

Avaliação da eficácia de distintas preparações de hidróxido de cálcio sobre *Pseudomonas aeruginosa*

Flávia Moreira de Oliveira*
Sólton José de Oliveira*
Erick de Almeida Gonçalves*
Anamaria Pessoa Leite**
Priscila de Faria Pinto*

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno humano associado a casos de infecções reincidentes em canais radiculares. A antisepsia destes canais é uma dificuldade enfrentada no tratamento endodôntico. A clorexidina é um antibiótico introduzido há muito tempo na prática odontológica e ainda muito utilizado. A aplicação intracanal de pastas à base de Hidróxido de Cálcio (HC) tem sido um protocolo muito recomendado. O uso de veículos pode aumentar o espectro de atuação do HC e potencializar o seu poder antimicrobiano. Neste trabalho foi analisada a atividade antimicrobiana do HC através de distintos veículos como salina, glicerina e Paramonoclorocanforado (PMCC). A clorexidina foi usada como controle. A média de halos de inibição de HC com salina foi de $17,30 \pm 2,372$ (24 h) e $17,18 \pm 2,324$ (48h); para a glicerina $21,06 \pm 0,6794$ (24h) e $20,74 \pm 1,091$ (48 h); para o PMCC $36,70 \pm 1,875$ (24h) e $36,26 \pm 1,719$ (48h). A clorexidina não apresentou diferença estatística na média dos halos de inibição em relação às pastas formadas por HC com glicerina e salina. Já o HC associado ao PMCC apresentou média de halos de inibição significativamente maiores que a média da clorexidina. Sendo assim, o PMCC se apresenta como uma alternativa a ser mais utilizada para a otimização da antisepsia dos canais radiculares, diminuindo as chances de infecção reincidente, grande responsável pelo insucesso dos tratamentos endodônticos.

Palavras-Chave: Endodontia. Canal Radicular. *Pseudomonas aeruginosa*.

1 INTRODUÇÃO

Uma das principais dificuldades no tratamento endodôntico é a completa antisepsia do sistema de canais radiculares, pois com a necrose pulpar, este sistema torna-se progressivamente colonizado por vários microrganismos presentes na cavidade bucal (SOARES, 2003). A ineficácia do processo de assepsia permite a recolonização dos canais radiculares por diversos microrganismos distintos, sendo comum a presença da *Pseudomonas aeruginosa* nestes casos de insucesso (SIREN, 1997). *P. aeruginosa* é um importante patógeno humano frequentemente associado a infecções hospitalares. É um bacilo Gram-negativo, facilmente reconhecido em cultura pelas características morfológicas peculiares de suas colônias, formação de pigmento e odor. Normalmente, esta espécie pode ser isolada do ambiente e do corpo humano (FERREIRA, 2010; SIREN, 1997).

A clorexidina é um antibiótico que foi introduzido há muitos anos como anti-séptico de largo espectro.

Tem ação direta sobre as bactérias afetando a integridade de suas membranas citoplasmáticas, resultando na perda de constituintes celulares vitais. As bactérias Gram-negativas são menos suscetíveis a clorexidina do que as Gram-positivas. A espécie *P. aeruginosa*, em especial, é intrinsecamente resistente à clorexidina por inibir o acesso deste antimicrobiano através da membrana externa da parede celular (FERREIRA, 2010).

No intuito de eliminar a infecção remanescente, a aplicação intracanal de pastas à base de HC tem sido um dos protocolos mais recomendados atualmente, sendo capaz de eliminar a maioria das bactérias presentes no conduto (SILVA-HERZOG F. et al., 2005). O potencial de atividade do HC está relacionado com a disponibilidade, difusão e velocidade de dissociação de seus íons. Para exercer tal efeito é preciso que os íons cálcio e hidróxido interfiram nas reações enzimáticas que acontecem nas bactérias e tecidos (ESTRELA et al., 2008). A pasta feita com HC em pó, utilizada nos tratamentos endodônticos, pode ser

* Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica – Juiz de Fora – MG.
E-mail: edag.goncalves@hotmail.com

** Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Odontologia – Juiz de Fora – MG.

manipulada utilizando diferentes substâncias como veículos, na tentativa de garantir o preparo adequado da pasta, uma vez que o HC exerce sua atividade quando em contato direto com o tecido lesionado. Os veículos podem aumentar o espectro de atuação do HC, potencializando o seu reconhecido poder antimicrobiano. Entre os mais utilizados estão água destilada, paramonoclorofenol canforado, solução salina (soro fisiológico), clorexidina, polietilenoglicol, propilenoglicol e glicerina. Muitas outras substâncias tem sido propostas como adjuvantes para hidróxido de cálcio. Vários estudos têm sido realizados afim de que se estabeleça uma relação sinérgica entre hidróxido de cálcio e os veículos utilizados, o que otimizaria o processo de antissepsia dos canais radiculares (ESTRELA et al., 2008; QUEIROZ et al., 2008)

Neste trabalho, foi avaliada a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio em preparações com distintos veículos, tais como salina, glicerina e paramonoclorofenolcanforado, frente à espécie *P. aeruginas*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo da medicação intracanal

A pasta de medicação intracanal, para cada orifício da placa, foi produzida utilizando 0,12 gramas de Hidróxido de Cálcio P.A, produzido por ASFER Indústria Química Ltda. A quantidade de veiculo adicionada foi a suficiente para colocar todas as amostras em mesmo grau de textura, sendo o equivalente a 3 gotas (0,1 ml) para a solução fisiológica Arboreto, adquirida em drogaria ; 100 L para a glicerina; e 100 L de paramonoclorofenolcanforado (PMCC – Biodinâmica).

2.2 Preparo das cepas padrão

O método testado foi o de difusão em meio sólido e a cepa padrão utilizada foi a de *P. aeruginosa* (American Type Culture Collection - ATCC 1107099) obtida do Laboratório de Microrganismos de Referência da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro. A cepa foi ressuspensa e transferida para meio de congelamento para posterior utilização. Para ativação das cepas, 100 µL da suspensão de microrganismos foi semeada com um swab estéril em meio sólido BHI (Hymedia) e incubada a 37°C por 24 h em estufa de aerobiose. A seguir, com o auxílio de uma alça de platina foi retirada uma alíquota de microrganismos e estes foram colocados em tubo de ensaio contendo solução salina estéril 0,9% sendo que a turvação foi ajustada comparando-se com o padrão 0,5 da escala de Mc Farland (1,5x10⁸ células/mL).

2.3 Ensaios in vitro de atividade antimicrobiana

A partir da solução 0,5 na Escala de Mc Farlan, foram transferidos 100 µL para placas contendo BHI, as células foram espalhadas com um swab estéril e foram produzidas perfurações no meio de cultura (2 por placa) de aproximadamente 6 mm de diâmetro. Em cada orifício foram aplicados 50µL do preparado de hidróxido de cálcio preparado com o veículo escolhido. Como controle, uma solução de clorexidina 0,12% foi empregada. Os veículos testados foram: glicerina, salina e o paramonoclorofenolcanforado (PMCC). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica em aerobiose a 37°C por um período de 24 e 48 horas. Após esse período os halos de inibição foram medidos com o auxílio de um paquímetro digital. As análises estatísticas foram processadas utilizando Análise de variância (ANOVA) com o pós teste de Kuskal Wallis, com nível de significância de 95%, através do programa Graph Prism 4.

3 RESULTADOS

Na primeira fase deste trabalho, a ação do PMCC foi avaliada sobre a ATCC 1107099 de *P. aeruginosa*. Este veículo, isoladamente, possui alta atividade antimicrobiana contra esta espécie, exibindo halos de inibição significativamente maiores que a média dos halos obtidos pela solução de clorexidina 0,12% (controle).

TABELA 1

Média dos halos de inibição do crescimento, após 24 e 48 horas, da bactéria gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* frente ao paramonoclorofenolcanforado (PMCC) e clorexidina. *p > 0,05

Produto testado	Halo em 24 horas	Halo em 48 horas
Clorexidina n=4	21,10 ± 0,4243	21,20 ± 0,4967
PMCC n=4	27, 28 ± 2,307*	26,70 ± 2,341*

Fonte - Os autores (2012).

Para análise da eficácia da medicação intracanal, foram utilizadas pastas medicamentosas a base de HC com salina (NaCl 0,85%) ou com a adição de glicerina ou PMCC. Os resultados dos 20 experimentos realizados e analisados após 24 e 48 horas de incubação estão descritos na Tabela 2.

TABELA 2

Média dos halos de inibição do crescimento da bactéria gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* com diferentes pastas medicamentosas a base de hidróxido de cálcio (HC) após exposição por 24 e 48 horas. ***p > 0,001.

Produto	Halo em 24 horas (mm)	Halo em 48 horas (mm)
Clorexidina (n=20; Controle)	20,03 ± 1,386	20,10 ± 1,263
HC+Salina (n=19)	17,30 ± 2,372	17,18 ± 2,324
HC+Glicerina (n=20)	21,06 ± 0,6794	20,74 ± 1,091
HC+PMCC (n=20)	36,70 ± 1,875***	36,26 ± 1,719***

Fonte - Os autores (2012).

O veículo salina e glicerina, empregados no preparo da pasta à base de HC, foram componentes inertes usados na preparação das medicações intracanalais (dados não mostrados). O preparo do HC com salina promove uma menor difusão desta pasta no Agar BHI, sendo observados halos menores. O PMCC, por sua vez, promoveu uma difusão maior da pasta preparada. A solução de clorexidina 0,12% (controle) não apresentou diferença estatística na média dos halos de inibição em relação às pastas formadas por HC com glicerina.

Os resultados mostraram que a preparação a base de glicerina apresentou média de halos de inibição semelhantes ao antimicrobiano controle. O preparo do HC usando como veículo o PMCC apresentou média de halos de inibição significativamente maiores que a média da clorexidina, o que demonstra seu grande potencial antimicrobiano frente à cepa testada. O preparo a base de PMCC se apresentou como o melhor veículo a ser associado ao HC, uma vez que teve média de halos de inibição significativamente maiores que o controle e aos demais veículos testados. Os resultados podem ser observados no Gráfico 1.

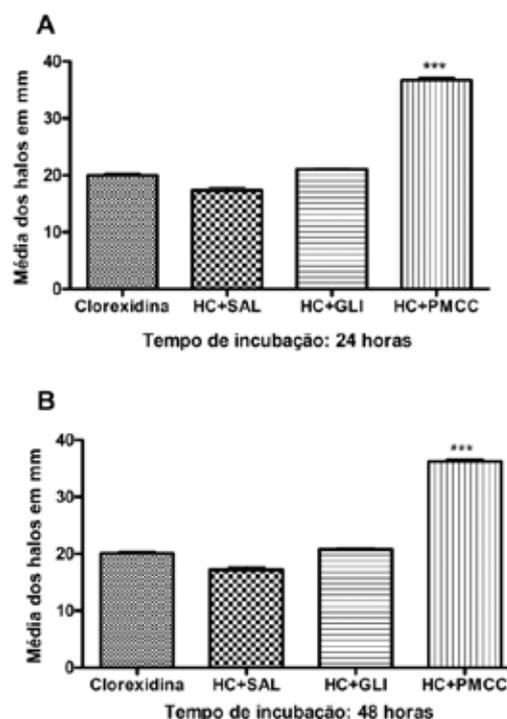
4 DISCUSSÃO

A clorexidina é provavelmente o biocida mais utilizado como antisséptico. Tem propriedades catiônicas e caracteriza-se pela capacidade de destruir os microrganismos por contato. Este agente atua primariamente na membrana da célula bacteriana, inibe a atividade respiratória e coagula o material citoplasmático. Estudos já têm demonstrado a resistência do microrganismo *P. aeruginosa* frente à clorexidina e sugerem que o uso contínuo deste antimicrobiano seria responsável por selecionar cepas resistentes ao antibiótico (FERREIRA, 2010).

Devido aos seus diferentes mecanismos de ação, o Hidróxido de Cálcio tem sido usado com sucesso

nos tratamentos de canais radiculares, apesar de não ter seu mecanismo antibacteriano completamente esclarecido. Possui uma ampla ação contra as bactérias presentes nos canais radiculares, tendo atividade comprovada contra *P. aeruginosa* (QUEIROZ et al., 2008). A ação antimicrobiana já descrita para o HC se deve principalmente a sua alcalinidade excessiva (eleva o pH da preparação a valores acima de 10), em virtude da liberação de íons hidroxila, que ao entrar em contato com os microrganismos, são capazes de inativar as enzimas intra e extracelulares as quais exercem funções primordiais à sobrevivência bacteriana. As preparações a partir de HC alteram as propriedades biológicas dos lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular das bactérias gram-negativas (SOARES, 2003).

Gráfico 1 – Análise dos halos de inibição promovidos por distintas pastas de hidróxido de cálcio. O hidróxido de cálcio (HC) foi preparado com veículos distintos: salina (SAL), glicerina (GLI) e paramonoclorofenolcanforado (PMCC). Foram avaliados os halos de inibição de crescimento sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* durante 24 (A) e 48 horas (B). Como controle, foi utilizada uma solução de clorexidina a 0,12%. ***P < 0,001.



Fonte - Os autores (2012)

A adição de veículos a este pó tem por finalidade aumentar seu espectro de ação e permitir o contato

direto da substância com o tecido lesionado (SILVA-HERZOG F, et al., 2005).

A atividade antimicrobiana do paramonoclorofenol canforado é capaz de romper a membrana citoplasmática das bactérias, desnaturar proteínas, inativando enzimas envolvidas em processos vitais da célula.

Quanto à ação antimicrobiana do PMCC frente ao grupo das *Pseudomonas aeruginosa*, os dados da literatura ainda são controversos. Em trabalhos anteriores, Di Fiore e colaboradores (1983) testaram o efeito antibacteriano de pastas de HC com quatro diferentes veículos: PMCC, acetato de metacresila, metil celulose e água. O efeito antibacteriano das pastas preparadas com PMCC e acetato de metacresila foram satisfatórios, porém os halos de inibição sofreram uma redução do diâmetro com o tempo. Trabalhos da literatura relataram o efeito de duas preparações de HC sobre cepas de *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Streptococcus faecalis*, uma associada ao soro fisiológico e a outra ao PMCC, onde foi observado que as duas pastas foram efetivas. Entretanto a pasta associada ao PMCC mostrou halos de inibição maiores (ESTRELA et al., 1995). Barbosa e colaboradores (1997) compararam os efeitos antimicrobianos do hidróxido de cálcio, gluconato de clorexidina e paramonoclorofenol canforado (PMCC) clinicamente e *in vitro*. Foram selecionados dentes com polpa necrosada e lesão periapical e não houve diferença estatística entre os grupos avaliados. Neste estudo, baseado na técnica de difusão em ágar, o PMCC mostrou os maiores valores de halos de inibição, seguido da clorexidina para todos os microrganismos testados. O

hidróxido de cálcio apresentou efeito inibitório somente sobre duas cepas microbianas. Siqueira Jr. et al. (1997) analisaram a capacidade de desinfecção por parte do HC preparado com soro fisiológico ou PMCC, sobre a dentina bovina infectada com *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum* e *Enterococcus faecalis*, em períodos distintos. Os resultados deste trabalho mostraram a eficácia da pasta de HC preparada com o PMCC, eliminando bactérias nos túbulos dentinários após uma hora de exposição. A efetividade antimicrobiana da pasta de HC+PMCC para cepas de *E. faecalis* é aparente após um período de exposição mais prolongado.

A associação do PMCC com outras substâncias ou sua diluição tem sido sugerida a fim de reduzir seu potencial irritativo (NAGEM FILHO, 2007). A citotoxicidade do PMCC será dependente de sua concentração, sendo possível a sua aplicação como agente antimicrobiano em baixas concentrações como demonstrado.

5 CONCLUSÃO

No presente estudo o PMCC obteve a melhor ação antimicrobiana. Sua atividade foi demonstrada quando utilizado isoladamente ou em associação com hidróxido de cálcio. Desta forma, o PMCC se apresenta como uma importante alternativa a ser utilizada nos tratamentos endodônticos para otimização da desinfecção dos canais radiculares. A utilização do PMCC como agente de antissepsia dos sistemas de canais radiculares pode reduzir a possibilidade de infecção persistente e recorrente, visando o sucesso do tratamento endodôntico.

Assessment of the effectiveness of different preparations of calcium hydroxide on *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a human pathogen that is associated with cases of recurrent infections in root canals. Antisepsis these channels is a difficulty faced in endodontic treatment. Chlorhexidine is an antibiotic introduced in dentistry for many years and still widely used. However, it is often not fully effective. The application of intracanal pastes Calcium Hydroxide (CH) has been a recommended protocol too. The use of vehicles can increase their spectrum of activity and enhance its antimicrobial power. This work analyzed the antimicrobial activity of HC using vehicle-saline, glycerin and Paramonoclorocanforado (PMCC). The average inhibition zones CH+ saline was 17.30 ± 2.372 (24 h) and 17.18 ± 2.324 (48 hours), for glycerin 21.06 ± 0.6794 (24h) and 20.74 ± 1.091 (48 hours), to PMCC 36.70 ± 1.875 (24h) and 36.26 ± 1.719 (48h). For chlorhexidine (control) the values were 20.03 ± 1.386 (24h) and 20.10 ± 1.263 (48h). Chlorhexidine no statistically significant difference in the mean of inhibition zones in relation to the folders formed by HC with glycerin and saline. CH already associated with PMCC had a mean inhibition zones significantly higher than the average of chlorhexidine. Thus, the PMCC is presented as an alternative to be used for optimization of the disinfection of root canals, reducing the chances of relapsing infection, largely responsible for the failure of endodontic treatment.

Keywords: Endodontics. Root Canal. *Pseudomonas aeruginosa*.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, C. A. et al. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. **Journal of Endodontics**, Philadelphia, v. 23, no. 5, p. 297-300, 1997.
- DIFIORE, P. M. et al. The antibacterial effects of calcium hydroxide apexification pastes on *Streptococcus sanguis*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, Philadelphia, v.55, no. 6, p. 91-94, 1983.
- ESTRELA, C. et al. Efeito antibacteriano de pastas de hidróxido de cálcio sobre bactérias aeróbias facultativas. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, Bauru, SP, v. 3, n. 3, p. 109-114, 1995.
- ESTRELA, C. et al. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* – A systematic review. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, SP, v. 16, n. 6, p. 364-8, 2008.
- FERREIRA, H.; LALA, E. R. P. *Pseudomonas aeruginosa*: An alert to the professionals of health. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, SP, v. 12, n. 2, p. 44-50, 2010.
- QUEIROZ, C. E. de S. et al. Ca(OH)₂ action on TNF-alpha and NO release in macrophage culture stimulated by *Pseudomonas aeruginosa* LPS. **Revista Odonto Ciência**, Porto Alegre, RS, v. 23, n. 3, p. 225-228, 2008.
- SILVA-HERZOG, D. F. et al. Comparación del hidróxido de cálcio como medicamento intraconducto, utilizando vehículos viscosos y acuosos. Estudio in vitro. **Revista Asociación Dental Mexicana**. Mexico, v. 62, no. 4, p. 137-141, 2005.
- SIREN, E. K. et al. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. **International Endodontic Journal**, Malden, MA, v. 30, no. 2, p. 91-95, 1997.
- SOARES, J.A.; SOARES, T.R.S. Ação antisséptica de pastas intracanaís à base de hidróxido cálcio. **Revista do CROMG**, Belo Horizonte, MG, v. 9, no. 2, p. 94-100, 2003.

Enviado em //

Aprovado em //