e mupirocina foi mantida em formulações de pomadas e reduziu a carga bacteriana de *S. aureus* em modelos murinos de colonização nasal e infecções no local da ferida. A terapia combinada melhorou os efeitos de qualquer um dos agentes isoladamente e foi eficaz no tratamento de cepas de *S. aureus* contemporâneas suscetíveis à meticilina, resistentes à meticilina e resistentes à mupirocina de alto nível.

2.6 OTOSPORIN®

Brain, *et al*, em 1976 realizaram um estudo comparativo duplo-cego de Otoseptil Ear Drops e Otosporin Ear Drops em otite externa em 58 pacientes revelou que ambos são igualmente eficazes em uma série com muitas poucas infecções fúngicas. Em vista da proporção normalmente alta de infecções, incluindo fungos, há vantagens óbvias em usar as gotas auriculares Otoseptil.

Lambert, *et al*, em 1981, estudaram 126 casos de otite externa entre a população de uma base das forças britânicas em Chipre durante uma temporada. Foram discutidas as causas da infecção, os agentes infecciosos envolvidos e o tratamento dos casos observados na prática geral. Os pacientes foram tratados com gotas para os ouvidos de antibiótico / esteróide ('Otosporin') ou

com gotas para os ouvidos de acetato de alumínio. Não encontraram nenhuma diferença significativa entre os dois.

Silva, *et al.*, em 2004, avaliaram o potencial irritante da própolis, Casearia sylvestris, Otosporin e solução salina (controle). Vinte e oito ratos Wistar machos foram selecionados, anestesiados e quatro locais experimentais foram desenhados em suas costas. Injeções de azul de Evans a 2% foram administradas por via intravenosa na veia caudal lateral e 0,1 ml das soluções testadas foram injetadas por via intradérmica nos locais experimentais. Os animais foram mortos 1/2, 1, 3 e 6 horas após a injeção das soluções. Cada pedaço de pele contendo a lesão foi imerso em formamida e incubado a 45 °C masculino por 72 h. Após a filtração, a densidade óptica foi medida em espectrofotômetro. Os dados foram analisados estatisticamente por um teste não paramétrico de 2 vias. Os maiores valores de corante extraído foram observados em 3 horas caracterizando um pico no processo inflamatório. A própolis foi a solução menos irritante. Os medicamentos naturais testados neste estudo podem ser uma alternativa valiosa para o tratamento endodôntico.

Miura., *et al.*, em 2010, avaliaram o efeito citotóxico do Hidróxido de Cálcio, Paramonoclorofenol Canforado, Otosporin® e Formocresol diluído em células-tronco da polpa de dente permanente humano (DPSC). As DPSC foram semeadas em placa de cultura na concentração de $1,5 \times 10^4$ células/poço. Foram feitas

diluições das drogas em 1:9, 1:27 e 1:81 e deixadas em contato com as células por 2 horas, sendo que o grupo controle foi mantido em DMEM completo. As células foram lavadas com solução salina duas vezes. Foram realizadas avaliações do metabolismo (MTT). Concluiu-se que o Hidróxido de Cálcio e o Otosporin foram as drogas menos tóxicas para as DPSC, enquanto que o Paramonofenol Canforado e o Formocresol foram letais em todas as concentrações.

Benetti, *et al.*, em 2018 Este estudo investigou a ação de um antiinflamatório tóxico, o Otosporin®, em dentes clareados de ratos com a hipótese nula de que o Otosporin® não é capaz de minimizar a inflamação pulpar que o gel clareador gera. Os molares do rato foram divididos em grupos: BLE: clareado (concentração de H₂O₂ 35% / aplicação única de 30 min); BLE-O: branqueado seguido por Otosporin® (10 min); e controle: gel placebo. No segundo dia após o clareamento dental, os ratos foram sacrificados e as mandíbulas processadas para hematoxilina-eosina e análise imunohistoquímica para fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) -6 e IL-17. O grupo BLE apresentou alta imunoposição de TNF- α do que os grupos BLE-O e controle ($p < 0,05$), com imunoposição moderada e leve, respectivamente. Em relação à IL-6 e IL-17, o grupo BLE apresentou maior imunoposição que o controle ($p < 0,05$); o BLE-O foi semelhante ao controle ($p > 0,05$). O antiinflamatório

tópico Otosporin® pode reduzir a inflamação pulpar após o clareamento dental em dentes de rato. O grupo BLE apresentou alta imunexpressão de TNF- α do que os grupos BLE-O e controle ($p < 0,05$), com imunexpressão moderada e leve, respectivamente. Em relação à IL-6 e IL-17, o grupo BLE apresentou maior imunexpressão que o controle ($p < 0,05$); o BLE-O foi semelhante ao controle ($p > 0,05$). O antiinflamatório tópico Otosporin® pode reduzir a inflamação pulpar após o clareamento dental em dentes de rato.

Farias., *et al.*, em 2016, avaliaram a citotoxicidade de medicações intracanaís em células L929 de fibroblastos em diferentes períodos de observação. Os seguintes grupos experimentais foram estudados hidróxido de cálcio com paramonoclorofenol canforado e glicerina (CPG); iodofórmio com glicerina (IG); hidróxido de cálcio com iodofórmio e água destilada (CIW); iodofórmio com água destilada (IW); hidróxido de cálcio com água destilada (CW); Otosporin® (OT); e um grupo controle composto por células e meio de cultura. Os eluatos foram preparados a partir de cada grupo e colocados em contato com 1×10^5 células/poço, por períodos de 30 minutos, 12, 24, 48 e 72 horas, 5 e 7 dias. Depois de cada período experimental, um teste de citotoxicidade foi realizado utilizando metiltetrazólio (MTT) e um espectrofotômetro a uma densidade óptica de 570 nm para analisar a viabilidade celular. A análise de variância e o teste de Tukey com

nível de significância de 5% foi utilizado para analisar os dados. Em 30 minutos e em 12 horas, todos os grupos foram iguais ao grupo controle. Em 24 horas, houve uma maior citotoxicidade no grupo IG do que no grupo controle ($P < 0,001$). Em 48 horas, apenas o grupo OT foi citotóxico ($P < 0,001$). Em 72 horas e em 5 dias, os grupos mais citotóxicos foram CW e OT. Aos 7 dias, os grupos IW e CPG foram os menos citotóxicos ($P < 0,001$). Com relação ao tempo experimental, foram observadas diferenças significativas entre 24 horas e 7 dias em todos os grupos. Otosporin® foi o medicamento mais citotóxico, seguido de hidróxido de cálcio com água destilada.

Gallinari, *et al*, em 2019, avaliaram a expressão de neuropeptídeos após o tratamento clareador por meio de análises histopatológicas e imunohistoquímicas e os efeitos da hidrocortisona e paracetamol na inflamação pulpar, clareamento seno e inflamação dentária primeiro ocorrem, e só então, o tratamento. Sessenta e três ratos foram divididos em três grupos ($n = 21$) de acordo com a terapia de alívio da dor utilizada: I- controle; II- aplicação tópica de Otosporin por 10 min após o tratamento clareador; Administração III-oral de paracetamol 30 min antes do clareamento e a seguir a cada 12h. Em todos os grupos de estudo, o gel de placebo foi aplicado na mandíbula superior esquerda (controle) e um gel de clareamento à base de H_2O_2 a 35% foi aplicado na mandíbula superior direita por 45 min. Sete animais

de cada grupo foram sacrificados em diferentes momentos: 0h após o tratamento, 24h e 48h. Após a eutanásia, o primeiro molar de cada lado foi analisado por histologia e imunohistoquímica para avaliar o grau de inflamação e verificar a presença dos neuropeptídeos, substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Os dados foram analisados usando o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações individuais. Extensas áreas de necrose foram observadas nos grupos que receberam apenas tratamento clareador, enquanto danos reduzidos foram obtidos no grupo tratado com Otosporin. A análise imunohistoquímica mostrou imunomarcagem positiva em todos os grupos, inclusive no controle, mas foi mais forte nos grupos que receberam tratamento clareador. Os melhores resultados foram obtidos no grupo que recebeu tratamento com Otosporin.

2.7 SULFATO DE BÁRIO

Para que as pastas obturadoras a base de hidróxido de cálcio apresentem radiopacidade e possam ser visualizadas em radiografias, é necessário a implementação de materiais radiopacos a pasta para fornecer tal propriedade, promovendo a sua visualização no interior dos canais radiculares. Costa *et al.*, (2014), relata que o radiopacificador não deve interferir nas propriedades

da pasta, como liberação de íons de cálcio e pH, características necessárias relacionadas ao processo de mineralização e ação antimicrobiana. Um destes agentes radiopacificadores é o sulfato de bário, este é um sólido cristalino branco com a fórmula química BaSO₄. É pouco solúvel em água (apenas 0.02g deste pode ser dissolvido em 100ml de água) e outros solventes tradicionais, mas é solúvel em ácido sulfúrico concentrado. É muito comum em minérios de bário. A suspensão de sulfato de bário é utilizada por exemplo, como agente de contraste durante procedimentos de raio-x (ALAÇAM *et al.*, 1990).

Sulfato de bário é um dos radiopacificadores da guta percha que vem sendo utilizada como material obturador de canais radiculares desde 1847. Alguns estudos mostram que os cones de guta percha apresentam uma composição de 15 a 20% de guta percha, 60 a 75% de óxido de zinco, 1,5 a 17% de sulfato de bário e outras substâncias, como resinas, ceras e corantes que correspondem 1 a 4%. (DA CONCEIÇÃO *et al.*, 2012).

O sulfato de bário (BaSO₄) é o agente mais utilizado para conferir radiopacidade a algumas pastas contendo hidróxido de cálcio que já são comercializadas atualmente, como a pasta Ultracal XS® e Hydropast®. (LOUREIRO *et al.*, 2018).

Pascon *et al.*, em 1990, avaliaram a guta-percha (GP) que tem sido o material obturador de canal radicular mais amplamente

utilizado devido à sua reconhecida baixa toxicidade. A inércia do GP, no entanto, foi desafiada recentemente. O objetivo desse estudo foi avaliar a toxicidade do GP endodôntico comercializado por meio do teste de liberação de radiocômio. Foram testadas quatorze marcas comercialmente disponíveis e três marcas experimentais GP. GP bruto, óxido de zinco e sulfato de bário, que foram considerados os principais componentes dos pontos GP, e íons de zinco também foram avaliados. O material foi espalhado para cobrir o fundo dos poços de teste após ser dissolvido em clorofórmio ou aquecido. Uma suspensão marcada de células L929 foi adicionada aos poços. Após incubação a 37 ° C por 4 e 24 h, o radiocromio extracelular no meio de cultura foi medido e calculado em porcentagem do marcador intracelular total. A liberação espontânea de radiocromio foi usada como controle e os resultados foram considerados dentro dos limites normais em 4 ou 24 horas. Todo o GP dissolvido em clorofórmio mostrou baixa toxicidade em 4 h, enquanto o GP aquecido mostrou diferenças estatisticamente significativas em 4 h. Tanto o GP dissolvido como o aquecido eram tóxicos às 24 horas. As matérias-primas e o sulfato de bário não foram tóxicos, enquanto o óxido de zinco e os íons de zinco apresentaram toxicidade acentuada. Todos os pontos GP testados foram tóxicos em períodos de observação mais longos, e a toxicidade foi atribuída ao vazamento de íons de zinco nos fluidos.

Makita, *et al*, em 2008, avaliaram o pó de sulfato de bário adicionado a um cimento ósseo de PMMA com uma concentração inicial de 10% de bário. As mudanças na radiopacidade e resistência foram avaliadas testando blocos de cimento contendo quatro concentrações de bário (10%, 20%, 30%, 40%). A radiopacidade foi avaliada por meio da medição dos valores da tomografia computadorizada (TC). Os valores de CT aumentaram em proporção à concentração de bário. A radiopacidade é aumentada e a resistência reduzida pela adição de concentrações crescentes de pó de bário ao cimento ósseo. Os resultados do presente estudo sugerem que a adição de bário permite que a radiopacidade e a resistência do cimento ósseo sejam ajustadas na prática clínica.

Bortoluzzi, *et al*, em 2009, avaliaram a radiopacidade do cimento Portland branco (PC) associado ao óxido de bismuto (Bi (2) O (3)), sulfato de bário (BaSO (4)), iodofórmio (CHI (3)) e óxido de zircônio (ZrO (2)). Agregado de trióxido mineral branco (WMTA) e PC sem radiopacificador foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. Seguindo a Organização Internacional de Padronização (ISO) 6876/2001, 5 amostras circulares (10 x 1 mm) foram feitas de cada material. Após a fixação dos materiais, as radiografias foram realizadas com filme oclusal e uma cunha graduada de alumínio com espessura variando de 2 a 16 mm. A unidade de raios-X odontológica (GE1000) foi

ajustada em 50 Kvp, 10 mA, 18 pulsos / s e distância de 33,5 cm. As radiografias foram digitalizadas e a radiopacidade comparada com a cunha de alumínio, por meio do software Wixwin-2000 (Gendex). As amostras PC + Bi (2) O (3) e WMTA apresentaram maior radiopacidade (5,88 e 5,72 mm Al, respectivamente), seguidas de PC + ZrO (2) (3,87 mm Al) e PC + CHI (3) (3,50 mm Al). As amostras PC + BaSO (4) e PC apresentaram os menores valores de radiopacidade (2,35 e 1,69 mm Al, respectivamente), que ficaram abaixo do valor mínimo recomendado pela ISO. A análise dos presentes resultados permitiu concluir que todos os materiais testados apresentaram radiopacidade aceitável, exceto PC + BaSO (4) e PC puro.

Collares, *et al*, em 2010, avaliaram a radiopacidade, com adição de várias substâncias radiopacas. Dióxido de titânio, quartzo, zircônia, óxido de bismuto, sulfato de bário e trifluoreto de itérbio foram adicionados ao cimento experimental em cinco concentrações diferentes. A radiopacidade foi avaliada com um sistema de placa de fósforo, e a radiodensidade dos espécimes foi comparada com uma cunha de alumínio. A radiopacidade dos cimentos dentais experimentais com sulfato de bário e óxido de bismuto a 40% e fluoreto de itérbio a 30% e 40% não apresentou diferenças significativas em comparação com 3 mm de Al (181, 96).

Orucogluo., *et al.*, em 2008, avaliaram que o hidróxido de cálcio [Ca (OH) 2] tem sido amplamente utilizado como curativo antibacteriano intracanal de curto ou longo prazo material após tratamento endodôntico. Em geral quando usado em endodontia, a pasta de Ca (OH) 2 é composta por pó, um veículo e um radiopacificador. Para fornecer radiopacidade, o pó de sulfato de bário (BaSO4) é geralmente adicionado à pasta. Neste relato de caso, BaSO4: Ca (OH) 2 pós (proporção 1: 8) e água destilada foram misturados e aplicado como material de curativo após canais radiculares de dentes caninos e pré-molares inferiores com dentes periapicais lesões. No entanto, a pasta preparada foi extrudada involuntariamente para a lesão periapical durante a aplicação. O paciente foi atendido 12 e 36 meses depois, em qual ponto a cicatrização periapical foi avaliada. Neste tempo, observou-se que a lesão periapical apresentava desapareceu, mas manchas radiopacas brancas foram vistas em o local onde os restos de hidróxido de cálcio estavam originalmente presentes. O relato de caso apresentado revela que quando a pasta de Ca (OH) 2 que incluía BaSO4 era aplicado como um curativo intracanal e extrudado através de a lesão periapical associada a dentes despulpados, não teve nenhum efeito prejudicial. No entanto, a cura pode demorar mais quando a pasta de Ca (OH) 2 incluindo BaSO4 é usada, então super extensão deliberada não é defendida.

Minotti., *et al.*, em 2010, avaliaram que o hidróxido de cálcio é a medicação intracanal mais consagrada atualmente, por ser biocompatível, exercer ação anti-inflamatória e antimicrobiana e estimular processo de mineralização. Essas propriedades derivam de sua dissociação em íons cálcio e hidroxila. Entretanto, o hidróxido de cálcio não possui radiopacidade que permita sua distinção entre as estruturas anatômicas adjacentes, sendo necessário associá-lo a uma substância radiopaca. Esse estudo avaliou o pH e a liberação de cálcio de pastas de hidróxido de cálcio associadas com diferentes radiopacificadores. Quarenta dentes de acrílico com canais radiculares simulados foram divididos em 4 grupos, de acordo com a substância associada, G1: iodofórmio, G2: óxido de zinco, G3: sulfato de bário, G4: pasta de hidróxido de cálcio sem radiopacificador. Após o preenchimento, os acessos foram selados e os dentes imersos em água Mili-Q. Após 3, 24, 72 horas, 7, 15 e 30 dias, os dentes foram removidos e o líquido analisado empregando espectrofotômetro de absorção atômica para o cálcio e pHmetro. A análise do pH revelou diferenças significantes ($P < 0.05$) entre os grupos apenas nos períodos de 3 h e 7 d. Todas as pastas apresentaram pH alcalino e liberação de íons cálcio. Os radiopacificadores não interferiram negativamente na liberação iônica.

Aninwene, *et al*, em 2013, avaliaram que o sulfato de bário ($BaSO_4$, na forma de partículas de micron) é um agente

radiopacificante comum adicionado a cateteres e tubos endotraqueais. Devido à capacidade recentemente observada das características da superfície nanoestruturada de diminuir as funções das bactérias sem o auxílio de antibióticos, o estudo in vitro incorporou sulfato de nano-bário ao peletano e determinou as propriedades antimicrobianas dos compósitos resultantes. Os resultados demonstraram pela primeira vez que a incorporação de sulfato de nano-bário ao peletano aumentou as propriedades antimicrobianas (usando *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) em comparação ao peletano usado atualmente; propriedades que justificam investigação adicional para uma ampla gama de aplicações clínicas.

Zapata, *et al*, em 2015 avaliaram a atividade antimicrobiana, o nível de pH, a liberação de íons cálcio e a radiopacidade de pastas de hidróxido de cálcio associadas a três radiopacificantes (iodofórmio, óxido de zinco e sulfato de bário). Para o teste antimicrobiano, 25 espécimes de dentina foram infectados por via intraoral para induzir a colonização do biofilme e tratados com as pastas por 7 dias. A técnica Live / Dead e um microscópio confocal foram usados para obter a proporção de células vivas. O hidróxido de cálcio misturado com 17% de iodofórmio e 35% de propilenoglicol em uma pasta apresentou o maior pH, liberação de íons de cálcio, radiopacidade e a maior ação antimicrobiana em comparação com amostras semelhantes

misturadas com BaSO₄ ou ZnO. Não foram encontradas diferenças entre as pastas no teste de liberação de cálcio no 7º dia. As amostras de hidróxido de cálcio/iodofórmio tiveram a maior radiopacidade e atividade antimicrobiana contra a dentina infectada por biofilme em comparação com as outras pastas.

3. PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo:

- Formular uma nova pasta obturadora para canais radiculares de dentes decíduos.

- Avaliar a estabilidade das Pastas experimentais por meio de determinação colorimétrica de pH.

- Avaliar a estabilidade das Pastas Experimentais através do teste de espalhabilidade.

- Avaliar a radiopacidade de acordo com as especificações ISO 6876/2001.

- Avaliar a citotoxicidade das Pastas Experimentais por meio de ensaio MTT.

- Avaliar a ação antimicrobiana das pastas experimentais através de halo inibitório.

- Avaliar a ação antimicrobiana das pastas experimentais por meio da contagem de UFC em um modelo de canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo (Anexo 1).

4.1 Formulação pasta obturadora experimental

4.1.1 PREPARO DAS FORMULAÇÕES

Para preparo das formulações foram utilizados os seguintes componentes Hidróxido de Cálcio (Ca(OH)_2), Digluconato de Clorexedina (CHX), Cloranfenicol, Sulfato de Neomicina, Otosporin, Sulfato de Bário (BaSO_4), Imidazolinidil ureia (Imidazo), Veículo Óleo de silicone, espessante Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e ácido clorídrico (HCl).

Os componentes da formulação foram adquiridos comercialmente de acordo com tabela 1:

Tabela 1: Materiais utilizados no preparo das formulações

MATERIAL	FINALIDADE	FORNECEDOR	ESTADO FÍSICO
Ca(OH) ₂ 30% (p/p)	BASE	Farmácia Natupharma – Passo Fundo, RS	PÓ
CHX 20% 2% (v/p)	ANTIMICROBIANO	Farmácia Natupharma – Passo Fundo, RS	LÍQUIDO
CLORANFENICOL 2-4% (p/p)	ANTIBIÓTICO 1	Farmácia Natupharma – Passo Fundo, RS	PÓ
SULFATO NEOMICINA 2-4% (p/p)	ANTIBIÓTICO 2	Farmácia Flora Ativa – Passo Fundo, RS	PÓ
Otosporin® 2-4% (v/p)	ANTIBIÓTICO 3	Farmoquímica S/A	LÍQUIDO
BaSO ₄ 20% (p/p)	RADIOPACIFICADOR	Neon Comercial Ltda	PÓ
IMIDAZOLINIDIL UREIA* - 0,6% (v/p)	CONSERVANTE	Farmácia Natupharma – Passo Fundo, RS	PÓ
ÓLEO DE SILICONE q.s.p 100 g	VEÍCULO	Farmácia Natupharma – Passo Fundo, RS	LÍQUIDO
HIDROXIPROPOFIL MEYICELULOSE (HPMC)	ESPESSANTE	METHOCEL K15M – COLORCON	PÓ
HCl**	REGULADOR DE pH	Química Moderna	LÍQUIDO

*Para o preparo da solução, 5 gramas do conservante imidazolinidil ureia foram diluídas em 10ml de água destilada em Becker de vidro; **O ácido clorídrico foi adicionado separadamente ao hidróxido de cálcio em uma capela de exaustão, após misturado, foi incorporado a formulação.

Na primeira tentativa foram utilizados os componentes Hidróxido de Cálcio (Ca(OH)₂), Digluconato de Clorexedina (CHX 2%), Cloranfenicol, Sulfato de Bário (BaSO₄), conservante Imidazolinidil Ureia, e veículo Óleo de Silicone. A quantidade de

cada componente utilizado nas formulações testadas foi calculada conforme segue Tabela 2:

Tabela 2: Componentes utilizados para formular 50g das pastas F1, F2, F3, F4 e F5

COMPONENTES	F1	F2	F3	F4	F5
Ca (OH) ₂	15g	15g	15g	15g	15g
CHX 2%	5mL	5mL	10mL	10mL	15mL
Cloranfenicol	--	2g	1g	2g	--
BaSO ₄	15g	15g	5g	15g	15g
Conservante- IMIDA a 50% *	0,6mL	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL	0,6mL
Veículo- óleo de silicone	1,9mL	9,9mL	5,9mL	15,9mL	11,9mL
TOTAL	50g	50g	50g	50g	50g

* Para o preparo da solução, 5 gramas do conservante imidazolinidil ureia foram diluídas em 10ml de água destilada em Becker de vidro;

Para melhorar propriedades das pastas experimentais, houve necessidade de ajustes dos componentes das formulações testadas conforme seguem tabelas 3 e 4:

Tabela 3: Componentes ajustados para formular 50g das pastas experimentais F1, F2 e F3:

COMPONENTES	F1	F2	F3
Ca(OH)₂	12,5g	12,5g	12,5g
CHX 2%	5mL	5mL	5mL
Cloranfenicol	--	1g	2g
BaSO₄	7,5g	7,5g	7,5g
Conservante- IMIDA a 50% *	0,6mL	0,6mL	0,6mL
Veículo óleo de silicone	24,4mL	23,4mL	22,4mL
TOTAL	50g	50g	50g

* Para o preparo da solução, 5 gramas do conservante imidazolinidil ureia foram diluídas em 10mL de água destilada em Becker de vidro;

Tabela 4: Componentes ajustados para formular 50g das pastas experimentais F2 e F3:

COMPONENTES	F2	F3
Ca(OH) ₂	7,2 g + HCl 12,5 ml**	7,2g + HCl 15 ml**
CHX 2%	4mL	4mL
Cloranfenicol	0,8g	1,6g
BaSO ₄	10g	10g
Conservante- IMIDA a 50% *	0,48 mL	0,48 mL
HPMC	0,5g	-----
TOTAL	50g	50g

*Preparo da solução - diluir 5g de imidazolinidil ureia em 10 mL de água destilada.

**O ácido clorídrico foi adicionado separadamente ao hidróxido de cálcio em uma capela de exaustão, após misturado, foi incorporado a formulação

Após tentativas de ajustes das formulações, o componente antibiótico cloranfenicol foi excluído e para novos testes foram adicionados novos componentes antibióticos Sulfato de Neomicina e Otosporin® nas proporções que seguem na Tabela 5:

Tabela 5: Componentes utilizados para formular 100g da pasta experimental F1, 50g da pasta experimental F4, e 30g das pastas experimentais F5 e F6:

COMPONENTES	F1	F4(pH12)	F5(pH7)	F6
Ca(OH)₂	25g	12,5g	7,5g	7,5g
CHX 2%	10mL	5mL	3mL	3mL
BaSO₄	15g	7,5g	4,5g	4,5g
Sulfato de Neomicina	--	0,25g	0,15g	--
Otosporin ®	--	--	--	5ml
Conservante IMIDA 50%*	1,2mL	0,6mL	0,36mL	0,36mL
Veículo – óleo de silicone	48,8mL	24,15mL	--	14mL
HPMC	--	--	0,5 g	--
HCl 17% **	--	--	14mL	--
PESO TOTAL (gramas)	100g	50g	30g	30g

*Preparo da solução - diluir 5g de imidazolinidil ureia em 10 mL de água destilada.

**O ácido clorídrico foi adicionado separadamente ao hidróxido de cálcio em uma capela de exaustão, após misturado, foi incorporado a formulação

4.1.2 MÉTODO DE MANIPULAÇÃO DAS PASTAS EXPERIMENTAIS

4.1.2.1 Separação/ pesagem dos componentes sólidos

Os componentes sólidos foram separados em becker de vidro, peneirados e pesados em balança analítica digital de alta precisão OHAUS Adventurer. Foram pesadas em gramas as quantidades necessárias para cada formulação proposta (Figura 1);



Figura 1: Balança Analítica OHAUS.

4.1.2.2 Separação/ medidas componentes -líquidos-

Os componentes líquidos, foram medidos em provetas graduadas de vidro - em mililitros (mL) - de acordo com a quantidade necessária para cada formulação (Figura 2).

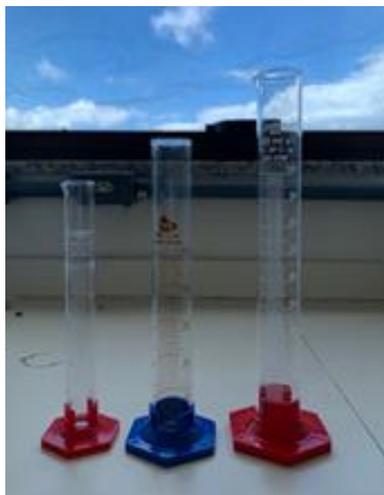


Figura 2: Provetas graduadas de vidro

Após separação, os componentes foram distribuídos na bancada conforme a quantidade necessária para formulação de cada pasta experimental (Figura 3).



Figura 3: Componentes proporcionados (pó e líquido) para cada formulação de pasta

4.1.2.4 Preparo $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{HCl}$

Nas formulações onde houve ajuste do pH com ácido clorídrico (HCl), o componente hidróxido de cálcio foi preparado separadamente em capela de exaustão, onde o ácido clorídrico 17% (HCl 17%) foi sendo incorporado aos poucos, em gotas, com auxílio de uma pipeta Pasteur descartável até que o pH do hidróxido de cálcio ficasse próximo a 7-8, para verificação do pH o método de calorimetria foi utilizado, onde papeis indicadores, que mudam de coloração conforme o pH - básico, neutro e ácido (0-14) foram utilizados e a aferição foi realizada a cada etapa de gotejamento do HCl no $(\text{CaOH})_2$ (Figura 5).



Figura 4: $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{HCl}$ manipulados em capela de exaustão

4.1.3 MISTURA DOS COMPONENTES

A mistura para cada formulação das pastas experimentais foi feita utilizando gral e bastão de porcelana:

4.1.3.1 – Homogeneização inicial - diluição geométrica

Foi realizada diluição geométrica a qual objetiva um alto grau de homogeneidade dos componentes, onde metade da quantidade de hidróxido de cálcio, seguido dos demais componentes na forma sólida foram dispensados em um gral de

porcelana, na sequência os líquidos foram adicionados aos poucos (Figura 5).



Figura 5: mistura e adição dos componentes em gral de porcelana

4.1.3.2- Incorporação dos demais componentes

O restante dos componentes sólidos, juntamente com o remanescente de $(\text{CaOH})_2$, foram adicionados e no final o veículo óleo de silicone foi incorporado a formulação e misturado utilizando bastão de porcelana/ vidro (Figura 6).



Figura 6: Homogeneização Inicial

4.1.3.3- Homogeneização final

Para finalizar, a formulação foi obtida por meio de intensa manipulação para homogeneização dos componentes utilizando bastões de porcelana no gral, e posteriormente a formulação foi transferida para uma superfície de mármore e espatulada com espátulas plásticas para homogeneização (Figura 7).



Figura 7: Homogeneização final

4.1.4 ARMAZENAMENTO DAS PASTAS EXPERIMENTAIS

As formulações após manipuladas, foram armazenadas em frascos de polietileno de parede dupla herméticos. Os recipientes foram armazenados em armário no prédio da Faculdade de Farmácia – Universidade de Passo Fundo sala 208, em condições ambientes sem exposição a luz, em temperaturas de 20-25 °C. (Figura 8).



Figura 8: Frascos de polietileno de parede dupla herméticos

4.2 Teste de PH

A avaliação do pH das Pastas Experimentais ao longo de períodos determinados, também foi parâmetro neste estudo para avaliar a estabilidade física das formulações. Variações significativas de pH podem demonstrar incompatibilidade física dos componentes utilizados.

Para a obtenção dos valores do pH de cada pasta utilizada, usamos a determinação colorimétrica do pH. Segundo a

Farmacopeia Brasileira (2019), esta técnica está baseada no uso de papéis indicadores, que mudam de coloração conforme o pH, sendo que, estas variam do pH básico, neutro e ácido (0-14), demonstrando apenas uma faixa de valores, mais ou menos larga, conforme o indicador empregado. A determinação é levada a efeito adicionando-se gotas da solução indicadora à solução em exame ou umedecendo-se papéis indicadores com a solução em exame e observando-se a mudança de coloração.

4.2.1. PREPARO DO MATERIAL PARA O TESTE

A pesagem dos tubos de ensaio foi realizada em balança analítica OHAUS Adventurer (Figura 9). Após a pesagem inicial, foi realizado a adição de 1mL de água destilada em cada um dos tubos, assim sucessivamente no tubo de ensaio identificado de cada pasta obturadora.

Após a pesagem da água destilada de cada tubo de ensaio, foi realizada a pesagem de 0.05g das pastas experimentais e comerciais no mesmo tubo de ensaio que continha a água destilada previamente pesada (Figura 9 C).

Foi realizada a mistura de ambas até que se tornassem homogêneas. Com o auxílio de fitas de determinação colorimétrica

do pH, obtivemos o resultado do valor do pH de cada uma das pastas utilizadas neste experimento (Figura 9 D).

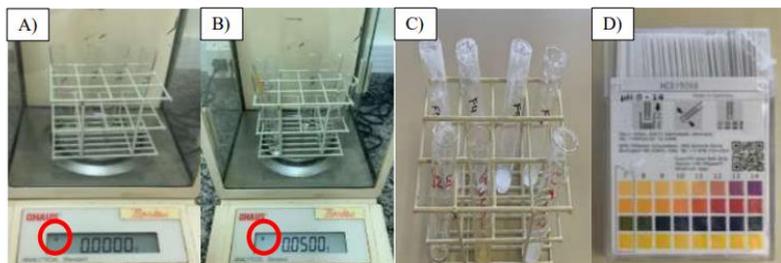


Figura 9: Medida pH formulações

4.2.2. Avaliação do pH das Pastas Testadas

A avaliação do pH das pastas experimentais foi realizada no dia 0 da formulação, após 11 dias e após 34 dias.

4.3 Teste de Espalhabilidade

4.3.1 DETERMINAÇÃO ESPALHABILIDADE

O teste de espalhabilidade é utilizado para avaliar alterações de consistência que estão relacionadas a estabilidade física das Pastas Experimentais, acompanhando a mudança neste parâmetro

sendo avaliado o valor de espalhabilidade inicial logo após a formulação, e 30 dias depois de armazenadas em frascos de polietileno de parede dupla herméticos. Os recipientes foram armazenados em armário no prédio da Faculdade de Farmácia – Universidade de Passo Fundo sala 208, em condições ambientes sem exposição a luz, em temperaturas de 20-25 °C. Mudança nos padrões de espalhabilidade pode significar instabilidade das formulações.

Também foi possível avaliar a capacidade das formulações se espalharem quando submetidas a uma força, em um determinado espaço de tempo, procurando reproduzir as condições necessárias de esforço ao ser utilizada (ALMEIDA, et al., 2020). A determinação da espalhabilidade foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Knorst (1991). No equipamento utilizado, uma placa-molde circular de vidro (diâmetro = 20 cm; espessura = 0,2 cm), com orifício central de 1,2 cm de diâmetro, foi colocada sobre uma placa-suporte de vidro (20 cm x 20 cm) posicionada sobre uma escala milimetrada e uma fonte luminosa (Figura 10-A).

A amostra foi introduzida no orifício da placa-molde e a superfície foi nivelada com espátula (Figura 10-B) A placa-molde foi cuidadosamente retirada e sobre a amostra foi colocada uma placa de vidro de peso conhecido (Figura 10-C). Após um minuto foi realizada a leitura dos diâmetros alcançados pela amostra, em

duas posições opostas, com auxílio da escala do papel milimetrado. Posteriormente foi calculado o diâmetro médio (Figura 10-D).

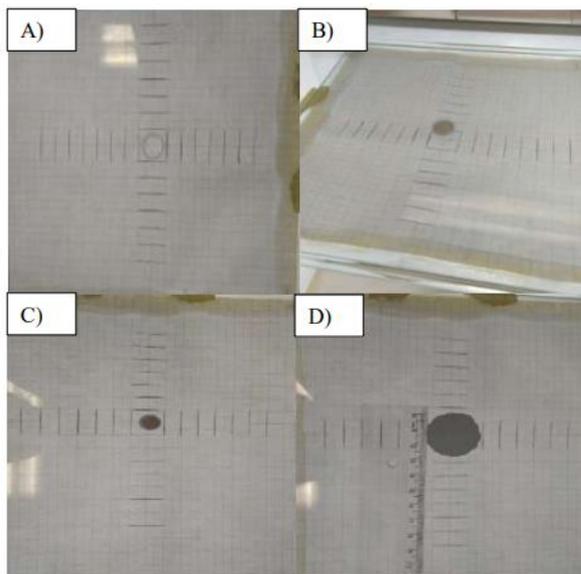


Figura 10: Placas para teste de espalhabilidade

Este procedimento foi repetido acrescentando-se sucessivamente outras placas, de 1000mg cada em intervalos de um minuto, totalizando 3 repetições de 5 placas. Os resultados foram expressos em espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado, de acordo com a equação abaixo, sendo que os mesmos correspondem à média de três determinações. Onde:

$$Ei = d^2 \cdot \pi / 4$$

Ei = espalhabilidade da amostra para um determinado peso i (mm²); d = diâmetro médio (mm).

4.3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado Teste t para amostras pareadas (p = 0.05).

4.4 Teste de radiopacidade

4.4.1 MATERIAIS TESTADOS

Para o teste de radiopacidade foram testados os seguintes materiais conforme segue tabela 6:

Tabela 6: Materiais utilizados teste de radiopacidade

Material Obturador
Pasta Calen® (SSWhite, São Paulo, Brasil) - controle
Pasta Experimental F1 (Ca(OH) ₂ , CHX 2% e BaSO ₄).
Pasta Experimental F5 (Ca(OH) ₂ , CHX 2%, BaSO ₄ e Sulfato de Neomicina).

4.4.2 PREPARO DO MATERIAL PARA O TESTE

Os materiais foram preparados conforme instruções do fabricante, as pastas obturadoras testadas foram acomodadas em um molde de policarbonato (10mm de diâmetro e 1mm de espessura), quando houver bolha produzida pelos materiais obturadores, este molde será substituído. Todos os espécimes foram radiografados e posicionados sobre uma placa intraoral S4 – Oclusal (5,7x7,6) Dürr Dental (sensor sem fio para o VistaScan) e expostos juntamente com uma escala de alumínio com espessura variada, de 2 a 16mm, com incrementos de 2mm.

4.4.3 TOMADA RADIOGRÁFICA

Para a tomada radiográfica, foi utilizada uma unidade de raio-X de 70 Kvp / 8mA tipo Seletronic® Parede – Dabi Atlante com 0,3 segundos de exposição distância focal de 30cm. As imagens radiográficas foram importadas para o software Viwbox Studio, através do scanner VistaScan Mini View. O valor da radiopacidade foi determinado em densidade radiográfica e convertida em milímetros de alumínio (mm Al) esta conversão foi realizada determinando-se a densidade radiográfica correspondente a cada milímetro de alumínio, de acordo com cada intervalo entre os milímetros, isto é, entre 1 e 2, 2 e 3, 3 e 4, etc.

4.4.4 OBTENÇÃO DOS VALORES DE RADIOPACIDADE DOS MATERIAIS

Para se obter o valor de cada material, foi observado em qual intervalo ele estava, ou seja, se o valor da sua densidade estava entre o intervalo 4 e 5, 5 e 6, etc. A cada intervalo o 1 mm corresponde a valores distintos;

- A cada intervalo - 1 mm corresponde a valores distintos; por exemplo, a diferença entre o 4 e 5 é $16,83(5) = 162,07 - (4) =$

145,24) e entre 5 e 6 é 14,39 (6) = 176,46- (5) = 162,07). Quando a densidade do material apresentar o valor entre 5 e 6, o cálculo foi realizado da seguinte forma:

- O valor da densidade do material foi subtraído o valor correspondente a 5mm de alumínio; essa diferença foi convertida em milímetros de alumínio utilizando-se para o cálculo a (Figura 11):

$A \times 2/B + \text{mmAl imediatamente abaixo RDM}$

A = densidade radiográfica do material (RDM) – densidade radiográfica do passo do alumínio imediatamente abaixo RDM;

B= densidade radiográfica do passo do alumínio imediatamente acima da RDM – densidade radiográfica do passo do alumínio imediatamente abaixo RDM;

2 = 2-mm incremento entre um passo e outro do alumínio.

Figura 11: fórmula proposta por Duarte et al., (2009).

- Em conformidade com a especificação da ISO 6876 (2001), a radiopacidade do material deverá ser igual ou superior a radiopacidade de 3 mm de alumínio.

4.4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise descritiva dos dados.

4.5 Avaliação da citotoxicidade

4.5.1 PREPARO DAS CULTURAS

Foram utilizadas células L929 (Figura 12), que são culturas contínuas de fibroblastos de gengiva, provenientes da American Type Culture Collection (ATCC), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Virologia da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC, Lajes, SC, Brasil). Para a manutenção das células foi escolhido o meio MEM (Minimum Essential Media – Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) em frascos de cultura de 75 cm² mantidos em atmosfera umidificada a 37° C e 5% de CO². Não foram utilizados antibióticos ou antifúngicos durante a manutenção da cultura celular e/ou experimentos.

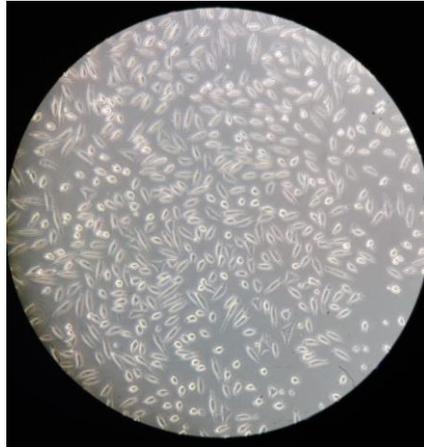


Figura 12: Células L929

4.5.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE – ENSAIO MTT

Para avaliação da citotoxicidade celular, foi realizado o ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium ou MTT (Sigma-Aldrich), que corresponde a um teste colorimétrico utilizado para avaliar a viabilidade celular. No dia anterior ao ensaio, as células L929 foram tripsinizadas, contadas e distribuídas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 células por poço (Figura 13). O meio para a realização dos experimentos foi o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium,

Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), enriquecido com 5% de soro fetal bovino.



Figura 13: Placas de 96 poços na concentração de 1×10^5

4.5.3 OBSERVAÇÃO DA CONFLUÊNCIA DO TAPETE CELULAR

Após a incubação, durante 24 horas a 37°C em estufa com 5% de CO_2 , foi realizada a observação da confluência do tapete celular através da visualização em microscópio invertido (Figura 14). A seguir, o meio DMEM foi retirado por aspiração e 100 μL das seguintes soluções foram adicionadas: para o ISO 10993, os controles devem ser inertes podendo ser utilizados os meios usados na extração. Além do meio de cultura controle negativo, foram testadas: a Pasta Guedes-Pinto, Pasta Óxido de Zinco e Eugenol, Pasta Calen® e as Pastas Experimentais F1 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, CHX2% e BaSO_4) e F5 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, CHX2%, BaSO_4 e Sulfato de Neomicina),

sendo incubadas no período de tempo de 1 hora, a soma concentração de 50 mg/mL.

As pastas comerciais Guedes Pinto e OZE foram manipuladas conforme orientações da literatura (Mello-Moura *et al.*, 2013) e as Pastas Experimentais foram manipuladas no momento do teste.



Figura 14: Visualização tapete celular em microscópio invertido

4.5.4 AVALIAÇÃO VIABILIDADE CELULAR

Após o tempo de incubação, os poços foram lavados com 200 μ l de PBS estéril a temperatura de 37°C, e foram adicionados

50 mL da solução de MTT (1 mg/mL em meio DMEM), para incubação pelo período de 4 horas. Posteriormente, o MTT foi cuidadosamente retirado evitando a danificação das células e foram adicionados 100 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazam. Também foi adicionado o DMSO em poços vazios para o cálculo do branco. A placa foi colocada em um agitador durante 10 minutos de incubação e a absorbância foi, então, mesurada em filtro de 490 nm.

Ressalta-se que todos os experimentos foram realizados em triplicata e as porcentagens de viabilidade celular foram calculadas em relação aos controles celulares, conforme fórmula abaixo:

% de viabilidade = (absorbância da amostra- média da absorbância do branco) x100

(absorbância do controle - média da absorbância do branco)

4.5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística realizou-se por meio do teste One Way ANOVA seguido de Post hoc de Tukey ($\alpha=0,05$).

4.6 Ação antimicrobiana – halo inibitório

4.6.1 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Na preparação do inóculo a cepa de *E.faecalis* (ATCC 19433) foi reativada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Disco, Kansas City, MO, USA) e incubada a 37°C durante 24 horas. Em seguida, foi transferida para um novo tubo contendo caldo BHI e incubado por mais 24 horas sob as mesmas condições. Após o ajuste de concentração de bactérias, o inóculo foi novamente incubado a 37°C por 7 horas, para atingir crescimento exponencial (Figura 15).

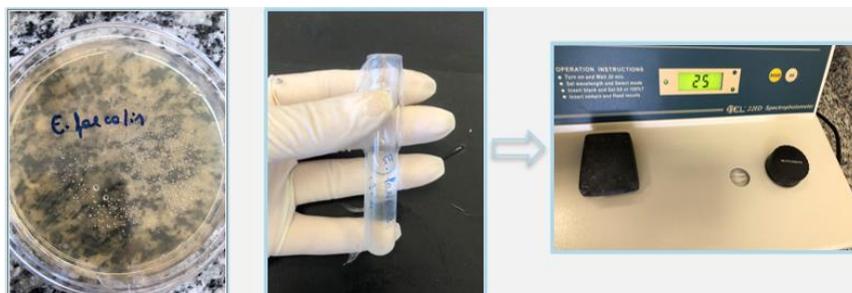


Figura 15: *E.faecalis*

4.6.2 SEMEADURA DAS PLACAS

Dezoito placas de Petri de 90 mm foram usadas para semeadura, sendo destinada 3 placas para cada grupo, capaz de

comportar 4 poços em cada placa, totalizando 12 poços por grupo (Figura 16).

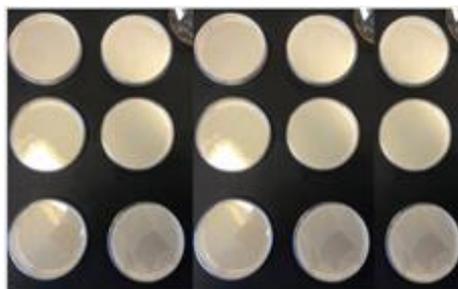


Figura 16: Placas de Petri

O meio de cultura das placas foi Agar Mueller Hinton, com aproximadamente 5 mm de espessura, que foi introduzido nas placas através de uma pipeta graduada na quantidade de 9,9 mL e reservado até atingir consistência sólida (Figura 17).



Figura 17: Agar Mueller Hinton

A semeadura foi realizada com a colocação do inóculo no Agar Mueller Hinton através de uma pipeta automática de volume fixo (100 μ L), com ponteiras estéreis, para cada placa, em quatro orientações diferentes e em torno da borda da placa com o auxílio de uma alça metálica estéril a fim de garantir que todo o meio fosse semeado (Figura 18).

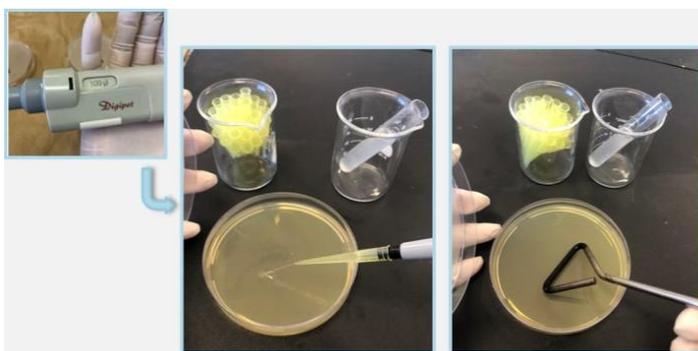


Figura 18: Semeadura das placas

Logo após a semeadura, houve um intervalo de 5 minutos para o meio secar à temperatura ambiente e absorver o inóculo antes de realizar o método de difusão em ágar por poço. Cada pasta testada foi pesada em balança analítica na proporção de 0,10 g de pasta e foi utilizado o método de microdiluição em caldo, com 9,9 mL de BHI, permanecendo em um tubo de Eppendorf estéril até o uso (Figura 19).



Figura 19: Microdiluição das pastas

Após 5 minutos, foram realizados 4 orifícios de 7 mm de diâmetro em cada placa contendo o meio de cultura com o auxílio de um molde metálico cilíndrico e estéril formando os poços e removendo-os com o auxílio de pinças clínicas para algodão estéril (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil) (Figura 20).

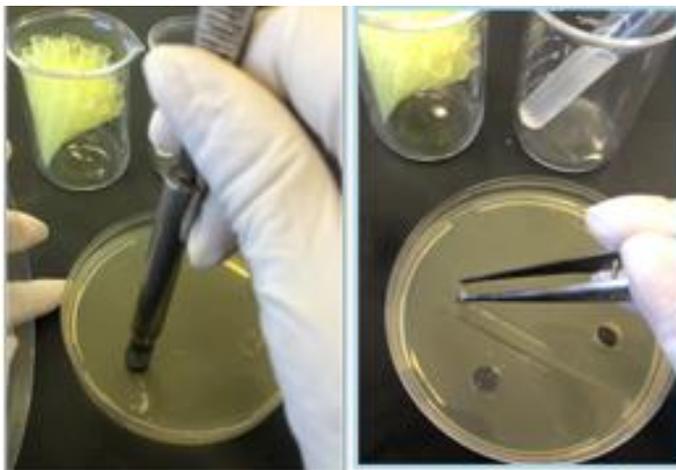


Figura 20: Preparo dos poços nas placas de Petri

Cada um dos 12 poços foi preenchido com 60 μL de cada substância a ser testada (Tabela 7) com uma pipeta automática de volume variável ajustada em 60 μL com ponteiras estéreis (Figura 21).

Tabela 7: Materiais Testados

Grupo	Pasta Obturadora
1	vaselina (controle negativo)
2	Pasta Guedes-Pinto (Farmácia Buenos Ayres, São Paulo-SP)
3	Pasta Óxido de Zinco e Eugenol (Biodinâmica)
4	Pasta Calen® (SSWhite, São Paulo, Brasil)
5	Pasta Experimental F1 (Ca(OH) ₂ , CHX 2% e BaSO ₄).
6	Pasta Experimental F5 (Ca(OH) ₂ , CHX 2%, BaSO ₄ e Sulfato de Neomicina).



Figura 21: Preenchimento dos poços

Quando a colocação das substâncias foi concluída, as placas foram fechadas e mantidas em incubadora bacteriológica aeróbica por 24 h a 37 °C de temperatura.

4.6.3 LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO

As placas permaneceram incubadas em sentido horizontal para não mover as substâncias dos poços. Após 24h, as placas foram removidas da incubadora e os halos de inibição das substâncias foram medidos, com o auxílio de uma régua milimetrada (Figura 22).

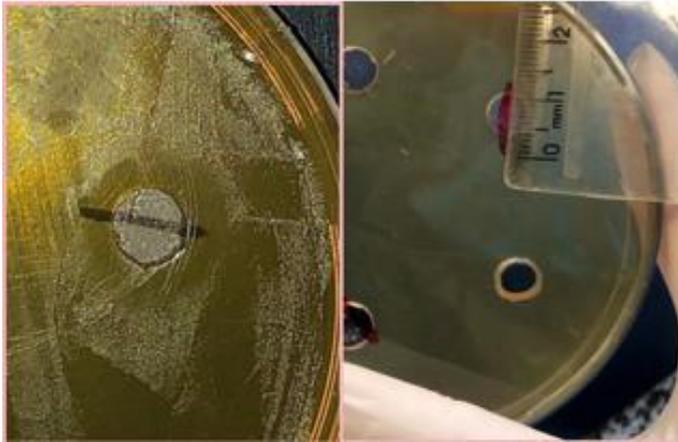


Figura 22: Leitura halos de inibição

Todas as placas foram lidas com a ajuda de uma fonte de luz. Os halos foram considerados a partir do ponto onde o crescimento bacteriano não foi visível a olho nu.

4.6.4 Análise Estatística

A análise estatística utilizada foi ANOVA seguida pelo teste complementar de Tukey, para estabelecer a média das medidas de halo inibitório de cada grupo, a 5% nível de significância. Para análise de resultados foi usado o software Stat Analista Plus Soft Inc. versão 6.0 (Vancouver, BC, Canadá).

4.7 Ação antimicrobiana – Contagem - UFCs

4.7.1 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS

Sessenta dentes humanos unirradiculares extraídos foram obtidos junto ao Biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo (ANEXO 2). A porção coronária foi seccionada na junção amelocementária (Figura 23), de forma que o remanescente radicular apresentasse um comprimento de 15 mm (Figura 24). Foi utilizado para o corte, um disco de diamante rotativo (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil), acoplado a uma peça reta de baixa rotação, sob constante refrigeração.

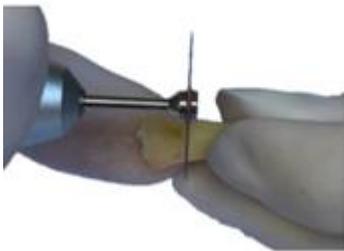


Figura 23: Secção na junção amelocementária

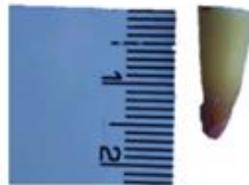


Figura 24: Padronização das raízes em 15mm

Todas as raízes foram preparadas utilizando o mesmo

protocolo, no intuito de remover o tecido pulpar e padronizar o diâmetro do canal. O comprimento de trabalho foi estabelecido a partir da introdução de uma lima tipo-K nº 10 no canal radicular, até que sua ponta fosse visualizada no forame apical. A partir desta medida foi reduzido 1mm, estabelecendo o comprimento de trabalho (Figura 25).

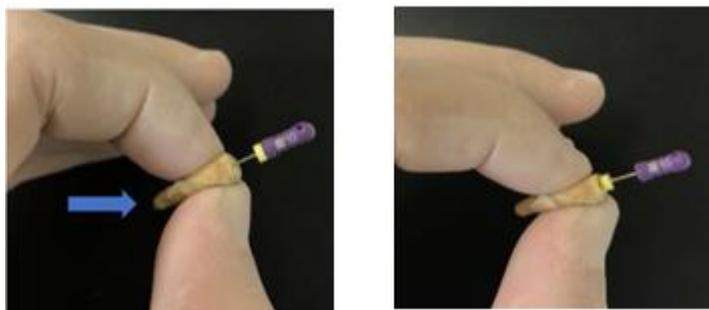


Figura 25: Comprimento de trabalho

O preparo cervical foi realizado com broca Largo nº 3 (Figura 21; *Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça*) e a ampliação apical foi realizada com o sistema convencional utilizando limas manuais de 21mm da 1ª série (Figura 26), seguindo a sequência de limas #15, #20, #25 e #30. Todos os instrumentos foram utilizados no comprimento de trabalho. A substância química auxiliar utilizada durante a instrumentação das raízes foi água destilada (Farmácia Natupharma, Passo Fundo-RS), que foi renovada a cada

troca de instrumento. Após a instrumentação, foi realizada uma lavagem final com 3mL de EDTA 17% (Iodontosul, Porto Alegre, RS, Brasil), para a remoção de *smear layer*.



Figura 26: Gates/ Limas 1ª série 21 mm

Após a conclusão da padronização do diâmetro dos canais radiculares, cada raiz foi colocada em um microtubo plástico (Axygen Inc, Union City, CA, EUA), de modo que a porção cervical ficasse posicionada para cima (Figura 27).



Figura 27: Raiz dentro do microtubo

As amostras foram alocadas em caixas de polipropileno; Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, Estados Unites) (Figura 28) e esterilizadas à temperatura de 120 °C em autoclave (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil), por um período de 30 minutos.

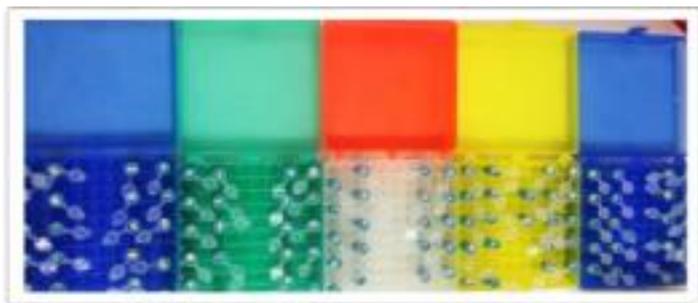


Figura 28: Disposição das amostras em caixa de polipropileno

4.7.2 PREPARO DO INÓCULO

A cepa de *E. faecalis* foi reativada em *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco, Kansas City, MO, EUA) e incubada em estufa a 37°C por 24 horas. Em seguida, transferido para um novo tubo contendo BHI caldo e incubado por mais 24 horas sob mesmas condições. A densidade do meio foi ajustada em espectrofotômetro, equivalente a 1.0 na escala de McFarland (3×10^8 UFC ml⁻¹). Após ajuste da concentração bacteriana, o inóculo foi novamente incubado em estufa a 37°C por 7 horas, a fim de atingir o crescimento exponencial. O protocolo de contaminação dos espécimes foi realizado em 10 dias.

No quarto dia, os procedimentos realizados foram idênticos ao segundo dia de contaminação. E assim subsequente intercalando as ações realizadas no segundo e terceiro dia até o nono dia. No décimo dia, os espécimes foram removidos dos tubos e foram submetidos à diferentes protocolos de descontaminação antimicrobiana através da inserção de medicações intracanáis.

4.7.3 CONTAMINAÇÃO DOS CANAIS RADICULARES

No primeiro dia, 800 µL de caldo BHI esterilizado foi adicionado em cada microtubo contendo os espécimes.

Posteriormente foi realizado um banho ultrassônico, durante 15 minutos, para permitir maior penetração do meio de cultura nos túbulos dentinários antes do processo de contaminação.

O caldo BHI foi removido após o banho ultrassônico e, 800 μL de inóculo (7 horas de incubação) foi adicionado aos tubos contendo as amostras (Figura 29). Após, os espécimes foram incubados, em aerobiose, a 37°C por 24 horas.



Figura 29: Contaminação dos canais radiculares

No segundo dia de contaminação, os tubos contendo os espécimes foram agitados por 10 segundos e o inóculo foi descartado. Foi adicionado 1mL de BHI caldo estéril (Figura 30) e novamente houve incubação, em aerobiose, a 37°C , por 24 horas.



Figura 30: Renovação caldo BHI

No terceiro dia, foi utilizado um novo inóculo de *E. faecalis* preparado 7 horas antes da utilização.

No quarto dia, os procedimentos realizados foram idênticos ao segundo dia de contaminação. E assim subsequente intercalando as ações realizadas no segundo e terceiro dia até o nono dia. No décimo dia, os espécimes foram removidos dos tubos e foram submetidos à diferentes protocolos de descontaminação antimicrobiana através da inserção de medicações intracaneais.

Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas em uma Câmara de Fluxo Laminar (Figura 31).



Figura 31: Camara de Fluxo Laminar

4.7.4 CLASSIFICAÇÃO DOS GRUPOS DE TRATAMENTO

Após o período de 10 dias de contaminação com *E. faecalis*, as 60 amostras foram irrigadas com 5 mL de soro fisiológico estéril e secas com cones de papel absorvente calibre #35 esterelizados; Tanari, Manaus, AM, Brasil) - (Figura 32).

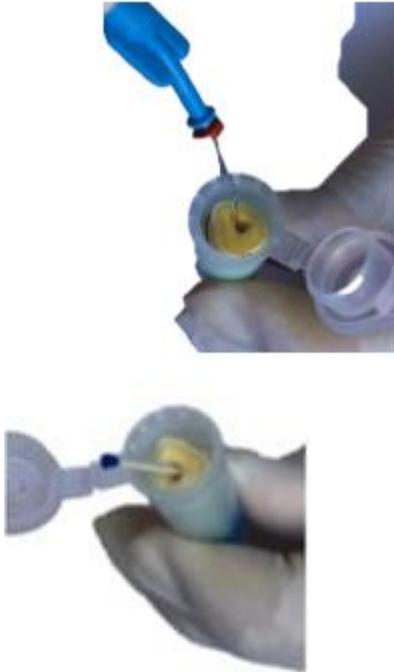


Figura 32: Amostras irrigadas com 5 mL de soro fisiológico estéril e secas com cone de papel esterilizado.

Em seguida, as amostras foram divididas em seis grupos (n=10) de acordo com a pasta obturadora testada conforme tabela 8; (Figuras 33,34,35 e 36).

Tabela 8: Distribuição dos grupos de acordo com a Pasta Obturadora testada

Grupo	Pasta Obturadora
1	Pasta Calen® (SS White)
2	Pasta Guedes Pinto (Manipulada Farmácia Buenos Ayres – São Paulo-SP)
3	Pasta Experimental F1 (Ca(OH) ₂ , CHX, BaSO ₄)
4	Pasta Experimental F5 (Ca(OH) ₂ , CHX, BaSO ₄ , Sulfato Neomicina)
5	Óxido de Zinco e Eugenol (Biodinâmica)
6	Controle – soro fisiológico

Todas as pastas comerciais foram manipuladas no momento do teste conforme orientações da literatura (Figuras 34 e 36), as Pastas Experimentais F1 e F5 foram manipuladas no

momento do teste (Figura 35), exceto a Pasta Calen® (Figura 33) que vem pronta para inserção no canal radicular. As Pastas foram inseridas no canal radicular com auxílio de seringa estéril e quando necessário, limas e lântulo. Após a realização dos tratamentos as amostras foram novamente incubadas a 37°C, por 24 horas.



Figura 33: Pasta Calen



Figura 34: Pasta Guedes Pinto



Figura 35: Pasta Experimental F1 e F5



Figura 36: Pasta OZE

4.7.5 Realização das coletas e análise microbiológica

A coleta do conteúdo microbiano do interior do canal radicular das amostras foi realizada em dois momentos. A primeira coleta (S1) foi realizada imediatamente após o período de

contaminação das amostras e antes dos protocolos de inserção do material obturador testado; e a segunda coleta (S2) foi realizada após 10 dias, imediatamente após a remoção dos protocolos de obturação testados. As coletas (S1 e S2) foram realizadas da mesma forma.

Para as coletas S1 e S2 uma ponta de papel absorvente estéril calibre #35 foi introduzida no interior do canal radicular, realizando movimentos circulares, no intuito de encostar intencionalmente em todas as paredes do canal, pelo período de 30 segundos. Depois disso, a ponta de papel absorvente foi transferida para um microtubo contendo 1 mL de solução salina estéril (Figura 37). Para coleta S2 o canal radicular foi previamente irrigado com 3mL de solução salina estéril para remoção das pastas testadas.

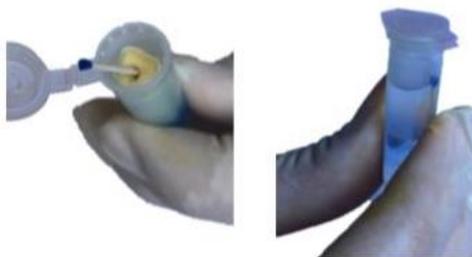


Figura 37: ponta de papel absorvente em contato com interior canal radicular e após, transferida para um microtub.

O material foi homogeneizado e diluído até 10^{-3} (Figura 38). Alíquotas foram semeadas em placas de Petri contendo PCA através da técnica das gotas e homogeneizadas na placa com auxílio de alça de Drigalski (Figura 39).

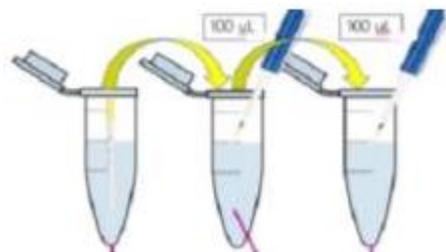


Figura 38: Material homogeneizado e diluído até 10^{-3}



Figura 39: Alíquotas semeadas em placas de Petri contendo PCA

As placas foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 37°C. Após o período de incubação, a contagem do número de UFCs foi realizada nas placas (Figura 40).

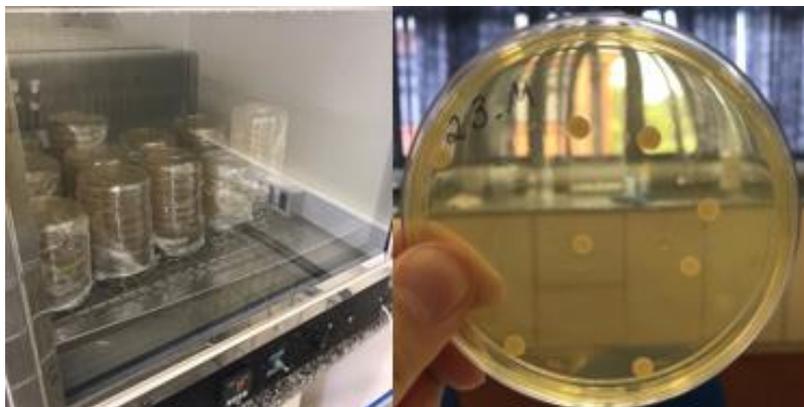


Figura 40: Placas em incubação; contagem do número de UFCs

4.7.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As unidades formadoras de colônias (UFC's) foram contabilizadas e tabuladas em planilha. Os dados foram analisados quanto a sua distribuição através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, levando em consideração a significância de 5%.

A análise estatística das reduções intragrupos e intergrupos forma conduzidas pelo teste de One-way ANOVA seguido pelo

procedimento de post hoc de Tukey para determinação das diferenças, considerando 5% de significância.

Os percentuais de redução foram calculados sobre a redução de *E. faecalis* a partir da contagem inicial e final de unidades formadoras de colônias nos diferentes grupos utilizando a seguinte fórmula:

Percentual de redução = 100 * [(valor final / valor inicial) * 100].

Os dados foram analisados utilizando o programa SPSS versão 17.0 (SPSS, Chicago, IL, Estados Unidos).

5. RESULTADOS

5.1 FORMULAÇÃO PASTA EXPERIMENTAL

As etapas do preparo (Figura 41) e o aspecto final das formulações iniciais após intensa manipulação (Figura 42).

As primeiras formulações das Pastas Experimentais foram inicialmente avaliadas visualmente, em busca de alterações que pudessem indicar instabilidade física. Elas diferem em si pela quantidade, presença/ausência de agente antibiótico

(Cloranfenicol) e quantidade de Clorexedina (CHX) nas formulações.



Figura 41: Preparo das Pastas



Figura 42: Aspecto inicial das Pastas Experimentais após manipulação

Foi levado em consideração os requisitos físicos desejados para uma pasta obturadora ideal a ser usada na endodontia de

dentes decíduos, bem como alterações visuais que indicassem incompatibilidade física como: consistência, formação de grumos, separação de fases, cor ou formação de precipitados:

Pasta Experimental F1 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, CHX, BaSO_4 . Óleo de silicone, IMIDA) cor branca, consistência compatível com pastas já comercializadas, pequena formação inicial de grumos que melhorou após intensa manipulação com espátula de silicone em mármore (Figura 43):

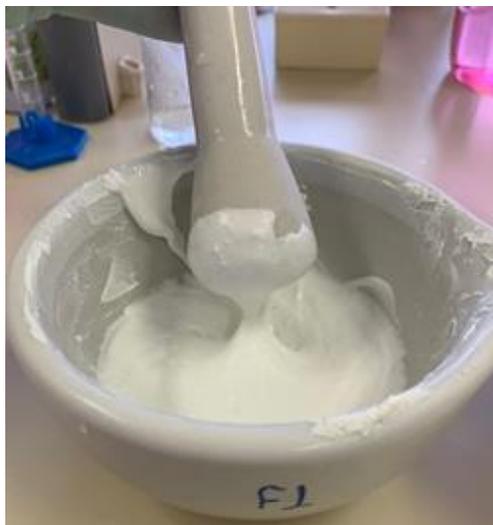


Figura 43: Pasta Experimental F1

Pasta Experimental F2 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, CHX, BaSO_4 , Cloranfenicol, Óleo de silicone, IMIDA): cor branca,

consistência firme com formação de grumos não eliminados após intensa manipulação (Figura 44):



Figura 44: Pasta Experimental F2

Pasta Experimental F3 – ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, CHX, BaSO_4 , Cloranfenicol, Óleo de silicone, IMIDA): cor branca/ amarelada, consistência firme com maior formação de grumos não eliminados após intensa manipulação (Figura 45):

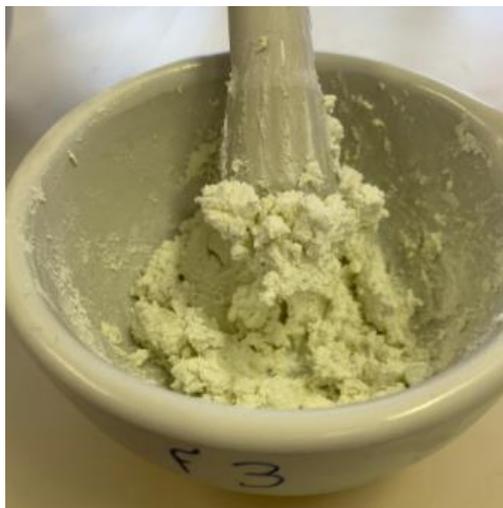


Figura 45: Pasta Experimental F3

Pasta Experimental F4 – (Ca(OH)_2 , CHX, BaSO_4 , Cloranfenicol, Óleo de silicone, IMIDA): cor branca/ amarelada, consiste firme, grande formação de grumos, incompatível com uma pasta obturadora ideal (Figura 46):

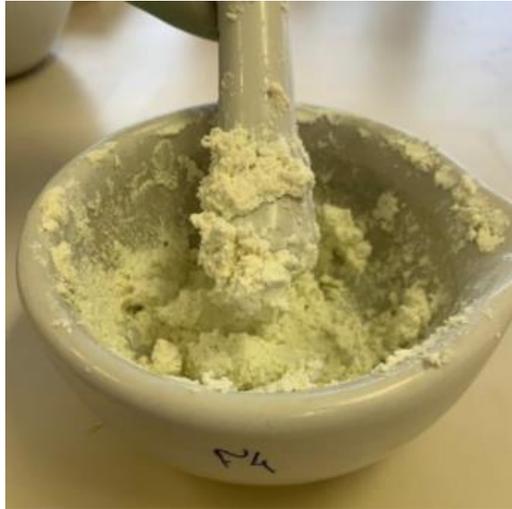


Figura 46: Pasta Experimental F4

Pasta Experimental F5 – ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, CHX, BaSO_4 , Óleo de silicone, IMIDA): os componentes sólidos não homogeneizaram na mistura, grande formação de grumos incompatível com uma pasta obturadora ideal (Figura 47):



Figura 47: Pasta Experimental F5

Ao final, verificamos que a maioria das formulações das pastas experimentais não apresentavam os pré-requisitos básicos para uma pasta obturadora ideal e apresentaram sinais visuais de incompatibilidade física dos componentes. Dessa forma, optamos por excluir as formulações das pastas experimentais F4 e F5 por incompatibilidade de cor e consistência necessária para o uso proposto.

Para continuidade do experimento, reajustamos os componentes das formulações das pastas experimentais F1, F2 E F3:

Tabela 9: Componentes ajustados para formular 50g das pastas experimentais

COMPONENTES	F1	F2	F3
Ca (OH)₂	12,5g	12,5g	12,5g
CHX 20%	5mL	5mL	5mL
CLORANFENICOL	--	1g	2g
BaSO₄	7,5g	7,5g	7,5g
CONSERVANTE IMIDA 50%*	0,6mL	0,6mL	0,6mL
VEÍCULO ÓLEO DE SILICONE	24,4 mL	23,4 mL	22,4 mL
TOTAL	50g	50g	50g

**Preparo da solução - diluir 5g de imidazolinidil ureia em 10 ml de água destilada.*

Após separação e pesagem dos componentes (figura 48) conforme já descrito anteriormente, deu-se seguimento ao preparo das formulações das pastas experimentais. Após homogeneização dos componentes e intensa manipulação foi avaliado o aspecto final das pastas experimentais. As formulações após manipuladas, foram armazenadas em frascos de polietileno de parede dupla

herméticos em armário no prédio da Faculdade de Farmácia – Universidade de Passo Fundo sala 208, em condições ambientes sem exposição a luz, em temperaturas de 20-25 °C (Figura 49).



Figura 48 – Separação materiais para preparo das formulações



Figura 49: Pastas testadas após manipulação em recipientes plásticos com tampa

As pastas experimentais foram avaliadas quanto a sua estabilidade física: cor, consistência, separação de fases, formação de grumos ou precipitados após 30 dias (Figura 50):



Figura 50: Aspecto físico das pastas experimentais F1, F2 e F3 respectivamente após 30 dias.

Foi verificada instabilidade física das pastas experimentais F2 e F3 após 30 dias: alteração de cor, formação de grumos, separação de fases provavelmente causada pela interação entre cloranfenicol e $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Apenas a pasta experimental F1 se manteve sem alteração de cor, apresentou discreta alteração próxima a tampa do pote, o que pode ter ocorrido devido a contaminação cruzada das outras

formulações durante a fase de transferência das composições para os frascos de armazenamento.

A Pasta Experimental F1 foi mantida armazenada em frasco de polietileno de parede dupla hermético, a temperatura entre 20-25 °C, sem exposição a luz para manter acompanhamento das propriedades físicas; as pastas experimentais F2 e F3 sofreram modificações em sua composição na tentativa de melhorar estabilidade do cloranfenicol (Tabela 10).

Para baixar o pH do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ foi adicionado HCl 17% que foi homogeneizado junto ao pó de acordo com a quantidade necessária para cada formulação. O procedimento de homogeneização do $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{HCl} 17\%$ foi realizado em capela de exaustão. Na formulação da Pasta Experimental F2 foi acrescentado o espessante HPMC (hidroxipropilmetilcelulose).

Tabela 10: Componentes ajustados para formular 50g das pastas experimentais F2 e F3:

COMPONENTES	F2	F3
Ca(OH)₂	7,2 g + HCl 12,5 mL**	7,2g + HCl 15 mL**
CHX 20%	4 mL	4 mL
CLORANFENICOL	0,8g	1,6g
BaSO₄	10g	10g
CONSERVANTE IMIDA 50% *	0,48 mL	0,48 mL
HPMC	0,5g	-----
TOTAL	50g	50g

**Preparo da solução - diluir 5g de imidazolidil ureia em 10 mL de água destilada.*

***O ácido clorídrico foi adicionado separadamente ao hidróxido de cálcio em uma capela de exaustão, após misturado, foi incorporado a formulação.*

Aspecto das pastas experimentais F2 e F3 após homogeneizadas e armazenadas em frascos de polietileno de parede dupla herméticos a temperaturas de 20-25 °C (Figura 51).

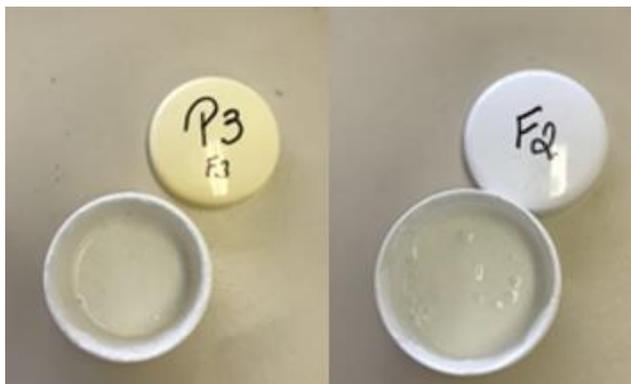


Figura 51: Pastas Experimentais F2 e F3 após manipulação

As Pastas Experimentais ficaram armazenadas durante 10 dias. Após esse período observou-se instabilidade física pela provável interação entre os componentes da formulação mesmo após tentativa de estabilização de pH, resultando em alteração de cor, separação de componentes e formação de precipitado marrom (Figura 52).



Figura 52: Pastas Experimentais F2 e F3 após 10 dias.

A pasta experimental F1 foi mantida armazenada e após 3 meses foi realizada nova avaliação das propriedades físicas (Figura 53):



Figura 53: Pasta Experimental F1 após 90 dias

Pasta Experimental F1 – (Ca(OH)₂, CHX, BaSO₄, Óleo de silicone, IMIDA) *manteve boa estabilidade* física após 3 meses com pequena alteração de cor devido a contaminação cruzada provavelmente durante processo de armazenamento com as demais pastas testadas inicialmente, consistência compatível com as pastas já comercializadas, não houve formação de grumos neste período; optamos por dar continuidade com a formulação F1 na pesquisa.

Com base nesses dados físicos visuais iniciais, buscamos novamente auxílio na literatura para a substituição e inclusão de novos componentes para dar continuidade ao estudo. A pasta experimental F1 manteve a composição inicial; o agente antibiótico nas pastas experimentais F4, F5 e F6 foi substituído por Otosporin ® ou Sulfato de Neomicina (Tabela 11).

Tabela 11: Componentes utilizados para formular 100g da pasta experimental F1, 50g da pasta experimental F4, e 30g das pastas experimentais F5 e F6:

COMPONENTES	F1	F4 (pH12)	F5 (pH)	F6
Ca (OH)₂	25g	12,5g	7,5g	7,5g
CHX 20%	10mL	5mL	3mL	3mL
BaSO₄	15g	7,5g	4,5g	4,5g
Sulfato de Neomicina	--	0,25g	0,15g	--
Otosporin ®	--	--	--	5mL
Conservante IMIDA 50% *	1,2mL	0,6 mL	0,36mL	0,36mL
Veículo – óleo de silicone	48,8mL	24,15 mL	--	14mL
HPMC	--	--	0,5g	--
HCl 17%	--	--	14mL	--
PESO TOTAL (gramas)	100g	50g	30g	30g

**Preparo da solução - diluir 5g de imidazolinidil ureia em 10mL de água destilada.*

***O ácido clorídrico foi adicionado separadamente ao hidróxido de cálcio em uma capela de exaustão, após misturado, foi incorporado a formulação*

A pasta experimental **F1** foi manipulada novamente juntamente com as demais formulações para avaliações de estabilidade física nos mesmos tempos. Logo após manipulação, as pastas experimentais foram avaliadas quanto seu aspecto físico visual inicial (Figuras 54, 55, 56, 57) e após armazenadas em frascos de polietileno de parede dupla e armazenados em armário no prédio da Faculdade de Farmácia – Universidade de Passo Fundo sala 208, em condições ambientes sem exposição a luz, em temperaturas de 20-25 °C.

Pasta Experimental F1 – (Ca (OH)₂, CHX, BaSO₄, veículo óleo de silicone e conservante IMIDA): após nova maipulação, manteve boa estabilidade física inicial, cor branca e consistência semelhante as pastas a base de hidróxido de cálcio já comercializadas, sem formação de grumos ou separação de fases dos componentes (Figura 54):



Figura 54: Pasta Experimental F1

Pasta Experimental F4 - pH 14 (Ca (OH)₂, CHX, BaSO₄, sulfato de Neomicina, veículo óleo de silicone e conservante IMIDA): observou-se pequena formação de grumos não eliminados durante intensa manipulação, a sua consistência apresentou-se mais firme que as pastas já utilizadas comercialmente. F4 inicialmente não apresentou aspectos físicos visuais compatíveis com o desejado para uma pasta obturadora de dentes decíduos (Figura 55):



Figura 55: Pasta Experimental F4

Pasta Experimental F5- pH 7: (Ca (OH)₂ + HC17%, CHX, BaSO₄, sulfato de neomicina, conservante IMIDA, espessante HPMC): boa estabilidade física inicial, cor branca e consistência semelhante as pastas a base de hidróxido de cálcio já comercializadas, sem formação de grumos ou separação de fases dos componentes (Figura 56):



Figura 56: Pasta Experimental F5

A *Pasta Experimental F6* – (Ca (OH)_2 , **CHX**, **Otosporin®**, BaSO_4 , **veículo óleo de silicone e conservante IMIDA**): apresentou aspecto inicial grumoso e separação de fases dos componentes após mistura. Essa formulação não cumpriu com os pré-requisitos básicos necessários de uma pasta obturadora ideal para dentes decíduos.



Figura 57: Pasta Experimental F6

As Pastas Experimentais foram armazenadas em frascos de polietileno de parede dupla herméticos e armazenados em armário no prédio da Faculdade de Farmácia – Universidade de Passo Fundo sala 208, em condições ambientes sem exposição a luz, em temperaturas de 20-25 °C.

As avaliações, quanto a estabilidade física visual das Pastas Experimentais, foram realizadas logo após a manipulação, 7 dias (Figura 58), 14 dias (Figura 59) e 30 dias após a manipulação (Figura 60).



Figura 58: Pastas Experimentais F1, F4, F5 e F6 - 7 dias após manipulação.



Figura 59: Pastas Experimentais F1, F4, F5 e F6 - 14 dias após manipulação.



Figura 60: Pastas Experimentais F1, F4, F5 e F6 30 dias após manipulação.

Durante os primeiros 30 dias de armazenamento as Pastas Experimentais não apresentaram alterações significativas. Ao final de 90 dias de acompanhamento, alguns sinais de instabilidade foram visualizados e a estabilidade física visual das pastas experimentais armazenadas foi descrita:

Pasta Experimental F1: não sofreu alteração de cor ou consistência, sem formação de grumos, pequena separação de fases dos componentes, mantendo suas propriedades físicas semelhante a avaliação inicial e com as pastas a base de hidróxido de cálcio já comercializadas (Figura 61):



Figura 61: Pasta Experimental F1 após 90 dias armazenada.

Pasta Experimental F4: discreta alteração de cor e consistência, formação de grumos e pequena separação de fases dos componentes (Figura 62):



Figura 62: Pasta Experimental F4 após 90 dias armazenada.

Pasta Experimental F5: pequena alteração de cor sem alterar consistência, sem formação de grumos e discreta formação de bolhas, mantendo o aspecto físico semelhante ao inicial e com as pastas a base de hidróxido de cálcio já comercializadas (Figura 63):

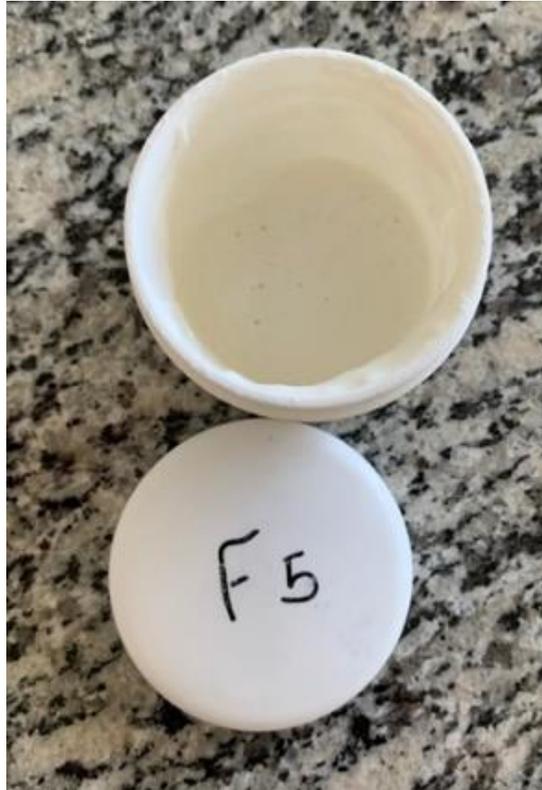


Figura 63: Pasta Experimental F5 após 90 dias armazenada.

Pasta Experimental F6: alteração de cor branca/ amarelada, aumento da separação de fases dos componentes e grande formação de grumos, incompatível com uma pasta obturadora ideal para uso na dentição decídua (Figura 64):

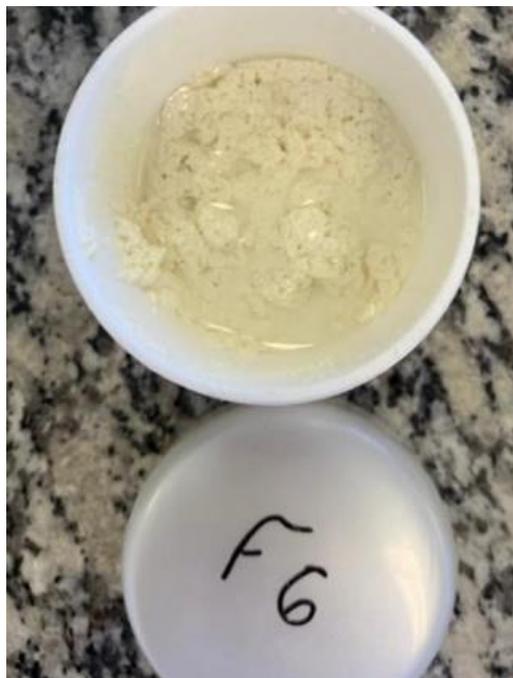


Figura 64: Pasta Experimental F6 após 90 dias armazenada.

Após essa nova avaliação da estabilidade física das pastas armazenadas em 90 dias de acompanhamento, optou-se por seguir o acompanhamento apenas as Pastas Experimentais F1 e F5 que apresentaram melhores resultados de estabilidade física. Essas Pastas Experimentais diferem em sua composição no componente antibiótico, onde a Pasta Experimental F1 não apresenta componente antibiótico em sua composição, e a Pasta

Experimental F5 tem adicionando Sulfato de Neomicina em sua composição.

Os acompanhamentos foram realizados em intervalos maiores. Após o período de aproximadamente 120 dias e 320 dias as Pastas Experimentais F1 e F5 mantiveram boa estabilidade física com discretas alterações que foram descritas:

Pasta Experimental F1 após ~120/320 dias – sem alteração de cor- manteve cor branca, discreta separação de fases da parte oleosa, mas que retorna ao aspecto inicial após manipulação com espátula. Não houve formação de grumos ou precipitados (Figura 65):



Figura 65: Pasta Experimental F1 após aproximadamente 120 e 320 dias respectivamente.

Pasta Experimental F5 após ~120/320 dias – discreta alteração de cor, formação de discretas bolhas, mas que retorna ao aspecto inicial após manipulação com espátula, sem formação de grumos ou separação de fases dos componentes (Figura 66):

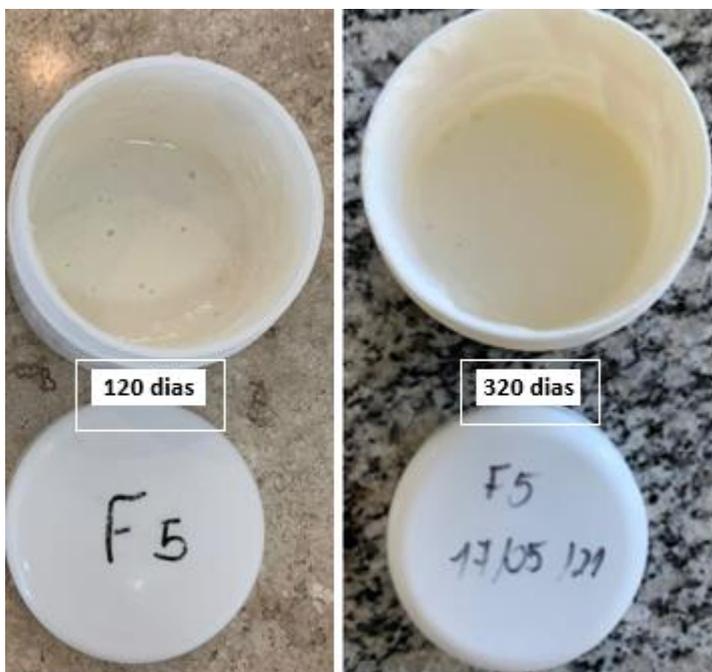


Figura 66: Pasta Experimental F5 após aproximadamente 120 e 320 dias respectivamente.

5.2 TESTE PH

Neste estudo, avaliamos o pH de diferentes pastas comerciais, como Pasta Calen®, Pasta Guedes-Pinto e Óxido de Zinco e Eugenol, em comparação com a formulação das Pastas Experimentais, sendo que a base para as pastas experimentais F1 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, CHX, BaSO_4) e F5 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, CHX, BaSO_4 e Sulfato Neomicina), é o $\text{Ca}(\text{OH})_2$. O $\text{Ca}(\text{OH})_2$ possui um pH alcalino em média 12,6 o que proporciona um ambiente desagradável para o desenvolvimento de microrganismos indesejados no conduto radicular (SPOSITO, 2017; MASSARA *et al.*, 2012).

Como forma de avaliação do pH das pastas experimentais, medimos o valor do pH em três momentos diferentes, sendo primeiramente no dia zero de formulação, após 11 dias e após 34 dias (Tabela 12).

Tabela 12: Média de pH das pastas experimentais F1 e F5 e das pastas comerciais Calen, Guedes Pinto e OZE:

Grupo	Dia 0	11 dia	34 dias
Pasta Experimental F1	2,0	1,0	2,0
Pasta Experimental F5	12,0	11,0	13,0
Pasta Calen®	12,0	12,0	12,0
Pasta Guedes- Pinto *	9,0	--	--
Pasta OZE *	7,0	--	--

*Manipuladas no momento do teste

Como resultado, no primeiro dia de formulação, o pH das Pastas Experimentais estava básico, com valor 12, havendo uma pequena alteração do seu valor aos 11 dias da formulação, diminuindo o valor do pH das Pastas Experimentais F1 e F5 para 11, toda via, aos 34 dias de formulação o pH da Pasta Experimental F1 retornou ao valor inicial e a Pasta Experimental F5, apresentou o pH mais alcalino, com valor 13 no seu 34º dia de composição. Pode-se perceber que o pH manteve-se alcalino durante todo o período de teste.

Já com relação as pastas comerciais, um fator importante a ser considerado nestes resultados é que as Pastas Guedes Pinto e OZE são pastas manipuladas no momento do uso, e neste estudo

procedeu-se da mesma forma, não sendo possível avaliar a estabilidade das mesmas a longo prazo através do pH. A Pasta Calen foi avaliada juntamente com as Pastas Experimentais nos períodos 1 e 34 dias, mantendo seu pH alcalino atingindo o valor de 12.

A pasta Guedes-Pinto, padrão ouro na odontologia com relação a endodontia de dentes decíduos apresentou pH básico após a formulação com valor 9, e a pasta OZE pH em 7, ambiente neutro, após a formulação.

5.3 TESTE DE ESPALHABILIDADE

Para avaliar a estabilidade física dos materiais foi realizado o teste de espalhabilidade das Pastas Experimentais F1 e F5 bem como das pastas comercializadas no mercado: Pasta Calen®, Pasta Guedes Pinto, Pasta OZE. Foi realizada o teste no dia 1 da formulação, e após 30 dias de armazenamento. A partir da idéia de que a espalhabilidade reflete na estabilidade das formulações e possivelmente possa influenciar no escoamento das pastas, avaliamos as Pastas Experimentais comparada as Pastas já usadas comercialmente.

Para fins de comparação em relação a estabilidade física, apenas as Pastas Experimentais e a Pasta Calen puderam ser

comparadas, pois as Pastas Guedes Pinto e OZE são manipuladas no momento do uso, o qual em relação a estabilidade não deve ser um fator a ser considerado.

A pasta Experimental F5 apresentou discreto aumento no valor de espalhabilidade após os 30 dias da formulação quando comparada ao dia 1. A Pasta Experimental F1 demonstrou um valor decrescente de espalhabilidade (Tabela 13). A pasta comercial Calen manteve-se estável quanto ao seu valor inicial do dia 1. A pasta que obteve maior valor de espalhabilidade foi a pasta Guedes, seguindo da Pasta Calen®, Pasta Experimental F1, Pasta Experimental F5 e OZE, sendo que, a pasta de Óxido de Zinco e Eugenol obteve o valor mais baixo de todas as pastas, conforme os valores indicados (Tabela 14).

Tabela 13: Média de espalhabilidade das Formulações experimentais

GRUPO PLACA	F1		F5	
	DIA 1	DIA 30	DIA 1	DIA 30
1	8.90	6.34	7.87	8.47
2	9.44	6.73	8.72	10.08
3	9.62	6.79	9.07	10.85
4	9.80	6.79	9.62	11.05
5	9.99	6.9	9.62	11.05

Tabela 14: Média de espalhabilidade das Pastas comerciais

*Manipuladas no momento do teste

GRUPO PLACA	PASTA GUEDES*		PASTA Calen®		PASTA OZE*	
	DIA 1	DIA 30	DIA 1	DIA 30	DIA 1	DIA 30
1	17.36	--	6.60	6.60	4.03	--
2	18.86	--	9.07	9.07	4.77	--
3	19.67	--	10.76	10.76	5.86	--
4	20.18	--	12.17	12.17	6.75	--
5	20.46	--	13.66	13.66	7.38	--

A análise estatística das medias quando a Pasta Calen foi comparada as Pastas Experimentais de maneira pareada, ou seja, para cada formula testada, duas medias foram obtidas, o teste T mostrou que existe diferença significativa apenas nas medias para as formulações de F1 e F5 (Tabela 15).

Tabela 15: Média da espalhabilidade dos grupos nos diferentes tempos de teste.

GRUPO	MÉDIA	MÉDIA	p*
	Dia 1	Dia 30	
F1	9.55	6.71	0,008
F5	8.98	10.30	0,002
Pasta Calen®	10.45	10.45	-

Teste t para amostras pareadas

Tabela 16: - Comparações de médias dos diferentes grupos aos 30 dias de armazenamento

COMPARAÇÃO	MÉDIA	MÉDIA	p*
F1*F5	6,71	10,30	0,000
F1* Calen®	6,71	10,45	0,001
F5* Calen®	10,30	10,45	0,623

Teste t para amostras independentes

5.4 TESTE RADIOPACIDADE

Foram realizadas análises radiográficas das pastas a base de Hidróxido de Cálcio: Pasta Experimental F1 e Pasta Experimental F5 em comparação com a Pasta Calen®. Sabendo que o valor recomendado de milímetros de Alumínio (mm/Al) é de 3mm, analisou-se os resultados obtidos através da radiografia digital das mesmas (Figura 67):

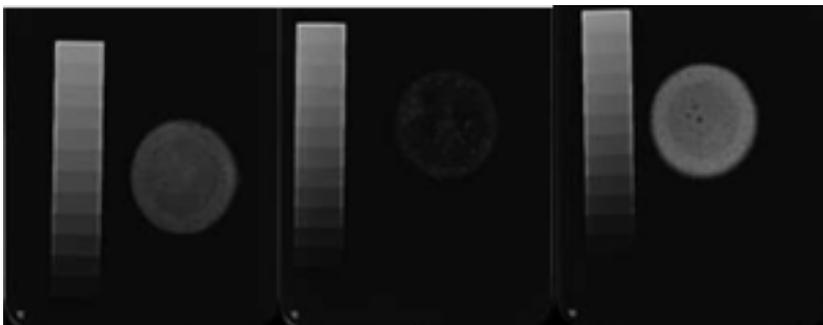


Figura 67: Radiografia digital das pastas Calen®, F1 e F5.

Os valores de radiopacidade encontrados foram descritos na tabela 17:

Tabela 17: Radiopacidade em milímetro de Alumínio (mm/Al) dos materiais estudados

Pasta	Radiopacidade	Valor recomendado pelas normas da ADA nº 57 e da ISSO 6876/2001.
F1	Placa 1 e 2 2,5mm/Al	Não
F5	Placa 10 e 11 9.4mm/Al	Sim
Calen®	Placa 8 e 9 8,5mm/Al	Sim

5.5 AÇÃO ANTIMICROBIANA – HALO INIBITÓRIO

A média e desvio padrão de halo inibitório, em mm, por meio do método de contato direto dos protocolos testados com o meio de cultura microbiano estão expressos na (Tabela 12). De acordo com os resultados do presente estudo, a maior média de halo inibitório foi observada no grupo das Pastas Experimentais F1 (Ca(OH)_2 , CHX, BaSO_4) e F5 (Ca(OH)_2 , CHX, BaSO_4 e Sulfato de Neomicina), sendo estatisticamente superior a todos os demais grupos testados ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente

significante entre os grupos: controle (vaselina), Pasta Óxido Zinco Eugenol e Pasta Calen® ($p>0,05$), sendo estatisticamente inferiores ao grupo Pasta Guedes-Pinto ($p<0,05$).

Tabela 18: Média e desvio padrão de halo inibitório (em mm), através do método de contato direto dos protocolos testados com o meio de cultura microbiano.

GRUPOS	HALO INIBITÓRIO
Controle - vaselina	0.00 (0.00) ^a
Pasta Guedes Pinto	8.04 (0.55) ^b
Pasta OZE	0.00 (0.00) ^a
Pasta Calen®	0.00 (0.00) ^a
Pasta Experimental F1	12.94 (0.48) ^c
Pasta Experimental F5	13.46 (0.64) ^c

** Letras diferentes, na coluna, representam diferença estatisticamente significante ($p<0.05$).

5.6 CITOTOXICIDADE

A média e desvio padrão da taxa percentual de viabilidade celular após tratamento com os protocolos testados (Tabela 19). A maior taxa de viabilidade celular foi observada nos grupos controle, Pasta Guedes-Pinto e Pastas Experimentais F1 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, CHX, BaSO_4) e F5 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, CHX, BaSO_4 e Sulfato Neomicina), sendo estatisticamente diferente dos demais grupos ($p < 0,05$), sem diferença estatisticamente significante entre si ($p > 0,05$).

Tabela 19: Média e desvio padrão da taxa percentual de viabilidade celular após tratamento com os protocolos testados

GRUPOS	VIABILIDADE CELULAR (%)
Controle	100.00 (2.58) ^a
Pasta Guedes Pinto	100.00 (2.54) ^a
Pasta OZE	30.38 (1.31) ^b
Pasta Calen®	56.76 (5.27) ^c
Pasta Experimental F1	100 (2.88) ^a
Pasta Experimental F5	96.39 (2.02) ^a

5.7 AÇÃO ANTIMICROBIANA – CONTAGEM UFC

Para análise da normalidade dos dados obtidos em grupos experimentais e no grupo controle o teste de Shapiro-Wilk foi aplicado. Em todos os grupos o teste demonstrou que os dados não diferem da distribuição normal dos mesmos, caracterizando a normalidade dos dados ($p > 0.05$). A verificação de diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais foi conduzida pela aplicação do teste estatístico de One-way ANOVA seguido por post hoc de Tukey (Tabela 20).

Tabela 20: Média, desvio padrão e porcentagem de redução de unidades formadoras de colônia (UFC) em função do grupo e tempo de análise.

GRUPO	UFC Inicial	UFC Final	% de redução
Pasta Calen®	$5.2 \times 10^6 (\pm 4.74 \times 10^6)^{A,a}$	$8.9 \times 10^1 (\pm 1.89 \times 10^2)^{B,b}$	99.99% ^b
Pasta Guedes Pinto	$1.8 \times 10^8 (\pm 2.46 \times 10^7)^{A,a}$	$1.42 \times 10^2 (\pm 2.10 \times 10^2)^{B,b}$	99.99% ^b
Pasta Experimental F1	$2.1 \times 10^7 (\pm 6.37 \times 10^0)^{A,a}$	$5.9 \times 10^0 (\pm 6.37 \times 10^0)^{B,b}$	99.99% ^b
Pasta Experimental F5	$2.2 \times 10^7 (\pm 2.53 \times 10^7)^{A,a}$	$2.6 \times 10^0 (\pm 4.65 \times 10^0)^{B,b}$	99.99% ^b
OZE	$1.1 \times 10^7 (\pm 2.12 \times 10^7)^{A,a}$	$2.8 \times 10^4 (\pm 7.30 \times 10^4)^{B,b}$	98.86% ^b
Controle – soro fisiológico	$2.1 \times 10^6 (\pm 8.01 \times 10^5)^{A,a}$	$1.3 \times 10^6 (\pm 2.93 \times 10^5)^{A,a}$	31.09% ^a

** Letras maiúsculas diferentes, na linha, indicam diferença estatisticamente significativa na análise intragrupos ($p < 0.05$); letras minúsculas diferentes, na coluna, indicam diferença estatisticamente significativa na análise intergrupos ($p < 0.05$).

Houve diferença estatisticamente significativa em todos os grupos entre a coleta inicial e final ($p < 0.05$). As análises comparativas demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p > 0.05$). No entanto, ao comparar os grupos experimentais ao grupo controle houve diferença significativa sendo Calen® / Controle ($p < 0.01$); Rifocort + Iodofórmio + PMCC / Controle ($p < 0.01$); Pasta Experimental F1(Ca (OH)₂, CHX, BaSO₄) / Controle ($p < 0.01$); Pasta Experimental F5 (Ca(OH)₂, CHX, BaSO₄, Sulfato Neomicina) / Controle ($p < 0.01$) e OZE / Controle ($p < 0.01$).

8. DISCUSSÃO

De acordo com uma recente revisão sistemática sobre tratamentos pulpares em dentes decíduos publicada em 2018 na *Cochrane Database of Systematic Reviews*, até o momento não existe um protocolo ideal bem como um material obturador para endodontia de dentes decíduos com evidência científica comprovada de qual o melhor a ser usado (ABO, 2020.; SMÄIL-FAUGERON *et al.*, 2018). As pastas comercialmente já utilizadas que são preconizadas, ou apresentam possibilidade de uso segundo as diretrizes da American Academy of Pediatric Dentistry e do Reino Unido, são óxido de zinco e eugenol (OZE) ou de materiais a base de hidróxido de cálcio. Materiais a base de iodofórmio também vem sendo preconizados (ABO, 2020; AMERICAN ACADEMY PEDIATRIC DENTISTRY, 2018). A Pasta a base de OZE vem sendo substituída por ter limitações no uso e por ser associado a danos quando extravasado aos tecidos periapicais, desencadeando reações inflamatórias de corpo estranho e desvio da posição natural na erupção dos dentes permanentes devido a sua dureza (BARJA-FIDALGO *et al.*, 2011; MORTAZAVI; MESBAHI, 2004, PINTO *et al.*, 2011). As pastas a base de hidróxido de cálcio existentes no mercado têm rápida reabsorção e baixa radiopacidade (CASSOL *et al.*, 2019); as pastas iodoformadas tem odor forte e característico, possibilidade de

alteração de cor das estruturas dentárias e potencial alergênico (REZENDE *et al.*, 2002), e ainda a Pasta Guedes Pinto utilizada no Brasil, tem na sua composição a pomada Rifocort que não está mais disponível no mercado farmacêutico (ANTONIAZZI *et al.*, 2015).

Durante o processo de formulação da Pasta Experimental, percebemos que um dos componentes propostos inicialmente e utilizados no preparo das formulações experimentais, o agente antibiótico Cloranfenicol, não preenchia os pré-requisitos básicos necessários para uma pasta obturadora ideal para uso na dentição decídua. O pH do hidróxido de cálcio se situa em torno de 12, e o cloranfenicol se torna instável neste pH, o que pode ter contribuído para a instabilidade física observada, causando a alteração de cor nas primeiras formulações testadas. A alteração de cor além de ser um problema que potencialmente poderá afetar esteticamente os dentes decíduos tratados endodonticamente, também pode significar que os componentes da fórmula interagiram causando incompatibilidade física, que de acordo com Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA, pode ser observada através de alterações no aspecto físico da formulação como precipitação, alteração de cor, separação de fases, cristalização, formação de gretas, entre outras (ANVISA, 2004).

Com base nessas informações iniciais, buscou-se na literatura por componentes capazes de preencher os requisitos para uma formulação ideal de pasta para uso na obturação de dentes

decíduos. Por fim, os componentes utilizados neste estudo foram Hidróxido de Cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), Clorexidina (CHX), Sulfato de Bário (BaSO_4) como agente radiopacificador e Sulfato de Neomicina como agente antibiótico. Pelas propriedades biológicas já consolidadas do $\text{Ca}(\text{OH})_2$, as pastas a base deste componente são amplamente recomendadas. Sua atividade antimicrobiana, devido à dissociação iônica dos íons cálcio e hidroxila, sua baixa toxicidade, seu pH, solubilidade, propriedades antibacterianas, antifúngicas e propriedades de biocompatibilidade ele por esse motivo ele foi o material escolha para uso na formulação da nossa Pasta Experimental (SILVA *et al.*, 2018, DAMLE *et al.*, 2005). Estudos tem sugerido a associação entre clorexidina e hidróxido de cálcio com o intuito de aumentar a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio. A presença de clorexidina acrescenta substantividade à formulação, devido à sua capacidade de adsorção e liberação lenta de moléculas ativas para os tecidos dentários, podendo a clorexidina manter o canal livre de microrganismos, mesmo depois de ser removida do canal (GOMES *et al.*, 2006).

A escolha do agente antibiótico Sulfato de neomicina, deu-se pelo fato deste ser um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro, além de estar presente na formulação do Otosporin, que já é utilizado em Endodontia de dente permanentes como medicação intracanal (RUIZ *et al.* 2002). Também é usado para tratar algumas infecções de pele, hepáticas ou intestinais e em

profilaxia pré cirúrgica. Atua mais sobre as espécies gram negativas altamente sensíveis que incluem: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella sp.*, *Salmonella sp.*, *Serratia sp.*, *Shigella sp.*, *E. proteus vulgaris*. Os microrganismos gram-positivos que são inibidos incluem *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* (WAKSMAN, *et al.* 1949). Em relação ao agente radiopacificador, o sulfato de bário ($BaSO_4$) foi escolhida por ser o agente mais utilizado para conferir radiopacidade a algumas pastas contendo hidróxido de cálcio que já são comercializadas atualmente, como a pasta Ultracal XS® e Hydropast® (LOUREIRO *et al.*, 2018).

As características e propriedades encontradas nas pastas obturadoras devem ser analisadas visto que, são fundamentais para que haja a confirmação de seus atributos desejáveis e critérios ideais, como: possuir propriedades antissépticas, ser facilmente inserida, ser radiopaca e não pigmentar o elemento dentário, por exemplo (CUNHA *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2004; THOMAZ *et al.*, 1994). Além disso, as pastas obturadoras necessitam fornecer uma função de barreira física para a entrada de microrganismos (ARAUJO *et al.*, 2012), bem como, da nutrição para as bactérias existentes no canal radicular. De acordo com a ANVISA, 2004, em seu “Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos”, enfatiza a necessidade de

estudo da estabilidade de novos produtos para fornecer informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto nas variadas condições a que possa estar sujeito desde sua fabricação até o término de sua validade. As alterações podem ser extrínsecas, ou seja, relacionadas a fatores externos aos quais o produto está exposto (tempo, temperatura, luz e oxigênio, umidade, material de acondicionamento, microrganismos e vibração) e intrínsecas, relacionadas à natureza das formulações e, sobretudo, à interação de seus ingredientes entre si e ou com o material de acondicionamento: incompatibilidade física e incompatibilidade química, como, por exemplo, pH, reações de óxido-redução, reações de hidrólise, interação entre ingredientes da formulação e interação entre ingredientes da formulação e o material de acondicionamento (ISAAC *et al.*, 2008)

Neste estudo, foram levadas em consideração fatores que pudessem levar a incompatibilidade física das formulações, onde alterações no aspecto físico da formulação puderam ser visivelmente observadas por: alteração de cor, separação de fases, cristalização, formação de gretas, entre outras. Assim como a Incompatibilidade Química, onde um fator importante a ser analisado é o pH das formulações, sendo neste estudo, a alterações significativas nestes valores uma importante referência para avaliar a estabilidade dos componentes das Pastas Experimentais. Em nosso estudo, as pastas experimentais F1 (Ca(OH)_2 , CHX, BaSO_4)

e F5 (Ca(OH)₂, CHX, BaSO₄ e Sulfato de Neomicina) avaliadas não apresentaram alterações significativas de instabilidade física. Em relação as características físicas visuais, a Pasta Experimental F1 (Ca(OH)₂, CHX, BaSO₄, veículo óleo de silicone, conservante Imidazolinidil ureia) apresentou durante aproximadamente 90 dias de acompanhamento, discreta separação de fases, ficando mais visível a parte oleosa, porém sem alteração de cor ou precipitados, grumos ou gretas. A separação de fases pode ter ocorrido pela presença do veículo óleo de silicone que tem a finalidade de melhorar a espalhabilidade, melhorando a viscosidade da formulação. A separação de fases pode sugerir que ocorreu uma instabilidade física dos componentes ou que a fórmula não ficou completamente homogênea durante sua manipulação, causando uma separação de fases quando a formula esteve em repouso (ANVISA., 2004). A partir deste resultado sugere-se uso de um mixer próprio para mistura de formulações para melhorar a incorporação dos componentes.

A Pasta Experimental F5 (Ca(OH)₂, CHX, BaSO₄, agente antibiótico Sulfato de Neomicina, conservante Imidazolinidil ureia, HCl 17% e espessante HPMC) durante o período de aproximadamente 320 dias de acompanhamento apresentou bom aspecto físico com poucas modificações desde o início do acompanhamento da formulação, foi observada discreta alteração de cor, formação de algumas bolhas, sem formação de grumos,

gretas ou separação de fases dos componentes. Segundo o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004), os critérios para aprovação de produtos em estabilidade devem levar em consideração: o aspecto - o produto deve manter-se íntegro durante todo o teste mantendo seu aspecto inicial em todas as condições, exceto em temperaturas elevadas, freezer ou ciclos em que pequenas alterações são aceitáveis; cor e odor- devem permanecer estáveis por, no mínimo, 15 dias à luz solar, o que pode ser observado em nosso estudo que nos primeiros 15 dias não houve alterações na cor das Pasta Experimentais. Pequenas alterações são aceitáveis em temperaturas elevadas. Esses parâmetros podem justificar as alterações físicas que ocorreram em nossas pastas experimentais, pelo fato de terem sido armazenadas em local com possíveis alterações de temperatura mais elevada durante o período do verão.

Em relação ao controle na redução de microorganismos, as pastas também desempenham essa função através do seu pH, portanto o valor e a manutenção do pH de uma pasta obturadora são fundamentais. Segundo diversos autores, como, SPOSITO, em 2017; MASSARA *et al.*, em 2012 e GONÇALVES em 2010, o valor do pH deve ser alcalino, em torno de 12,6, para o processo de mineralização, agindo nos tecidos dentários e nas bactérias. Este pH, proporciona um ambiente desagradável para as bactérias desenvolvendo uma ação antisséptica, assim, com a elevação do

pH há uma inibição enzimática microbiana, neutralizando lipossacarídeos e promovendo uma reparação tecidual. Em nossos resultados, as pastas formuladas (F1 e F5) e a pasta comercial Calen®, apresentam essa faixa de pH, variando entre 11 e 13, demonstrando então que estas mantêm uma propriedade físico/química desejável. Ainda SPOSITO (2017), menciona que as propriedades antimicrobianas do hidróxido de cálcio são exemplificadas através da sua dissociação em íons cálcio e íons hidroxila. A estimulação do reparo e deposição de tecido mineralizado provem de íons cálcio liberados e do pH, sendo que uma alta concentração de íons cálcio pode ativar a pirofosfatase, enzima importante no processo de mineralização, formando barreiras de dentina, osteocementárias, selamento apical e de túbulos dentinários (MASSARA *et al.*, 2012). Reforçando a necessidade de avaliar e manter o pH das pastas obturadoras, Pereira *et al.*, 2009 realizou alguns testes para verificar a alteração do pH quando introduzia o hidróxido de cálcio e do iodofórmio associados ou não a um veículo em três diferentes soluções: água destilada, soro fisiológico ou álcool. Observou-se que o pH do hidróxido de cálcio foi sempre básico (em torno de 12), corroborando com os dados encontrados em nosso estudo, onde as nas Pastas Experimentais testadas F1 e F5 mantiveram-se com o pH mais alcalino durante todo período de avaliação, especialmente

a Pasta Experimental F5 que manteve o pH entre 11-13, seguido das Pastas comerciais Calen® pH 12 e Guedes-Pinto pH 9.

A pasta a base de iodofórmio (Pasta Guedes Pinto) se manteve neutra no estudo de Pereira *et al.*, 2009 em contrapartida, no nosso estudo ela manteve-se básica, todavia, com um valor mais baixo que o desejável (pH 9,0). Tornando-se assim, pouco favorável à ação antimicrobiana, onde normalmente a maioria das espécies bacterianas que coloniza os canais radiculares consegue manter sua viabilidade até um pH de 9 (SPOSITO, 2017). Holland *et al.*, 2002, avaliou dentes humanos extraídos, preparados e preenchidos com uma pasta de hidróxido de cálcio, inicialmente, e após 30 dias, obturado com o Óxido de Zinco e Eugenol. Neste estudo foi encontrado o pH de 7,26 quando obturado com a OZE, resultado este, similar ao nosso, onde a pasta com OZE manteve seu pH em 7 nos diferentes momentos avaliados. Neste valor o pH demonstra-se desfavorável em relação a questão antimicrobiana, entretanto, quando usado em associação a pasta de Ca(OH)_2 , pode solucionar alguns problemas como a resistência de alguns microorganismos ao hidróxido de cálcio, como, *E. faecalis* e *Candida Albicans*, outro veículo que pode solucionar este problema é a clorexidina (SPOSITO, 2017). A conclusão é de que na associação com hidróxido de cálcio as propriedades melhoram, mas isso se deve ao hidróxido de cálcio e não ao OZE, indicando

claramente uma tendência favorável a utilização do Hidróxido de Cálcio na formulação das Pastas Experimentais.

Outro aspecto que deve ser levado em consideração para a avaliação da estabilidade física das formulações é a espalhabilidade, pois uma diminuição ou aumento significativo deste valor pode indicar que está ocorrendo instabilidade física das formulações estudadas. Das pastas comerciais avaliadas quanto a espalhabilidade, a que teve maior espalhabilidade foi a pasta Guedes, seguida das Pastas Calen e OZE. A estabilidade física relacionada a espalhabilidade das pastas OZE e Pasta Guedes não pode ser comparada as Pastas Experimentais e a Pasta comercial Calen® pelo fato de terem a necessidade de serem manipuladas no momento do uso, o que não permite avaliar a mesma formulação em períodos distintos. Ainda existe a possibilidade de sofrerem alterações nas suas proporções quando manipuladas, aumentando ou diminuindo a espalhabilidade. Com relação as Pastas Experimentais a base de Hidróxido de Cálcio, podemos comparar e perceber neste estudo que a Pasta Calen® manteve a estabilidade nos 2 períodos avaliados, o que se deve ao fato da mesma ser armazenada em tubete plástico com embolo fechado e que deve ser utilizada com seringa endodôntica própria para uso (Seringa Mario Leonardo), o que mantém suas propriedades se utilizada conforme as recomendações e dentro do prazo de validade de 2 anos estipulado pelo fabricante- SS White.

A Pasta Experimental F5 apresentou um aumento no valor da espalhabilidade com significância estatística após os 30 dias da formulação quando comparada ao dia 1, o que pode ser justificado pelo uso do espessante HPMC que aumenta a viscosidade da pasta. Já a Pasta Experimental F1 demonstrou um valor decrescente de espalhabilidade, que pode ter acontecido pela presença de óleo de silicone em sua formulação que quando armazenada durante o período de 30 dias da segunda avaliação sofreu uma discreta separação de fases ficando o óleo de silicone separado do restante da formulação, o que pode ser um indicativo de instabilidade física dessa formulação ou que a separação ocorreu porque fórmula não ficou completamente homogênea durante sua manipulação, causando uma separação de fases quando a fórmula esteve em repouso. O teste de espalhabilidade neste estudo também pode sugerir o quanto as Pastas experimentais possam a vir escoar e ser facilmente inseridas nos canais radiculares se as formulações tiverem capacidade de espalhabilidade. MASSARA *et al.*, 2012 e GONÇALVES em 2010, reforçam que por vezes mesmo após a instrumentação, bactérias podem persistir nas ramificações do canal, nos túbulos dentinários expostos, por isso um material com escoamento adequado e com capacidade de ação antimicrobiana é imprescindível para alcançar o sucesso endodôntico. Quando comparadas as médias de espalhabilidade os dados encontrados neste estudo sugerem que a Pasta Experimental F5 comparada a

pasta comercial Calen®, que também é uma pasta a base de hidróxido de cálcio que é disponibilizada pronta para uso, não houve significância estatística na média de espalhabilidade, o que pode ser um indicativo que a Pasta Experimental F5 seja uma boa opção para uso na obturação de canais radiculares de dentes decíduos. Porém, sugere-se que estudos de escoamento dessas Pastas sejam realizados para trazer melhores evidências científicas.

Outra propriedade físico-química de importância na avaliação de pastas para obturação de canais radiculares de dentes decíduos é a radiopacidade, que permite a distinção entre materiais obturadores e estruturas anatômicas circundantes (PILOWNIC *et al.*, 2017). Algumas pastas possuem em sua composição materiais que são radiopacos, no entanto, pode-se também utilizar a adição de um material com propriedades de radiopacidade para fornecer tal propriedade, (ALAÇAM *et al.*, 1990; COSTA *et al.*, 2014). Neste estudo utilizamos como material radiopacificador o Sulfato de Bário (BaSO_4), que possui pouca solubilidade em água, e por conta de sua baixa dissolução, há possibilidades mais frequentes de radiopacidade residual (ALAÇAM *et al.*, 1990; LOUREIRO *et al.*, 2018). Na formulação das Pastas Experimentais F1 (Ca(OH)_2 , CHX, BaSO_4) e F5 (Ca(OH)_2 , CHX, BaSO_4 e Sulfato de Neomicina) o agente radiopacificador foi utilizado na proporção de 30% (p/p), aproximadamente em cada formulação. A propriedade da radiopacidade foi estudada por Salles *et al.*, em 2007 e Loureiro

et al., 2018, em pastas a base de Hidróxido de Cálcio (Calen®), e seus resultados foram positivos. Comparando a este estudo, também testamos as Pastas Experimentais F1 e F5 *versus* a pasta Calen®. Considerando o valor de referência pelas normas da ADA nº 57 e da ISO 6876/2001 a nossa Pasta Experimental F5 (Ca(OH)₂, CHX, BaSO₄, Sulfato Neomicina, HPMC) obteve valor de 9,4 mm/Al, estando de acordo com a norma exigida que recomenda o mínimo de 3 mm Al para materiais de obturação do canal radicular, seguido pelo valor da pasta Calen® que em nosso estudo apresentou o valor de 8,5 mmAl corroborando com estudos anteriores onde a radiopacidade da Pasta Calen® é considerada satisfatória, mas vem sido sugerido a associação de outros materiais que aumentem a sua radiopacidade (PILOWINK *et al.*, 2017; SALLES *et al.*, 2007) e a Pasta Experimental F1 (Ca(OH)₂, CHX, BaSO₄) alcançou o valor de 2,5 mm/Al, não atingindo o valor mínimo recomendado, cabe-se então, um futuro estudo para analisar uma possível interferência de outros componentes, ou a falta do uso de mixer na mistura dos componentes que possam ter determinado tais resultados da Pasta Experimental F1.

Para fins de avaliação da citotoxicidade das pastas estudadas, O ensaio colorimétrico MTT foi utilizado, o qual é amplamente utilizado para avaliar a citotoxicidade de materiais, e é usado rotineiramente para testar materiais obturadores em cultura de células sistemas (ZHOU *et al.*, 2013). Como limitação, no

entanto, os ensaios MTT podem subestimar o dano celular e detectar a morte celular apenas na fase de apoptose, quando o metabolismo celular é substancialmente reduzido (WEI *et al.*, 2012). A principal vantagem do ensaio MTT sobre outros ensaios rápidos de corante, é que avalia a viabilidade e proliferação com base no estado funcional da célula mitocôndria. A versatilidade do ensaio MTT foi demonstrado em aplicações para a quantificação de linfocinas citotóxicas e inibidoras de crescimento e para o isolamento e caracterização de antiproliferativos anticorpos monoclonais dirigidos pela superfície celular. Esta versatilidade permite a diferenciação entre anticorpos monoclonais citostáticos e citotóxicos. Sua simplicidade, reprodutibilidade, economia e versatilidade tornar o ensaio MTT o mais vantajoso para testes de toxicidade e para aplicações de cultura de células de rotina (EDMONDSON, *et al.*, 1988). Neste estudo, as Pastas Experimentais F1 e F5 apresentaram ausência de citotoxicidade, apresentando resultado superior de viabilidade celular quando comparada a pasta comercial Calen® que também utiliza hidróxido de cálcio em sua composição. Os resultados das Pastas Experimentais F1 e F5 pode ser justificado pelos benefícios dos materiais a base de hidróxido de cálcio como a biocompatibilidade e as propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, estimulantes da formação de dentina esclerosada, de tecido ósseo mineralizado além de proteger a polpa contra estímulos termoelétricos e tóxicos

(LAVÔR, *et al.*, 2017). A clorexidina, outro componente utilizado na formulação da pasta experimental apresenta biocompatibilidade, não sendo irritante aos tecidos periapicais, além de possuir substantividade, isto é, tem efeito antimicrobiano residual (BONAN, *et al.*, 2011). A citotoxicidade do sulfato de neomicina *in vitro* foi avaliada, através do CCF as células que foram cultivadas em meio contendo diferentes concentrações de sulfato de neomicina e o número de células viáveis foram medidos. Os resultados indicam que o sulfato de neomicina, em doses de 100 a 1000 $\mu\text{mol/L}$, não afetam a atividade das células CCF, indicando que não há efeitos citotóxicos do sulfato de neomicina em baixas doses (SUN *et al.*, 2018). O sulfato de bário (BaSO_4) utilizado como radiopacificador neste estudo, é considerado um membro dos grupos de partículas pouco solúveis (PSP) ou de baixa toxicidade pouco solúvel (PSLT) (KONDURU, *et al.*, 2014). Este radiopacificador já é utilizado em materiais obturadores utilizado na dentição decídua (Loureiro *et al.*, 2018).

Em comparação com as pastas já comercializadas para obturação de dentes decíduos, um estudo de SILVA *et al.*, 2010 avaliou a resposta dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães após o preenchimento de canais radiculares com diferentes materiais, pode-se observar que no grupo formado por Óxido de Zinco e Eugenol (OZE) apresentou região periapical alterada e espessamento do ligamento periodontal com presença de células

inflamatórias e edema. Huang, *et al.*, em 2002 compararam os efeitos de diferentes materiais utilizados em obturações primárias do canal radicular na viabilidade celular de linhagens celulares de osteosarcoma humano. Utilizando ensaio colorimétrico de brometo de tetrazólio (MTT) em linhas celulares de osteosarcoma humanas, observou-se o OZE apresentou a menor taxa de sobrevivência. Ainda Pires *et al.*, em 2016 avaliaram a citotoxicidade através do ensaio MTT das pastas à base de hidróxido de cálcio e óxido de zinco (OZ) em dois grupos com diferentes formulações e com dois veículos viscosos (Calen®/OZ e CH/OZ). Os extratos das pastas de hidróxido de cálcio causaram um aumento significativo na viabilidade celular em ambos períodos experimentais. Não há estudos que avaliem a citotoxicidade dessas mesmas formulações em culturas celulares; no entanto, a proliferação celular relacionada a essas pastas pode ser explicada por sua capacidade de induzir uma resposta inflamatória e favorecer o processo de reparo (NELSON FILHO *et al.* 1999). Estudos anteriores avaliando a citocompatibilidade no tecido subcutâneo de ratos demonstrou que a pasta Calen®/OZ é mais biocompatível do que a pasta de óxido de zinco eugenol (QUEIROZ *et al.* 2011). A pasta Calen® também oferece compatibilidade com tecidos (ANDOLFATTO *et al.* 2012). Assim, as pastas à base de hidróxido de cálcio podem ser consideradas adequadas e com ausência de citotoxicidade para uso na terapia pulpar de dentes decíduos.

No presente estudo não foi observada citotoxicidade em relação a pasta Guedes Pinto, segundo um estudo de MELLO MOURA *et al.*, 2011, a pasta de Guedes-Pinto (GPP), tornou-se o material de escolha para a terapia endodôntica de dentes decíduos na maioria das escolas de odontologia, no entanto alterações na proporção dos componentes podem modificar as propriedades biológicas e aumentar a sua toxicidade, isso pode justificar o fato de em alguns estudos a mesma se apresentar citotóxica e em outros não, pois podem ocorrer diferenças na hora de proporcionar os materiais, como em um estudo de LACATIVA, *et al.*, 2012, onde através da técnica de implante intra-ósseo, a pasta Guedes Pinto, um dos materiais mais utilizados na terapia pulpar em odontopediatria foi avaliada, e induziu pouca ou nenhuma inflamação no período de observação de quatro semanas, e apresentou níveis aceitáveis de biocompatibilidade nos dois períodos analisados. Porém, em um estudo de SOEKANTO *et al.*, 1996, avaliou a toxicidade paramonoclorofenol canforado (componente da pasta Guedes-Pinto), e outros componentes, confirmou a citotoxicidade do PMCC em relação aos demais. Por fim, um estudo de CERQUEIRA *et al.*, 2007, apresentou uma análise de cada componente da Pasta Guedes Pinto separadamente, onde o PMCC foi considerado o mais citotóxico em comparação com os outros componentes, o que de certa maneira, pode representar um efeito adverso da utilização desta pasta na terapia

endodôntica para dentes decíduos, principalmente quando a técnica tende a ser executada a critério de cada profissional.

Para fins de análise de ação antimicrobiana, o *E. faecalis* foi a espécie bacteriana de escolha para esse experimento, sendo um microorganismo oportunista anaeróbico facultativo gram-positivo e altamente prevalente em casos de insucesso endodôntico. É um microrganismo de fácil cultivo, pois não necessita de cuidados especiais para o seu crescimento e já foi usado em estudos anteriores. (NAGESHWAR RAO *et al.*, 2004). O *E. faecalis* é capaz de sobreviver em um ambiente com escassa disponibilidade de nutrientes e comensalidade mínima com outras bactérias. (SUNDQVIST, *et al.*, 1998) Apresenta diferentes mecanismos de virulência e resistência, que dificultam sua erradicação dos canais radiculares. Uma importante proteína de ligação ao colágeno dos componentes da superfície microbiana de *E. faecalis* é a ACE, que está relacionado à sua capacidade de invadir os túbulos dentinários e aderir às paredes do canal radicular. (LOVE *et al.*, 2001). A resistência do *E. faecalis* à ação dos instrumentos endodônticos e às substâncias irrigadoras, deve-se à capacidade de resistir a ambientes alcalinos (devido a sua bomba de prótons que permite acidificar o citoplasma bacteriano); sobreviver em ambientes aeróbios e anaeróbios; se adaptar as diversas necessidades nutricionais; formar biofilme; além de possuir fatores de virulência e aderência ao colágeno dentinário, tornando-o o

principal microrganismo presente em infecções endodônticas persistentes (NACIF; ALVES, 2010; ESTRELA *et al.*, 2010

Os protocolos usados para os ensaios de difusão em ágar-poço são definidos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (CLSI, 2009). O teste de difusão em ágar, permite a observação de zonas de inibição adjacentes aos poços que contêm o agente antimicrobiano, que podem estar relacionadas ao seu efeito. (ESTRELA, 2000). O tamanho da zona de inibição estará diretamente relacionado à solubilidade e a difusibilidade da substância testada. (SIQUEIRA JR, *et al*, 1998; ESTRELA, 2000). Este método foi utilizado no presente estudo, por ser utilizado para patógenos aeróbicos de crescimento rápido e considerado o melhor método para testes de susceptibilidade de rotina, tendo boa reprodutibilidade, baixo teor de inibidores que possam afetar os resultados e grande disponibilidade de dados de experiências, sendo padrão para este tipo de experimento (REIS, 2020). Também apresentam a vantagem de possuir inibição e controle do crescimento (fora da zona inibitória) de organismos fastidiosos na mesma placa (BOYANOVA, 2003).

Para o teste de ação antimicrobiana através da contagem de UFC, seguiu-se a metodologia proposta por ANDRADE *et al.*, 2015, que sugeriu uma modificação no período de contaminação dos canais radiculares, onde os canais foram contaminados pelo período de 10 dias que visa garantir maior precisão dos resultados,

principalmente evitar falsos negativos devido a falhas contaminação. O *E. faecalis* é uma espécie de bactéria anaeróbia facultativa gram-positiva. Ele é um dos microrganismos mais resistentes ao Ca(OH)_2 do sistema de canais radiculares. Embora compreenda infecções endodônticas, as mudanças ambientais podem ser vantajosas para *E. faecalis*, resultando em infecções persistentes (SAATCHI *et al.*, 2014). Este microrganismo foi escolhido devido à sua capacidade de penetrar nos túbulos dentinários (RAN *et al.*, 2015) e colonizar o sistema radicular em formato de biofilme (GUERREIRO-TANOMARU *et al.*, 2013). No entanto, não há consenso na literatura sobre o tempo necessário para que este crescimento bacteriano ocorra para testar a eficácia dos protocolos de descontaminação, variando até 50 dias (GRUNDLING *et al.*, 2011). De acordo com um estudo anterior, 5 dias é um período suficiente para a formação do biofilme de *E. faecalis* na dentina (ANDRADE *et al.*, 2015). Por esse motivo, um período de cultura de 10 dias foi adotado no presente estudo, permitindo o crescimento bacteriano e garantindo que os protocolos de descontaminação pudessem ser adequadamente testados.

Estudos anteriores onde Haapasalo e Orstavik¹⁰ em 1987, revolucionaram o estudo de substâncias antimicrobianas introduzindo um novo protocolo para contaminação dentinária onde o período de contaminação *E. faecalis* foi 21 dias, seguido de

avaliação com MEV e coloração de Brown e Brenn. Para testes de medicação, as amostras foram infectadas por três semanas. Este procedimento rapidamente se tornou o método de escolha para a avaliação de substâncias e tratamento protocolos em endodontia. Esses mesmos autores modificaram seu protocolo tempo depois, usando períodos de contaminação de 14 dias. Este protocolo modificado foi eficaz para todos os microrganismos testados, com tempos diferentes de contaminação, e o *E. faecalis* infectou rapidamente todo o comprimento dos túbulos. Comparado a esses estudos, o estudo de ANDRADE *et al.*, 2015 mostrou que o novo método para a contaminação intratubular da dentina bovina é superior aos protocolos de contaminação relatados anteriormente (MA *et al.*, 2011) e isso foi demonstrado tanto por análises subjetivas de pontuação quanto pela comparação quantitativa do biovolume de bactérias vivas e mortas dentro dos túbulos dentinários (ANDRADE *et al.*, 2015).

Ao analisar a ação antimicrobiana dos materiais testados neste estudo, o cimento de óxido de zinco-eugenol (OZE), que tem sido usado há muito tempo como um material obturador de canal radicular para dentes decíduos, tem demonstrado nos estudos não pode ser considerado um bom material obturador de canal radicular ideal, pois tende a ser reabsorvido em um ritmo mais lento do que as raízes dos dentes decíduos e apresenta ação antimicrobiana limitada e (BARJA-FIDALGO, 2011), o que também foi

observado em nosso estudo, onde a pasta OZE foi estatisticamente inferior as Pasta Experimental F5, que obteve a maior média de halo inibitório, demonstrando a pouca eficácia deste material quanto a ação antimicrobiana, importante propriedade para controle da infecção de canais radiculares na dentição decídua. Além disso, a pasta OZE apresenta várias desvantagens, tais como baixa taxa de reabsorção, causando irritação na área periapical, necrose óssea e em alguns casos quando extravasada aos tecidos periapicais, pode estar relacionada a deslocamento do germe do dente permanente (NAJJAR, 2019).

No Brasil, o material obturador de canal radicular mais utilizado para dentes decíduos é a pasta de Guedes Pinto, composta por iodofórmio, Rifocort e paramonoclorofenol canforado (PMCC). Embora a pasta reúna vários requisitos para ser considerada um material obturador endodôntico adequado para dentes decíduos, as limitações ao seu uso incluem a necessidade de manipulação antes de seu uso e as dificuldades relacionadas à sua inserção no canal radicular (MARQUES, 2020). Além disso, um de seus componentes, a pomada Rifocort®, foi retirado do mercado, restringindo o uso atual dessa pasta (ANTONIAZZI *et al.*, 2015). Em relação à manipulação da pasta, tem-se uma desvantagem, pois diferentes clínicos podem alterar a concentração de cada parte, principalmente pelos diferentes aspectos físicos de cada componente (líquido, pó e pomada). Este fato pode alterar as

propriedades biológicas da pasta, podendo afetar o desempenho clínico, interferir na ação antimicrobiana e ainda aumentar a toxicidade. Isso pode ajudar a explicar os resultados do presente estudo, onde a Pasta Guedes-Pinto apresentou resultados inferiores de ação antimicrobiana quando comparada principalmente à Pasta Experimental F5 que obteve a maior média de halo de inibição do estudo, no entanto no teste de ação antimicrobiana através de UFC's, não apresentou significância estatística quando comparadas entre si.

Quanto à pasta Calen®, composta basicamente de hidróxido de cálcio, observou-se em uma revisão crítica da literatura que as propriedades físico-químicas do hidróxido de cálcio podem limitar sua efetividade na desinfecção do sistema de canais radiculares. O $\text{Ca}(\text{OH})_2$ tem um grande valor em endodontia, sendo indicado para várias condições clínicas, porém, não é uma medicação eficaz contra todas as espécies bacterianas encontradas nas infecções radiculares, e suas propriedades físico-químicas podem limitar sua eficácia na desinfecção de todo o sistema de canais radiculares a curto prazo (SIQUEIRA *et al.*, 1997). Em relação ao nosso estudo na análise da ação antimicrobiana a pasta Calen®, a base de hidróxido de cálcio como as formulações testadas, teve resultados inferiores as Pastas F1 e F5, demonstrando pouca ação antimicrobiana no teste de halo inibitório. Dessa forma, justifica-se a sugestão de associações de medicamentos ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$

objetivando aumentar a atividade antimicrobiana (SIQUEIRA & LOPES, 1999). No presente estudo, testamos essa associação entre o Ca(OH)_2 e CHX, onde a Pasta Experimental F5 além do Ca(OH)_2 , CHX e Sulfato de Bário, foi adicionado o agente antibiótico Sulfato de Neomicina, apresentando significativa redução de *E. faecalis* tanto no teste de ação antimicrobiana por halo inibitório quanto no teste de contagem de UFC's. Esses dados corroboram com o estudo de Souza *et al.*, 202, onde os grupos que adicionaram 2% de CHX ao Ca(OH)_2 apresentaram maior redução de *E. faecalis*. Da mesma forma, Ghabraei *et al.*, 2018 que realizou um estudo *in vitro* em dentes humanos contaminados com *E. faecalis* com o objetivo de determinar e comparar o período mais curto necessário para o Ca(OH)_2 + CHX 2%, para eliminar o biofilme de *E. faecalis* do interior dos canais radiculares, o estudo concluiu que a associação de Ca(OH)_2 + CHX 2%, pode eliminar o biofilme de *E. faecalis* em 3 dias e que o tempo mínimo de permanência destes deve ser de pelo menos 3 dias nos canais radiculares.

Ainda outros estudos realizados em dentina bovina e dentina humana, demonstraram que o gel de CHX 2% foi a substância mais eficaz contra *E. faecalis*, seguido pela associação de Ca(OH)_2 + CHX, e por último o hidróxido de cálcio utilizado isoladamente (MOHAMMADI; SHALAVI, 2012), reforçando o uso dessa associação em nosso estudo. O mecanismo antimicrobiano da CHX

que ocorre pela interação entre Moléculas (carregadas positivamente) e parede celular das bactérias (carregada negativamente) induzindo alterações no equilíbrio osmótico celular, resultando na precipitação do conteúdo citoplasmático e a morte de microrganismos (BASRANI *et al.*, 2003). Essa interação pode explicar a forma a atividade antimicrobiana das medicações intracanalais que utilizam CHX. A associação entre $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e CHX pode ser benéfica pois a mesma pode gerar espécies reativas de oxigênio em excesso, o que potencialmente pode levar a morte de vários patógenos do canal radicular, e além disso também foi demonstrado que o pH do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ não se altera com esta combinação (MOHAMMADI; SHALAVI, 2012), o que veio a ser confirmado neste estudo.

Por fim, justifica-se a importância deste estudo devido a necessidade atual de buscar novas alternativas a pastas para obturação de canais radiculares de dentes decíduos que preencham os requisitos necessários de um material ideal para esta finalidade. Este estudo apresenta uma grande relevância clínica pois busca uma nova alternativa para obturação de canais radiculares de dentes decíduos, principalmente pensando na otimização do processo, uma vez que a proposta da Pasta Experimental é que ela seja disponibilizada pronta para uso. Mais estudos são necessários para que a Pasta Experimental possa ser utilizada em humanos.

9. CONCLUSÃO

Diante das limitações do presente estudo, pode-se concluir que a Pasta Experimental F5 (Ca (OH)₂, CHX, BaSO₄ e Sulfato de Neomicina) foi a que obteve melhores resultados nos testes executados e mostra-se promissora onde apresentou melhores resultados nos testes de pH, radiopacidade, espalhabilidade, citotoxicidade e ação antimicrobiana realizados. Foi observada a manutenção das suas características físicas através dos testes de pH, que se manteve estável e alcalino, no teste de espalhabilidade não foi observada diferença estatística quando comparada a Pasta comercial Calen®. Apresentou excelente resultado de radiopacidade, não se mostrou citotóxica e teve boa ação antimicrobiana contra *E. faecalis*.

Torna-se necessário que mais estudos sejam realizados para avaliar outras propriedades importantes no desenvolvimento de uma nova formulação, pois, previamente ao uso de novas pastas obturadoras nos canais radiculares de seres humanos, estudos de laboratório devem ser realizados para determinar os seus benefícios e consequências, bem como estudos *in vivo* desta nova Pastas Experimental.

Referências

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ODONTOPEDIATRIA. Terapia Pulpar em dentes decíduos. In.: Associação Brasileira de Odontopediatria. Diretrizes Para Procedimentos Clínicos Em Odontopediatria. Rio de Janeiro; p.185-202, 2020.
2. ALMEIDA, L. C.; SILVA, C. D.; COUTO, B. S. Avaliação da qualidade de formulações magistrais fotoprotetoras géis-creme comercializadas na região centrooeste de Minas Gerais. *Revista Conexão Ciência I*, v. 15, n. 3, 2020.
3. ALLEN- JR, L.V., POPO-VICH, N.G., ANSEL, H.C Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos [recurso eletrônico], [tradução: Elenara Lemos-Senna ... et al.]; revisão técnica: Elenara Lemos-Senna. – 9. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: Artmed, 2013.
4. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY. Guideline on pulp therapy of primary and Young permanente teeth. *Pediatric Dent.* v.30 n. 7 Suppl., p.170-174 2008-2009.
5. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY, Guideline on pulp therapy for primary and young permanent teeth. *Pediatric Dentistry*, v. 39, p. 325-33, 2017-2018.
6. AMORIM, L.D.E. F.; TOLEDO, O. A.; ESTRELA, C. R.; DECURCIO D. A.; Antimicrobial analysis of different root canal filling pastes used in pediatric dentistry by two

- experimental methods. *Braz Dent J.* v. 17, n. 4, p. 317-22, 2006.
7. ANDRADE, F.B.; ARIAS, M.P.; MALIZA, A.G.A.; DUARTE, M.A.H.; GRAEFF, M.S.Z.; AMOROSO-SILVA, P.A.; MIDENA, R.Z.; MORAES, I.G. A new improved protocol for in vitro intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *J Appl Oral Sci*, v.23, n.6, p.591-8, 2015.
 8. ANONYMOUS. Final report on the safety assessment of hydroxyethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, methyl cellulose, hydroxypropyl methylcellulose and cellulose gum. *J Am Coll Toxicol* v.5, n.3, p. 1-60, 1986.
 9. ANTONIAZZI, B. F.; PIRES, C. W.; BRESOLIN, C. R.; WEISS, R. N.; PRAETZEL, J. R. Antimicrobial activity of different filling pastes for deciduous tooth treatment. *Braz Oral Res.* v. 29, p. 1-6, 2015.
 10. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANTIÁRIA. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. -- 1. ed. -- Brasília: ANVISA, 2004. 52 p.; 20 x 27 cm. -- (Série Qualidade em Cosméticos ; v. 1)
 11. AQUALON. Technical literature: Klucel hydroxypropylcellulose summary of toxicological investigations, 2004.
 12. BAGHERIAN, A.; KALHORI, K.A.M.; SADEGHI, M.; S.; MIRHOSSEINI, F.; IMAN, P. An in vitro study of root and canal morphology of human deciduous molars in na Iranian population. *Journal Of Oral Science.* v. 52, n.3, p.397-403, 2010.

13. BARBIN, L.E., SAQUY, P.C., GUEDES, D.F.C., SOUSA-NETO, M.D., ESTRELA, C., PÉCOR, J.D. Determination of para-Chloroaniline and Reactive Oxygen Species in Chlorhexidine and Chlorhexidine Associated with Calcium Hydroxide. *J Endod* v.34, p.1508-14, 2008.
14. BARCELOS, R.; SANTOS, M.P.A.; LUIZ R.R.; PRIMO, L.G.; MAIA, L.C. ZOE paste pulpectomies outcome in primary teeth: a systematic review. *J Clin Pediatr Dent* 2011; In press.
15. BARJA-FIDALGO, F.; MOUTINHO-RIBEIRO, M.; OLIVEIRA, M.A. DE OLIVEIRA B.H. A systematic review of root canal filling materials for deciduous teeth: is there an alternative for zinc oxide-eugenol? *ISRN Dentistry*, v.2011, p.1-7, 2011.
16. BARRETO, S.S., LUISI, S.B., FACHIN, E.V.F. Importância da dissociação dos íons cálcio e hidroxila de pastas de hidróxido de cálcio. *Rev. de Clín. Pesq. Odontol.*, v.1, n.4, abr./jun. 2005.
17. BASRANI, B., TJADERHANE L., SANTOS J.M., PASCON, E., GRADH. LAWRENCE, H.P., FRIEDMAN, S. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide- containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. v.96, p. 618-24, 2003.
18. BASRANI, B., GHANEM, A., TJADERHANE, L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. *J Endod*. v.6, n.30, p. 413-418, 2004.

19. BERGOLI, A.D.; PRIMOSCH R.E.; ARAUJO F.B.; ARDENGHI T.M.; CASAGRANDE L. Pulp therapy in primary teeth--profile of teaching in Brazilian dental schools. *J Clin Pediatr Dent*, v.35, n.2, p.191-5, 2010 Winter.
20. BERTOL, C.D.; CRUZ, A.P.; STULZER, H.K.; MURAKAMI, F.S.; SILVA, M.A.S. Thermal decomposition kinetics and compatibility studies of primaquine under isothermal and non-isothermal conditions. *J Therm Anal Calorim*, v.102, p. 187-192, 2010.
21. BONAN, R.F.; BATISTA, A.U.D.; HUSSNE, R.P.; Comparison of The Use of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine as an Irrigant Solution in Endodontic Treatment: a Review of Literature. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. v. 15, n. 2, p. 237-244, 2011.
22. BOSSO-MARTELO, R., GUERREIRO-TANOMARU, J.M., VIAPIANA, R., BERBERT, F.L.C.V., BERBARDI, M.I.B., TANOMARU-FILHO, M. Calcium SilicateBased Cements Associated with Micro- and Nanoparticle Radiopacifiers: Physicochemical Properties and Bioactivity. *International Scholarly Research Notice* p.1-7, 2015.
23. BOTTON, G.; PIRES, C.W.; CADONÁ, F.C.; MACHADO, A.K.; AZZOLIN, V.F.; CRUZ, I.B.; SAGRILLO, M.R.; PRAETZEL, J.R.; Toxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used in pulpectomy of primary teeth. *International Endodontic Journal*. v. 49, n. 8, p. 746-754, 2016.
24. BOYANOVA, L., DEREJIAN, S., KOUMANOVA, R., et al. Inhibition of Helicobacter pylori growth in vitro by

- Bulgarian propolis: preliminary report. *J Med Microbiol.* v. 52, n. 5, p. 417-419, 2003.
25. CARDOSO, L.; ZEMBRUSKI, C.; FERNANDES, D.S.C.; BOFF, I.; PESSIN, V. Avaliação da prevalência de perdas precoces de molares decíduos. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, João Pessoa, v. 5, n. 1, p. 17-22, jan. / abr., 2005.
 26. CASSOL, D.V.; DUARTE, M.L.; PINTOR, A.B.V.; BARCELOS, R.; PRIMO, L.G. Iodoform vs calcium hydroxide/zinc oxide based pastes: 12-month findings of a randomized controlled trial. *Braz. Oral Res.* v.33, e002, 2019.
 27. CHABNER, B., L., KOLMANN, B. Goodman and Gillman's: The Pharmaceutical Basis of Therapeutics. Twelfth Edition. *McGraw Hill Medical, New York, NY.* p.1527, 2011.
 28. CHANG, Y.C.; TAI, K.W.; CHOU, L.S.; CHOU, M.Y. Effects of camphorated parachlorophenol on human periodontal ligament cells in vitro. *Journal of Endodontics.* v. 25, n. 12, p. 779-781, 1999.
COLLINS, C.H.; BONATO, P.S. *Fundamentos de cromatografia.* Campinas: Editora da UNICAMP, ed.1, 2006.
 29. CORRÊA, M. A. *Apostila de Cosmetologia..* Curso de Cosmetologia ministrado na Associação Farmacêutica de Ribeirão Preto (AFARP), p. 2-6, 11, 22, 23, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 38-42, 63, 73, 75-84, 94, 97, 99, 101, 120, 129, 130, 131, 149, 150, Ribeirão Preto, 2005.
 30. COX, JR S.T.; HEMBREE, JR. J.H.; MCKNIGHT, J.P. The bactericidal potential of various endodontic materials

for primary teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. v.45, n. 6, p. 947-954, June 1978.

31. DIANAT, O.; SAEDI, S.; KAZEM, M.; ALAM, M.; et al. Antimicrobial Activity of Nanoparticle Calcium Hydroxide against *Enterococcus Faecalis*: An In Vitro Study. *Iran Endod J*. v. 10, n.1, p. 39-43, 2015.
32. DUARTE, M. A. H., DEMARCHI, A. C. C. O., YAMASHITA, J. C., KUGA, M. C. DE CAMPOS FRAGA, S. pH and calcium ion release of 2 root end filling materials. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, v. 95, n. 3, p. 345–347, 2003.
33. DUARTE, M. A.H.; DE OLIVEIRA, E. K.; GUÂNİARA, Et al. Radiopacity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. *Journal of Endodontics*, v. 35, n.5, p.737-740, 2009.
34. DUARTE, M.A.H., MINOTTI, P.G., RODRIGUES, CT., ZAPATA, R.O., BRAMANTE, C.M., TANOMARU-FILHO, M., et al. Effect of different radiopacifying on the physicochemical properties of white Portland cement and white mineral trioxide aggregate. *J Endod*. v.38, n.3, p.394-7, 2012a.
35. DUNSTON B.; COLL J. A. A Survey of Primary Tooth Pulp Therapy as Taught in US Dental Schools and Practiced by Diplomates of the American Board of Pediatric Dentistry. *Pediatric Dentistry*. v.30, n.1, p.42-48, Jan./ Fev., 2008.
36. EDMONDSON, J.M.; ARMSTRONG, L.S.; MARTINEZ, A.O.; A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity

in monolayer cultures. *Journal of Tissue Culture Methods*. v. 11, p. 15–17, 1988.

37. ESTRELA C.; SYDNEY G.B.; BAMMANN, L.L.; FELIPPE Jr., O. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. *Rev. Fac. Odontol. Bauru*, v. 2, n.4, p. 29-36, 1994.
38. ESTRELA, C.; PESCE H.F. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide pastes in the presence of connective tissue of the dog. Part I. *Braz. Dent. J.*, v.7, n.1, p.41-46, 1996.
39. ESTRELA C.; LOPES H.P.; FELIPPE Jr., O. Chemical study of calcium carbonate present in various calcium hydroxide samples. *Braz. Endod. J.*, v.2, n.2, 1997. (in press).
40. ESTRELA C, PÉCORA J.D., SOUZA-NETO M.D., ESTRELA CRA, BAMMANN LL. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide pastes. *Braz Dent J*. v10, p.63-72, 1999.
41. ESTRELA C.; BAMMANN L.L.; ESTRELA C. R. A.; SILVA R. S.; PECORA J. D. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J*. v.11, n.1, p.3-9, 2000.
42. FERRAZ C.C.; GOMES B.P.; ZAIA A.A.; TEIXEIRA F.B.; SOUZA-FILHO, F.J. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod*, v. 27, p. 452-5, 2001.
43. FERREIRA, F.V.; ANGONESE, M.P.; FRIEDRICH, H.C.; WEISSR.D.N.; FRIEDRICH, R.S.; PRAETZEL, J.R.

- Antimicrobial action of root canal filling pastes used in deciduous teeth. *Revista Odonto Ciências*. v.25, n.1, p. 65-68, 2010.
44. FUKS, A. B. Vital Pulp Therapy With New Materials For Primary Teeth: New Directions And Treatment Perspectives. *Journal Of Endodontics*, v.34, n.7S, p.18-24, JULY 2008.
 45. GOMES, B. P. F. de A., VIANNA, M. E., SENA, N. T., ZAIA, A. A., FERRAZ, C. C. R., SIUZA FILHO, F., J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. v.102, n.4, p 544-50, 2006.
 46. GOMES, A. L. C., SALLES, L. P., DA PAZ, M., J. A.C., CIRELLI, J. M., GUERREIROTANOMARU, JM., TANOMARU FILHO, M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study, *Journal of Endodontics*, v. 37, n. 2, p. 203–210, 2011.
 47. GREENSTEIN, G., BERMAN, C., JAFFIN R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Period*. V.57, p. 370-7, 1986.
 48. GUEDES-PINTO, A.C.; ISSAO, M.; PRADO, C. Desenvolvimento da dentição mista. In: GUEDES-PINTO, A.C. *Odontopediatria*. 6 ed. São Paulo: Santos, 1997.
 49. GUEDES, R.S.; ARDENGHI, T.M.; PIOVESAN, C.; EMMANUELLI B.; MENDES, F.M.; Influence of initial caries lesions on quality of life in preschool children: a 2-

- year cohort study. *Community Dent Oral Epidemiol* v.44, n.3, p.292-300, Jun., 2016.
50. GUERREIRO-TANOMARU, J.M., CORNÉLIO, A.L.G., ANDOLFATTO, C., SALLES, L.P., TANOMARU-FILHO, M. pH and Antimicrobial Activity of Portland Cement Associated with Different Radiopacifying Agents. *International Scholarly Research Network ISRN Dentistry*. v.12, Article ID 469019, 5 pages, 2012.
51. GUIA DE CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS COSMÉTICOS – Editora ANVISA, 2008 – Disponível em: https://www.crq4.org.br/downloads/guia_cosmetico.pdf
52. GUO, J.J.; QIU, L.H.; YU, Y.Q.; XU, L.Y.; FAN, Y.Q.; ZHONG, M.; Effect of Ca(OH)₂ on the cytotoxicity of lipopolysaccharide extracted from *Porphyromonas endodontalis* in vitro. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. v. 23, n.1, p. 30-34, 2014.
53. HAGIWARA, M.; WATANABE, E.; BARRETT, J.C.; TSUTSUI, T.; Assessment of genotoxicity of 14 chemical agents used in dental practice: ability to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. *Mutation Research*. v. 603, n. 2, p. 111-120, 2006.
54. HARINI, M.; BHAT, S.S.; SUNDEEP, H. K. Comparative evaluation of bactericidal potential of four root canal filling materials against microflora of infected non-vital primary teeth. *J Clin Pediatr Dent*. v. 35, n. 1, p. 23-9, 2010.
55. HUANG, F.M.; TAI, K.W.; CHOU, M.Y.; CHANG, Y.C.; Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal

- ligament cells and permanent V79 cells. *International Endodontic Journal*. v. 35, n.2, p. 153-158, 2002.
56. ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 29, n.1, p. 81-96, 2008.
57. JHAMB, S.; NIKHIL, V.; SINGH, V. An in vitro study of antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *Indian J Dent Res*. v. 21, n. 4, p. 512-4, 2010.
58. JUNG-WEI, CHEN & MONSERRAT, JORDEN. Materials for primary tooth Pulp treatment: the present and the future. *Endodontic Topics*. v.23, p. 41-49, 2012.
59. KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. Farmacologia básica e clínica [recurso eletrônico] / [tradução: Ademar Valadares Fonseca ... et al.; revisão técnica: Almir Lourenço da Fonseca]. – 13. ed. Porto Alegre: AMGH, 2017.
60. KONDURU, N.; KELLER, J.; MA-HOCK, L.; GROTERS, S.; LANDSIEDEL, R.; DONAGHEY, T.C.; Biokinetics and effects of barium sulfate nanoparticles. *Particle and Fibre Technology*. v.11, n.1, 2014.
61. KONJHODZIC-PRCIC, A.; JAKUPOVIC, S.; HASIC-BRANKOVIC, L.; VUKOVIC, A.; Evaluation of Biocompatibility of Root Canal Sealers on L929 Fibroblasts with Multiscan EX Spectrophotometer. *Acta Informatica Medica*. v. 23, n.3, p. 135-137, 2015.

62. KORYTNICKI, D.; NASPITZ, N.; FALTIN JÚNIOR, K. Conseqüências e tratamento das perdas precoces de dentes decíduos. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.*, v. 48, n.3, p. 1323-29, Maio/Jun., 1994.
63. KUBOTA, K.; GOLDEN, B.E.; PENUGONDA, B. Root canal filling materials for primary teeth: a review of the literature. *ASDC J Dent Child*, v.59, n.3, p.225-7, May-Jun.,1992.
64. KRAMER, P.F.; FARACO JUNIOR, I.M.; FELDENS, C.A. Estado atual da terapia pulpar nas Universidades Brasileiras - Pulpotomia e pulpectomia em dentes decíduos. *J Bras Odontopediatr Odontol Bebê*, v.3, n.3, p.222-230, 2000.
65. LACATIVA, A.M.; LOYOLA, AM.; SOUSA, C.J.; Histological evaluation of boné response to pediatric endodontic pastes: an experimental study in guinea pig. *Brazilian Dental Journal*. v. 23, n.6, p. 635-644, 2012.
66. LARA, V.P.L.; CARDOSO F.P.; BRITO, L.C.; VIEIRA L.Q.; SOBRINHO, A.P.; REZENDE, T.M..Experimental Furcal Perforation Treated with MTA: Analysis of the Cytokine Expression. *Braz Dent J*. v.26, n.4, p. 337-41, Jul Aug., 2015.
67. LAVÔR, M.L.T.; SILVA, E.L.; VASCONCELOS, M.G.; VASCONCELOS, R.G.; Use of calcium hydroxide and mta in dentistry: concepts, rationale and clinical practice. *Rev. Salusvita (Online)*. v. 36, n. 1, p. 99-121, 2017.
68. LEYHAUSEN, G., HEIL, J., REIFFERSCHIED, G., WALDMANN, P., GEURTSSEN, W. Genotoxicity and citotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealer AH plus. *J Endod*. v.25, n.2, p. 10-13, 199.

69. LEONARDO, M.R., DA SILVA, L.A., ASSED S., TANOMARU-FILHO, M., BONIFACIO, K.C., ITO, I.Y. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *J Endod.* V. 26, p.391-4, 2000.
70. LEWIS, R.J, ed. Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 11th edn. New York: Wiley, 2004; 1980.
71. LIMA, R.A.; CARVALHO, C.B.; RIBEIRO, T.R.; FONTELES, C.S. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol on infected primary molars: a split-mouth randomized clinical trial. *Quintessence International.* v. 44, n. 2, p. 113-122, 2013.
72. LIN, Y. H.; MICKEL, A. K.; CHOGLE, S. Effectiveness of selected materials Against *Enterococcus faecalis*: part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* v, 29, n. 9, p. 565-6, 2003.
73. LINDSKOG, S., PIERCE, A.M., BLOMLOF, L. Chlorhexidine as a root canal medicament for treating inflammatory lesions in the periodontal space. *Endod Dent Traumatol.* 1998; 14: 186-90.
74. LLAMAS, R.; SEGURA, J.J.; JIMÉNEZ-RUBIO, A.; JIMÉNEZ-PLANAS, A. In vitro effect of parachlorophenol and camphorated parachlorophenol on macrophages. *Journal of Endodontics.* v. 23, n.12, p. 728-730, 1997.
75. LODIENE, G.; KLEIVMYR, M.; BRUZELL E.; ØRSTAVIK, D. Sealing ability of mineral trioxide aggregate, glass ionomer cement and composite resin

- when repairing large furcal perforations. *British Dental Journal*. v210, n.5, E7, Mar., 2011.
76. LOPES, H.P.; SIQUEIRA, J.F. *Endodontia: Biologia e Técnica*. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Ed. Medsi-Guanabara Koogan S. A., p. 964, 2004.
77. LOUREIRO, M. A. Z.; BARBOSA, M. G. CHAVES, S. G.; Et al. Pesquisa Avaliação da composição química e radiopacidade de diferentes pastas de hidróxido de cálcio. *Rev Odontol Bras Central*. v.27, n.80, p.19-23, 2018.
78. LUO, L., GU, C., LI, M., ZHENG, X., ZHENG, F. Determination of residual 4- nitrobenzaldehyde in chloramphenicol and its pharmaceutical formulation by HPLC with UV/V is detection after derivatization with 3-nitrophenylhydrazine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.156, p.307–312.2018.
79. MANI, S.A.; CHAWLA, H.S.; TEWARI, A.; GOYAL, A. Evaluation of calcium hydroxide and zinc oxide eugenol as root canal filling materials in primary teeth. *J Dent Child*, v.67, n.2, p.142-147, 2000.
80. MARCIANO, M.A., ESTRELA, C., MONDELLI, R.F., ORDINOLA-ZAPATA, R., DUARTE, M.A. Analysis of the color alteration and radiopacitypromoted by bismuth oxide in calcium silicate cement. *Braz Oral Res*. v.2, n.4, p.318-23, 2013.
81. MARTELLI, A.; MATTIOLI, F.; PASTORINO, G.; ROBBIANO, L.; ALLAVENA, A.; BRAMBILLA, G.; Genotoxicity testing of chloramphenicol in rodent and

- human cells. *Mutation Research*. v. 260, n.1, p. 65-72, 1991.
82. MASSARA, A. L. M.; TAVARES, F. L. W.; NORONHA, C. J.; *Et al.* A Eficácia do Hidróxido de Cálcio no Tratamento Endodôntico de Decíduos: Seis Anos de Avaliação. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. v.12, n.2, p.55-59, abr./jun., 2012.
83. MASS, E.; ZILBERMAN, U.L. Endodontic treatment of infected primary teeth, using Maisto's paste. *ASDC Journal of Dentistry for Children*, v.56, n.2, p.117- 20, 1989.
84. MELLO-MOURA, A.C.V.; FANARO, J.; NICOLETTI, M.A.; MENDES, F.M.; VANDERLEY, M.T.; GUEDES, A.C. Variability in the proportion of components of iodoformbased Guedes-Pinto paste mixed by dental students and pediatric dentists. *Indian Journal of Dental Research*, v.22, n.6, p. 781-5, 2011.
85. MOHAMMADI, Z.; ABBOTT, P.V. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J*, v. 42, p. 288–302, 2009.
86. MORTAZAVI M.; MESBAHI M. Comparison of zinc oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. *Int J Paediatr Dent*, v.14, n.6, p. 417-424, NOV., 2004.
87. MORETTO, H.-H., SCHULZE, M., WAGNER, G. *Silicones*. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (2000).

88. MOTA, C.C.B.O.; BRASIL C.M.V.; CARVALHO N.R.; BEATRICE L.C.S.; TEIXEIRA H.M.; DO NASCIMENTO A.B.L.; VICENTE SILVA C.H. Propriedades e aspectos biológicos do agregado trióxido mineral: revisão da literatura. *Rev Odontol UNESP, Araraquara*. V.39, n.1, p.49-54, JAN/FEV., 2010.
89. NAJJAR, R. S., ALAMOUDI, N. M., EL-HOUSSEINY, A. A., A comparison of calcium hydroxide/iodoform paste and zinc oxide eugenol as root filling materials for pulpectomy in primary teeth: A systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Dent Res*. v.5, n. 3, p. 294-310, 2019.
90. NOGUEIRA, J. A.S.; GILLET, A.V.M.; PARREIRA, E.B.; PEDREIRA, E.M.; ATHAYDE NETO, M.D.P. Perdas precoces de dentes decíduos e suas conseqüências para dentição futura elaboração de propostas preventivas. *Rev ABO Nacional*, São Paulo, v. 6, n. 4, p. 228-233, 1998.
91. OHNISHI, S.; MURATA, M.; IDA, N.; OIKAWA, S.; KAWANISHI, S.; Oxidative DNA damage induced by metabolites of chloramphenicol, an antibiotic drug. *Free Radical Research*, v. 49, n.9, p.1165-1172, 2015.
92. OOI, H. Y.; TEE, W. Y.; DAVAMANI, F.; NAGENDRABABU, V.; et al. Comparing the antimicrobial efficacy of pediocin with chlorhexidine and calcium hydroxide as intracanal medicaments against persistent root canal infections. *J Conserv Dent*. v. 22, n.3, p. 241-244, 2019.
93. O'NEIL, J. The Merck Index An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Cambridge, UK. *Royal Society of Chemistry* p.367, 2013.

94. PILOWNIC, K. J.; CARVALHO, C. N.; ROMANO, A. R.; MORGENTAL, R. D., et al. Antibiofilm Activity of Five Different Endodontic Filling Materials Used in Primary Teeth Using Confocal Laser Scanning Microscopy. *Pediatr Dent.* v. 39, n. 2, p. 45-149, 2017.
95. PINTO, D.N., DE SOUSA, D.L., ROCHA, R.B.A., MOREIRA-NETO, J.J.S. Eighteen-month clinical and radiographic evaluation of two root canal-filling materials in primary teeth with pulp necrosis secondary to trauma. *Dental Traumatology*, v.27, p. 221-224, 2011.
96. PIRES, CW.; BOTTON, G.; CADONÁ, FC.; MACHADO, AK.; AZZOLIN, VF.; CRUZ, IB.; SAGRILLO, MR.; PRAETZEL, JR.; Induction of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. *International Endodontic Journal.* v. 49, n.8, p. 737-745, 2016.
97. PIVA, F.; FARACO-JUNIOR, I.M.; FELDENS, C.A.; ESTRELA, C.R.A. Ação Antimicrobiana De Materiais Empregados Na Obtenção Dos Canais De Dentes Decíduos Por Meio Da Difusão Em Ágar: Estudo In Vitro. *Pesquisa Brasileira Em Odontopediatria E Clínica Integrada.* v.9, n.1, p.13-17, 2009.
98. PRAETZEL, J. R.; FERREIRA, F. V.; WEISS, R.N. Antimicrobial action of a filling paste used in pulp therapy in primary teeth under different storage conditions. *J Clin Pediatr Dent.* v. 33, n. 2, p. 113-6, 2008.
99. PRIYANKA, C.; GOVARDHAN, P. Tooth discolouration due to endodontic materials and procedures. *IOSR-JDMS*, v.9, n. 4, p.32-6, 2013.

100. QUEIROZ, A.M.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L.A.; ASSED, S.; SILVA, R.A.; ITO, I.Y. Antibacterial activity of root canal filling materials for primary teeth: zinc oxide and eugenol cement, Calen paste thickened with zinc oxide, Sealapex and EndoREZ. *Braz Dent J*, v. 20, p. 290-296, 2009.
101. QUEIROZ, A.M.; ASSED, S.; CONSOLARO, A.; NELSON-FILHO, P.; LEONARDO, M.R.; SILVA, R.A.; SILVA, R.A.B.; SILVA, L.A.B. subcutaneous connective tissue response to primary root canal filling materials. *Braz Dent J*. v.22, n.3, p.203-11, 2011.
102. RANLY, D.M.; GARCIA-GODOY, F. Reviewing pulp treatment for primary teeth. *J Am Dent Assoc*. v.122, n.9, p. 83-85, SEP.,1991. RANLY, D.M.; GARCIA-GODOY, F. Current and potential Pulp therapies for primary and young permanent teeth. *J Dent*. V.28, n.3, p. 153-61, MAR., 2000.
103. REZENDE, T.M.B.; RUIZ, P.A.; AMORIM, R.F.B.; CARVALHO, R.A. Aplicações terapêuticas do iodofórmio em endodontia. *Rev Bras Odontol*. v.59, n.4, p. 280-2, AGO., 2002.
104. REIS, B. S.; BARBOSA C.C.N.; SOARES, L.C.; BRUM, S.C.; BARBOSA, O.L.C.; MARQUES, M.M. Análise “*in vitro*” da atividade antimicrobiana da pasta ctz utilizada como material obturador na terapia pulpar de dentes decíduos. *Revista Pró-UniverSUS*. v.07, n.3, p.39-42, JUL./DEZ., 2016.
105. REIS, J., FIGUEIREDO, L., CASTORANI, G., et al. Evaluation of antimicrobial activity of essential oils against food pathogens. *Braz. J. Hea. Rev.*, Curitiba, v. 3, n. 1, p.342-363, 2020.

106. ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6th Edition, *Pharmaceutical Press*, 2009.
107. RUIZ, P. A.; ANDRADE, A. K. M.; SILVA, C. A. M. Medicação intracanal, 2002. Disponível em: <http://www.endodontia.org>.
108. SAGGAR, V.; CHANDRA, S.; JAISWAL, J. N.; SINGH, M. Antimicrobial efficacy of iodoformized zinc oxide-eugenol sealer on micro-organisms of root canal. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. v.9, n.1, p. 1-3, 1991.
109. SANTAMARIA, R.; INNES, N. Trial shows partial caries removal is na effective technique in primary molars. *Evid Based Dent*. v.15, n.3, p. 8-12, Sep., 2014.
110. SANTOS, NC.; RAMOS, ME.; RAMOS, AF.; CERQUEIRA, AB.; CERQUEIRA, EM.; Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity of filling pastes used for pulp therapy on deciduous teeth using the micronucleus test on bone marrow from mice (*Mus musculus*). *Mutagenesis*. v. 31, n.5, p. 589-595, 2016.
111. SEGATO, R.A., PUCINELLI, C.M., FERREIRA, D.C., DALDEGAN, A. de R., SILVA, R.S., NELSON-FILHO, P., SILVA, L.A. Physicochemical properties of root canal filling materials for primary teeth. *Braz Dent J*. v.27, p.196-201, 2016.
112. SIGNORETTI, F.G.C., GOMES, B.P.F.A., MONTAGNER, F. TOSELLO, F.B., JACINTO, R.C. Influence of 2% chlorhexidine gel on calcium hydroxide ionic dissociation and its ability of reducing endotoxin.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.
v.111, p.653-658, 2011.

113. SILVA, F. B da.; ALMEIDA, J. M de.; SOUSA, S. M. G de. Natural medicaments in endodontics – a comparative study of the anti-inflammatory action. *Braz Oral Res*, v.18, n.2, p.174-9, 2004.
114. SILVA, L.A.; LEONARDO, M.R.; OLIVEIRA, D.S.; SILVA, R.A.; QUEIROZ, A.M.; HERNÁNDEZ, P.G.; et al. Histopathological evaluation of root canal filling materials for primary teeth. *Braz Dent J*. v.21, n.1, p.38-45, Jan., 2010.
115. SOEKANTO, A.; KASUGAI, S.; MATAKI, S.; OHYA K.; OGURA, H.; Toxicity of camphorated phenol and camphorated parachlorophenol in dental pulp cell culture. *Journal of endodontics*. v. 22, n.6, p. 284-289, 1996.
116. SOUSA, N.B.; NUNES, M.A.C.; VELOSO, K.M.M.; PEREIRA, A.F.V. Agregado de trióxido mineral e uso como material retro-obturador em cirurgia paraendodôntica. *Rev. Bras. Odontol.*, Rio de Janeiro. v. 71, n. 2, p. 144-7, jul./dez. 2014.
117. SPOSITO, O. S. Análise de propriedades físico-químicas e biológicas de pasta obturadora composta por hidróxido de cálcio, óxido de zinco e gel de clorexidina 2%. *Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia*, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

118. STEFFENS, H., BRANDÃO, A.A., GUARIZAFILHO, O., GRÉGIO, A. M. T.; STEFFENS, J.P. Avaliação do potencial do cloranfenicol para induzir teratogenicamente o aparecimento de fissura palatina em ratos Wistar. *RSBO Revista Sul-Brasileira de Odontologia*. v. 7, n. 2, p. 154-158, 2010.
119. SWEETMAN S., ed. Martindale: The Complete Drug Reference, 36th edn. London: *Pharmaceutical Press*, p.2322, 2009.
120. SIQUEIRA, JR, J.F., LOPES, H.P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*. v.32, p. 361-69, 1999.
121. TANOMARU FILHO, M.; LEONARDO, MR.; SILVA LA.; ANÍBAL, FF.; FACCIOLI, LH.; Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *International Endodontic Journal*. v. 35, n.9, p. 735-739, 2002.
122. TANOMARU-FILHO, M., MORALES, V., DA SILVA, G.F., BOSSO, R., REIS, J.M.S.N., DUARTE, M.A.H., GUERREIRO-TANOMARU, J.M. Compressive Strength and Setting Time of MTA and Portland Cement Associated with Different Radiopacifying Agents. *International Scholarly Research Neotwork*. p.1-4, 2012.
123. TABRIZIZADEH, M.; RASTI, M.; AYATOLLAHI, F.; MOSSADEGH, M. H. et al. Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide and Betamethasone on *Enterococcus faecalis*; An in vitro Assessment. *Iran Endod J*. v. 10, n.3, p. 184-7, 2015.
124. TCHAOU, W.S.; TURNG, B.F.; MINAH, G.E.; COLL, J.A. Inhibition of pure cultures of oral bacteria by

- root canal filling materials. *Pediatr Dent.* v.18, p.444-49, 1996.
125. THOMAZ, A.M.; CHANDRA, S.; S.; PANDEY, R.K. Elimination of infection in pulpectomized deciduous teeth: A short-term study using iodoform paste. *J Endod.* v.20, n.5, p.233-235, Maio 1994.
126. THOSAR, N. R.; CHANDAK, M.; BHAT, M.; BASAK, S. Evaluation of Antimicrobial Activity of Two Endodontic Sealers: Zinc Oxide with Thyme Oil and Zinc Oxide Eugenol against Root Canal Microorganisms- An in vitro Study. *Int J Clin Pediatr Dent.* v. 11, n.2, p. 79-82, 2018.
127. VEIGA, W.K.A.A.; BRUNO, K.F.; PEREIRA, A.L.; *Et al.* Análise comparativa da radiopacidade de três cimentos endodônticos por meio de radiografia digital. *Odontol Bras Central.* v.26, n.79, p. 37-41, 2017.
128. VIAPIANA, R., FLUMIGNAN, D. L., GUERREIRO-TANOMARU, J. M. CAMILLER, J., TANOMARU-FILHO, M. Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *International Endodontic Journal.* v.47, p.437-448, 2014.
129. VOUZARA, T.; KOULAOUZIDOU, E.; ZIOUTI, F.; ECONOMIDES, N.; Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine. *International Endodontic Journal.* v. 49, n.8, p. 764-773, 2016.

130. WAKSMAN, S.A.; HUTCHISON, D.; KATZ, E.
Neomycin Activity upon Mycobacterium Tuberculosis
and Other Mycobacteria. *American Review of
Tuberculosis*, v.60, n.1, p. 78–89, 1949.
131. WIDBILLER, M.; ALTHUMAIRY, R.I.;
DIOGENES, A.; Direct and Indirect Effect of
Chlorhexidine on Survival of Stem Cells from the Apical
Papilla and Its Neutralization. *Journal of Endodontics*. v.45,
n.2, 156-160, 2019.
132. YAMAGUCHI, M.; NOIRI, Y.; ITOH, Y.;
KOMICHI, S.; YAGI, K.; UEMURA, R.; et al. Factors
that cause endodontic failures in general practices in Japan.
BMC Oral Health. v.18, n.1, p.70, ABR. 2018.
133. YUAN, L.; YU, J.; WANG, S.; HUANG, K.;
REN, X.; SUN, Y.; WU, X.; FENG, S. UVVIS.
Absorption shift of mixed valence state tungstate oxide:
Ca_{0,72}La_{0,28}WO₄. *Materials letters*. v.143, p.212-214,
2015.

ANEXOS

ANEXO 1 - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO/ VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - VRPPG/ UPF



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DE UMA NOVA PASTA DE PREENCHIMENTO EXPERIMENTAL PARA DENTES DECÍDUOS.

Pesquisador: Janessa Luiza Engelmann

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51718521.1.0000.5342

Instituição Proponente: Universidade de Passo Fundo/Vice-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.022.728

Apresentação do Projeto:

O sucesso do tratamento endodôntico em dentes decíduos depende de vários fatores que devem ser levados em consideração no momento da indicação do tratamento. Não existe na literatura uma concordância sobre uma técnica ou protocolo e material obturador ideal para ser aplicado na endodontia de dentes decíduos, bem como os materiais já existentes não preenchem todos os requisitos desejáveis para um material obturador satisfatório.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do estudo é elaborar a formulação de uma nova pasta de preenchimento experimental para dentes decíduos e avaliar a sua ação antimicrobiana.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores, por ser uma pesquisa que será realizada com dentes humanos extraídos obtidos de Biobanco os riscos são considerados mínimos pois esta fase do estudo não será feita com voluntários. Como benefício citam que a pasta a ser desenvolvida terá como pré-requisito ser biocompatível e não citotóxica, pronta para uso, de fácil aplicação, sem necessidade de manipulação na hora otimizando a obturação, uma etapa importante da endodontia de dentes decíduos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo experimental laboratorial com dentes humanos extraídos. Sessenta dentes

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo/Retorta 4 andar
Bairro: São José **CEP:** 99.052-900
UF: RS **Município:** PASSO FUNDO
Telefone: (54)3316-8157 **E-mail:** cep@upf.br