

**UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO**

**CAIO MARINHO MELLO**

**COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DE  
DIFERENTES PASTAS DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO  
EM BLOCOS DE DENTINA BOVINA INFECTADAS  
COM *Enterococcus faecalis*: ESTUDO EM  
MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A  
LASER**

Bauru  
2011

**CAIO MARINHO MELLO**

**COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DE  
DIFERENTES PASTAS DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO  
EM BLOCOS DE DENTINA BOVINA INFECTADAS  
COM *Enterococcus faecalis*: ESTUDO EM  
MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A  
LASER**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas, sob orientação do Prof. Dr Paulo Henrique Weckwerth, e co-orientação do Prof. Ms. Rodrigo Ricci Vivan.

Bauru  
2011

Mello, Caio Marinho

M5271c

Comparação da eficácia antimicrobiana de diferentes pastas de hidróxido de cálcio em blocos de dentina bovina infectadas com *Enterococcus faecalis*: estudo em microscopia confocal de varredura a laser / Caio Marinho Mello -- 2011.

37f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth

Co-orientador: Prof. Ms. Rodrigo Ricci Vivan

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) -  
Universidade Sagrado Coração - Bauru - SP

1. Hidróxido de cálcio. 2. Clorexidina. 3. Guaçatonga. 4. *Enterococcus faecalis*. 5. Microscopia confocal a laser. I. Weckwerth, Paulo Henrique. II. Vivan, Rodrigo Ricci. III. Título.

**COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DE  
DIFERENTES PASTAS DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO  
EM BLOCOS DE DENTINA BOVINA INFECTADAS  
COM *Enterococcus faecalis*: ESTUDO EM  
MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A  
LASER**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO AO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE LICENCIADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS SOB ORIENTAÇÃO DO PROF. DR. PAULO HENRIQUE WECKWERTH, E CO-ORIENTAÇÃO DO PROF. MS. RODRIGO RICCI VIVAN

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth  
Universidade Sagrado Coração

---

Prof. Ms. Bruno Cavenago  
Universidade de São Paulo

Bauru, 8 de dezembro de 2011.

Dedico este trabalho a todos aqueles que, independente da área que seguem, são como eu, apaixonados por biologia.

## Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, ao professor doutor e amigo Paulo Henrique Weckwerth, pela oportunidade dada para a realização deste trabalho, pelas conversas, risadas e conhecimento transmitido.

Aos meus professores do ensino médio, em especial Wagner Gonçalves Teixeira (“Wagnão”), grande amigo e biólogo que sempre me apoiou nas minhas escolhas dentro da biologia, Alexandre Sabbagh Benetti (“Mr Bean”), pelas risadas e piadas para quebrar o gelo durante as aulas de Álgebra, Jair Ayo Shimizu, por todo conhecimento em química e por me mostrar o quanto ela é importante dentro da biologia, Marco Antônio Jabur e Jácomo Storniolo Neto por me fazerem ver a física com outros olhos e Orlando Merlin Filho, pelas conversas sobre a vida, seus altos e baixos, e pelos discursos que sempre me fizeram acreditar e correr atrás dos meus sonhos profissionais.

A todos os professores e funcionários do Colégio São José, onde cursei meu ensino fundamental, sem a base educacional dada por eles, nada disso seria possível.

Aos meus melhores amigos desde os sete anos de idade, Thiago Alamino, Leonardo Ferreira, Mayk Vinícius, por estarem ao meu lado sempre que eu precisei.

Aos amigos que fiz dentro da Universidade, Tayar, Luciana Pagani, Foka, Vurcão, Vini, Lari, Karinhinha, Camila, Fran, Thaís, Aline, Rudá, Diegão, Tecchi, Pri, e todos aqueles que não me recordo agora, mas que sabem o quanto são importantes para mim.

As meninas do LAC, pelas risadas e pelo conhecimento.

Ao Prof. Ms. Dorival Coral, pelas excelentes aulas de botânica, além das inúmeras conversas sobre a vida e a biologia.

Ao Prof. Ms. José Antônio Rodrigues, Zezito, pelas conversas sobre anatomia, pescaria, porco no rolete entre outras.

Ao meu primo Pedro, hoje em outro plano espiritual, mas que me mostrou que o meu futuro depende do tamanho da minha vontade de viver, e que nenhum sonho é grande demais para ser vivido.

Ao meu querido tio de coração Prof Dr. Jesus Manuel Delgado Mendes, pelas oportunidades de ajudar em seus trabalhos, pelas conversas, o seu apoio as minhas escolhas, as viagens em que pude acompanhá-lo e firmar meu pensamento em escolher a biologia.

E finalmente agradeço aos meus pais e meu irmão, por todo amor, carinho e todas as coisas boas que se pode encontrar dentro de uma família, por sempre acreditarem em mim e nunca me deixarem desistir das coisas que eu quis, por me fazerem buscar sempre o mais e o melhor. A vocês família, meu muito obrigado, eu amo vocês.

## RESUMO

*Enterococcus faecalis* são cocos Gram positivos, elipsóides, em cadeias curtas, anaeróbios facultativos, habitantes do trato intestinal e genital e da cavidade oral de humanos e animais. O *E. faecalis* apresenta alta prevalência em infecções persistentes endodônticas, estando comumente associado com casos assintomáticos. Sua habilidade em causar doença perirradicular depende de sua habilidade em sobreviver e persistir como um patógeno no canal radicular e nos túbulos dentinários. Dentre estas medicações, as pastas de hidróxido de cálcio formuladas em diferentes veículos têm sido amplamente utilizadas. Diante desta problemática, este estudo objetivou avaliar e comparar a eficiência da atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes pastas de hidróxido de cálcio frente ao *E. faecalis*. Os testes foram executados em 49 blocos de dentina infectados com *E. faecalis* e tratados com pastas de hidróxido de cálcio em diferentes veículos por uma semana. A eficiência das pastas foi avaliada pela microscopia confocal de varredura a laser. Para comparação entre as pastas foi empregado o teste de Kruskal-Wallis e pelo teste de Dunn para comparações individuais com nível de significância estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ). A pasta que revelou melhor desempenho antimicrobiano foi aquela cujo veículo foi a água destilada estéril. A pasta de hidróxido de cálcio associada ao extrato propilenoglicólico de guaçatonga não apresentou desempenho antimicrobiano sobre células de *E. faecalis*.

**Palavras-chave:** Hidróxido de cálcio. Clorexidina. Guaçatonga. *Enterococcus faecalis*. Microscopia confocal a laser

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
3.1 Objetivos Gerais.....	17
3.2 Objetivos Específicos.....	17
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
4.1 Preparo dos corpos de prova.....	18
4.2 Contaminação da dentina.....	18
4.3 Testes para avaliar a atividade antimicrobiana das diferentes pastas por microscopia confocal de varredura a laser.....	19
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>

## 1.INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* inclui os enterococos clássicos previamente classificados como estreptococos do grupo D. São habitantes normais do trato gastrointestinal e em menor proporção da vagina e uretra masculina (KONEMAN et al., 2001).

Tornaram-se importantes agentes de doenças humanas devido principalmente à sua elevada resistência aos agentes antimicrobianos e seus inúmeros fatores de virulência recentemente mais estudados (KAYAOGLU ; ØRSTAVIK, 2004).

São cocos Gram positivos, arranjados aos pares ou em cadeias curtas, sendo dificilmente diferenciados microscopicamente de alguns estreptococos. São anaeróbios facultativos e crescem em temperatura de 35°C. Crescem sobre a superfície de ágar sangue como colônias tipicamente gama-hemolíticas e sobre a superfície do ágar M-Enterococcus como colônias puntiformes de cor vermelho escuro até arroxeadas. Os enterococos toleram bile de boi a 40% e podem hidrolisar esculina. Ainda, crescem na presença de cloreto de sódio a 6,5%. São distinguidos de bactérias do gênero *Staphylococcus* pela incapacidade de produção de catalase (MURRAY et al., 1998).

Seus fatores de virulência têm sido amplamente estudados. Produzem citolisinas com atividade sobre hemácias humanas, ovinas e de cavalo. A substância de agregação é uma proteína codificada por plasmídeos responsável pela aglutinação dos microrganismos para facilitar a troca entre plasmídeos. As estirpes de *E. faecalis* produzem feromonas, peptídeos capazes de amplificar a transferência de DNA plasmidial por estirpes em processo conjugativo e também de amplificar a resposta inflamatório durante o processo infeccioso (KAYAOGLU ; ØRSTAVIK, 2004).

O ácido lipoteicóico é, além de adesina, um importante fator de virulência por induzir fator de necrose tumoral (TNF), modulando de forma agressiva a resposta imune. Produzem várias enzimas extracelulares como gelatinase e hialuronidase (KAYAOGLU; ØRSTAVIK, 2004).

O *E. faecalis* causa infecções complicadas do trato urinário, bacteremia, endocardite, infecções pélvicas, sepse neonatal e mais raramente meningites (KONEMAN et al., 2001; MURRAY et al., 1998).

Embora seja uma espécie presente nos processos infecciosos humanos, sua etiopatogenia nos processos infecciosos da cavidade oral vem sendo amplamente discutida.

Esta bactéria tem demonstrado habilidade para sobreviver sozinho no interior do canal radicular sem o suporte de outras bactérias. *E. faecalis* foi isolado em 38% dos dentes que apresentaram microrganismos recuperáveis, sugerindo que este é um importante agente no insucesso endodôntico. O fato do *E. faecalis* estar ausente ou em pequeno número em canais sem tratamento endodôntico, indica que essa bactéria pode penetrar no interior do canal durante o tratamento, sobreviver ao tratamento antimicrobiano e permanecer após a obturação (FABRICIUS et al., 1982).

A recuperação freqüente do *E. faecalis* de canais radiculares com insucesso do tratamento endodôntico tem sido amplamente relatada (SUNDQVIST et al., 1998; PINHEIRO et al., 2003; RÖÇAS et al. 2003). Os *E. faecalis* estão presentes em canais radiculares não tratados endodônticamente e quando presentes eles usualmente compõem uma pequena porção da microbiota do canal radicular. Demonstram alta resistência a medicamentos usados durante o tratamento e este é um dos poucos microrganismos que tem mostrado *in vitro* resistir ao efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio (WEIGER et al., 1995, EVANS et al., 2002).

Evans et al. (2002), verificaram que a resistência desse microrganismo ao hidróxido de cálcio está relacionada a uma bomba de próton.

Diante da resistência do *E. faecalis* ao hidróxido de cálcio, tem sido proposta a associação de substâncias, para potencializar a ação antimicrobiana frente a esse microrganismo.

A clorexidina tem sido amplamente sugerida como material para anti-sepsia de canais radiculares entre sessões, por possuir ação antimicrobiana imediata, amplo espectro de ação sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, anaeróbias, facultativas e aeróbias, leveduras e fungos, relativa ausência de toxicidade, capacidade de adsorção pela dentina e lenta liberação de substância ativa, prolongando sua atividade antimicrobiana residual (substantividade). A eficácia da pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  contra linhagens de *E. faecalis* e outros microrganismos tem sido amplamente discutida na literatura (SCHÄFER et al., 2004; ERCAN et al., 2006; EVANS et al., 2003; GOMES et al., 2002; CWIKLA et al., 2004; NAGESHWAR et al., 2004; TANOMARU et al., 2007).

Nageshwar et al. (2004), avaliando a eficácia da pasta em clorexidina e salina em 30 dentes incisivos centrais contaminados com *E. faecalis*, demonstraram que a pasta com clorexidina foi estatisticamente mais efetiva na eliminação do microrganismo a partir do túbulo dentinário, quando comparada com a pasta em salina estéril. Estudo semelhante realizado por Evans et al., 2003, usando dentes bovinos, demonstrou a mesma eficiência da pasta em clorexidina quando comparada com a pasta em água estéril. Estes dois estudos contrariam os achados de Schäfer et al., 2004, onde demonstraram que a pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  com clorexidina não aumentou a eficiência de inibição do *E. faecalis*.

Ercan et al. (2006), utilizando um modelo de experimento *in vitro* com dentes, revelaram que a clorexidina gel a 2% mostrou melhor eficiência para inibir *E. faecalis* e *Candida albicans* quando comparada com a pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  pura ou acrescida de 2% de clorexidina. Os estudos de Gomes et al., 2002, onde pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  foram avaliadas *in vitro* com diferentes veículos frente à vários microrganismos, revelaram que as pastas com paramonoclorofenol acrescido de glicerina e paramonoclorofenol puro demonstraram melhor eficiência na inibição das estirpes sendo que a linhagem que apresentou melhor zona de inibição foi a *P. endodontalis* e a menor zona de inibição foi *E. faecalis*.

A atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio se dá pela liberação de íons hidroxila e conseqüente aumento de pH, podendo atingir 11 a 12,5 (ESTRELA et al., 1998). Os efeitos letais desses íons hidroxila sobre as células bacterianas, devem-se principalmente, aos danos ocasionados na membrana citoplasmática, a desnaturação de proteínas e danos diretos ao DNA (SIQUEIRA et al., 1999). Para ser efetivo contra bactérias localizadas dentro do túbulo dentinário, os íons hidroxila do hidróxido de cálcio devem difundir-se na dentina em concentrações suficientes para sobrepujar seu efeito tampão e conseqüentemente, aumentar drasticamente o pH local.

As pastas de hidróxido de cálcio em diferentes veículos e concentrações tem sido o material de escolha como medicação intracanal por seu alto poder alcalinizante criando um ambiente desfavorável ao crescimento bacteriano. Apesar de sua ampla utilização, o hidróxido de cálcio não tem demonstrado eficácia sobre algumas cepas de microrganismos “*in vivo*”.

Novas alternativas têm sido buscadas para o emprego na terapia endodôntica como a utilização de produtos naturais como o própolis.

Novos veículos para pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$ , como por exemplo, fitoterápicos, devem ser testados com o objetivo de avaliar uma provável potencialização da pasta para eliminar *E. faecalis* de canais radiculares.

Dentre estes fitoterápicos, uma opção poderia ser o uso do extrato propilenoglicólico da *Casearia sylvestris* Sw, popularmente conhecida como guaçatonga.

É uma planta originária da América Latina desde o México até a Argentina. No Brasil é encontrada em abundância, sendo uma espécie muito comum no estado de São Paulo. É conhecida por diversas sinonímias populares devido a sua ampla distribuição pelo país: guaçatonga, erva de lagarto, vassitonga, bugre-branco, dentre outros. Mais conhecida popularmente como guaçatonga, palavra de origem do tupi guarani comprovando que a espécie já era de conhecimento dos índios (ERVA-DO SÍTIO, 2001; TESKE; TRENTINI, 2001).

A planta é arbórea e perene, com altura variando de dois a seis metros, mas pode atingir até vinte metros. Possui tronco tortuoso, casca de coloração acinzentada a acastanhada, rugosa e com pequenas fendas superficiais (ERVA-DO SÍTIO, 2001; SILVA Jr., 1997; JASZCZERSKI, 1987; TORRES & YAMAMOTO, 1986; CORREA, 1984; KLEIN et al., 1984; ABSY & SCAVONE, 1973).

As folhas são alternas lanceoladas até ovaladas ou elípticas, dispostas no mesmo plano do ramo, alternadamente. Possui entre seis e quatorze centímetros de comprimento por três a cinco centímetros de largura. É assimétrica na base e apresenta de cinco a oito nervuras laterais. São brilhantes e dotadas de pequenas glândulas de óleo, visíveis contra a luz (ERVA-DO SÍTIO, 2001; SILVA Jr., 1997; JASZCZERSKI, 1987; TORRES; YAMAMOTO, 1986; CORREA, 1984; KLEIN et al., 1984; ABSY; SCAVONE, 1973).

As flores são numerosas, pequenas, branco-esverdeadas ou amarelas, estão dispostas em cimeiras axilares e exalam um forte aroma. Já o fruto é uma cápsula ovóide-globulosa, pequena, vermelha quando madura, contendo de duas a seis sementes em arilo lanoso, amarelo comestível (ERVA-DO SÍTIO, 2001; SILVA Jr., 1997; JASZCZERSKI, 1987; TORRES; YAMAMOTO, 1986; CORREA, 1984; KLEIN et al., 1984; ABSY; SCAVONE, 1973).

Possui ação cicatrizante, anti-séptica, antimicrobiana e fungicida, justificando a marcante porcentagem de óleo essencial; anti-úlceras reduzindo o volume de ácido clorídrico; diurética ativando a circulação periférica e estimulando o metabolismo

cutâneo com conseqüente tonificação local; taninos formando revestimento protetor na pele e nas mucosas dificultam as infecções (TESK ; TRENTINI, 2001).

Em relação à sua constituição química, encontramos óleo essencial, saponinas, ácidos graxos, taninos, antocianosídeo, resinas e flavonóides. Desta forma alguns componentes químicos em especial poderão ter ação direta sobre o microrganismo em questão, como taninos, flavonóides e óleos essenciais.

Os taninos distribuem-se por toda a planta, em todas as regiões e tecidos, particularmente do córtex, floema e raios medulares, aparecem também solubilizados no suco dos vacúolos sob a forma de combinações complexas. Sendo essas substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular entre 500 e cerca de 3000 Dalton, são capazes de formar complexos insolúveis em água. Quando combinados com alcalóides, gelatina e outras proteínas são importantes, pois são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais (SIMÕES, et al., 2001).

São classificados, segundo sua estrutura química, em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados.

Acredita-se que a propriedade farmacológica dos taninos está relacionada a três características gerais comuns em maior ou menor grau aos dois grupos. Dentre estas características, podem ser citadas a complexação com íons metálico como: Ferro (Fe), Manganês (Mn), Cobre (Cu), Alumínio (Al), entre outros, atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres e habilidade de complexar com outras moléculas, incluindo macromoléculas como proteínas e polissacarídeos.

Os flavonóides foram biosintetizados a partir dos fenilpropanóides, e constituem uma importante classe de polifenóis presentes em abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal com alguns representantes em briófitas, em fungos e em pteridófitas. Encontram-se presente em abundâncias nas angiospermas, sendo que neste grupo apresenta grande diversidade estrutural.

Está quase ausente nas algas. São funções atribuídas aos flavonóides nas plantas: proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, atraentes de animais com finalidade de polinização, antioxidantes, controle da ação de hormônios vegetais, agentes alelopáticos e inibição de enzimas.

Os óleos essenciais ou terpenos são originados da via do acetato-mevalonato a partir de uma unidade isopreno. A classificação dos terpenos é feita de acordo com a quantidade de unidades isopreno em hemiterpenóides, C5; monoterpenóides, C10; sesquiterpenóides, C15; diterpenóides, C20; triterpenóides, C30; e carotenóides, C40. Apresentando diversas funções nos vegetais, os monoterpenos atuam na atração de polinizadores, pois são constituintes dos óleos essenciais (óleos voláteis).

Os triterpenos e seus derivados, os esteróides, apresentam uma gama de funções. Muitos têm funções de proteção contra herbívoros, alguns são antimicrobicos, e outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz (VICKERY & VICKERY, 1981; HARBONE & BAXTER, 1995).

Os extratos compreendem, modernamente, um conceito vasto de produtos fitoterápicos, onde através de várias metodologias de extração ou dissolução, com o emprego de misturas solventes adequadas, em qualquer relação de concentração entre matéria-prima vegetal e o meio líquido, tem como objetivo retirar com maior ou menor especificidade determinados componentes da planta (SIMÕES et al., 2001).

Assim como as tinturas, são preparações líquidas, diferindo apenas no nível de concentração; os extratos de fluídos apresentam uma mistura hidroetanólicas como solvente. Cada mililitro de extrato contém os constituintes ativos correspondentes a 1g da droga, ou ainda, obtidos através da dissolução do extrato seco ou diluição do extrato concentrado correspondente (SIMÕES et al., 2001).

As Infusões são preparações utilizadas para todas as partes de uma planta medicinais ricas em componentes voláteis, aromas delicados e princípios ativos que se degradam pela ação combinada de água e do calor prolongado. No caso de plantas com estas características ou que facilmente se degradam é recomendado a utilização de uma maceração, que seria uma infusão a frio (SIMÕES et al., 2001).

Essa infusão tem como resultado à água fervendo em contato com a erva já escolhida e picada. Posteriormente elas vão para um recipiente e permaneceram por alguns minutos variando de 5 a 10 minutos. Logo após o repouso, o infuso deve ser coado para ser empregado em três dias (SIMÕES et al., 2001).

No entanto, essa substância não foi associada ao hidróxido de cálcio para verificar se há um sinergismo na ação antimicrobiana, podendo ser uma alternativa de

associação para a destruição do *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas, necessitando de estudo para esclarecer a indagação.

## 2. JUSTIFICATIVA

O *E. faecalis* apresenta alta prevalência em infecções persistentes endodônticas, estando comumente associado com casos assintomáticos. Embora *E. faecalis* possua vários fatores de virulência, sua habilidade em causar doença perirradicular depende de sua habilidade em sobreviver e persistir como um patógeno no canal radicular e nos túbulos dentinários, além de ser um microrganismo que tem apresentado resistência ao pH alcalino, podendo manter-se viável até em pH 10,3. Deve-se enfatizar também que embora a pasta de hidróxido de cálcio apresente pH de 12,0, no interior da massa dentinária esse pH decresce para 9,5 a 10,0.

Assim, pela necessidade da busca constante de substâncias que apresentem boa capacidade anti-séptica, favoreça ação no interior de túbulos dentinários e sejam naturais, com menor toxicidade para serem utilizadas na terapia odontológica e endodôntica, é de suma importância priorizar os testes com substâncias clássicas de uso endodôntico e buscar novas modalidades de tratamento associado com compostos fitoterápicos, como por exemplo, o extrato da guaçatonga, por ser facilmente encontrada, e então de baixo custo. No entanto, encontra-se, em linhas gerais, uma escassez na literatura quanto a sua associação à pasta de hidróxido de cálcio, havendo a necessidade de um estudo que esclareça cientificamente ao clínico se a associação do extrato da guaçatonga ao hidróxido de cálcio apresenta efetividade na eliminação do *E. faecalis* a partir do sistema de canal radicular, podendo se tornar uma alternativa na Clínica Odontológica para o tratamento de infecções endodônticas onde este microrganismo está envolvido.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar e comparar o desempenho antimicrobiano *in vitro* de diferentes pastas de hidróxido de cálcio frente ao *Enterococcus faecalis* em dentina bovina.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o desempenho antimicrobiano das seguintes pastas a base hidróxido de cálcio: água estéril, clorexidina a 1%, clorexidina a 1% em propilenoglicol, propilenoglicol puro e extrato propilenoglicólico de guaçatonga em dentina bovina contaminada com *E. faecalis* através de microscopia confocal de varredura a laser;
- Comparar a eficiência entre as diferentes pastas na eliminação do *E. faecalis*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Preparo dos corpos de prova

Os procedimentos experimentais utilizaram 49 blocos de dentina bovina esterilizados. As características dos blocos foram de aproximadamente 4x4x2mm. Os blocos de dentina foram confeccionados a partir de incisivos bovinos, esterilizados em autoclave e seccionados utilizando uma máquina metalográfica de corte tipo ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, Lake Bluff IL, USA) até alcançar as medidas desejadas.

Após o corte os blocos foram lixados utilizando uma máquina polítrix. Os contínuos segmentos de dentina foram tratados com hipoclorito de sódio 1% por 30 minutos e EDTA a 17% por 5 minutos para a eliminação de resíduos orgânicos e possível presença de “smear layer”. Para verificar o método de limpeza, três blocos foram observados utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura. Os blocos foram esterilizados com o auxílio de autoclave a 121°C. Uma vez estéreis, os blocos foram contaminados com cultura de *Enterococcus faecalis* em BHI por 21 dias.

### 4.2 Contaminação da dentina

Quarenta e dois blocos foram mergulhados em caldo BHI (Difco®) contendo cultura de *Enterococcus faecalis* ATCC 25912 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) padronizada pela escala 0,5 de Mac Farland ( $1,5 \times 10^8$  bactérias/mL) e incubados por 21 dias a 36°C para que ocorresse contaminação dos corpos de prova.

Durante o período total de incubação, a cada 3 dias os corpos de prova foram removidos para um caldo de cultura novo de *E. faecalis* obtido por incubação “overnight” e padronizado até turvação padrão referente à escala 0,5 de Mac

Farland. A viabilidade da cultura foi testada a cada 3 dias por inoculação em placas de M-Enterococcus ágar (Difco<sup>®</sup>) a 36°C por 18 a 24 horas.

O grupo controle negativo foi constituído por 7 blocos que foram mergulhados em caldo BHI (Difco<sup>®</sup>) estéril por 21 dias. Para se confirmar a esterilidade dos blocos, a cada 3 dias, o caldo BHI foi semeado sobre a superfície de placas de ágar Brucela-sangue (Difco<sup>®</sup>) a 5%.

Ao final deste período, todos os blocos foram removidos dos caldos de cultura, enxaguados por 3 vezes com solução salina tamponada estéril, secados com uma agulha estéril e distribuídos randomicamente sobre a superfície de placas de Petri estéreis de acordo com cada grupo de testes, como se segue:

Grupo 1: controle negativo (sem infecção e sem medicação)

Grupo 2: pasta de hidróxido de cálcio com água estéril

Grupo 3: pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina a 1%

Grupo 4: pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina a 1% em propilenoglicol

Grupo 5: pasta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol puro

Grupo 6: pasta de hidróxido de cálcio com extrato propilenoglicólico de guaçatonga (*Casearia sylvestris* Sw.)

Grupo 7: controle positivo (com infecção e sem medicação)

Os blocos dos grupos 2 até 6 tiveram sua superfície preenchida com as respectivas pastas de hidróxido de cálcio com seus diferentes veículos. Os blocos foram incubados novamente a 36°C por uma semana, observando-se umidade de 100% obtida por câmara úmida com algodão embebido em água estéril.

Após o período de uma semana, os blocos foram removidos da câmara úmida e as pastas removidas pela irrigação com 2 ml de água estéril, sendo em seguida secados com uma agulha estéril e cones de papel estéreis.

4.3 Testes para avaliar o desempenho antimicrobiano das diferentes pastas por microscopia confocal de varredura a laser

Os espécimes foram colocados em placas de Petri e coradas com 100  $\mu\text{L}$  da solução Live/Dead® BacLight Bacterial Viability Kit L7012 (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR, EUA), gotejada sobre a dentina. Após aplicação dos corantes, a placa foi fechada e envolta em papel laminado, com objetivo de realizar a difusão dos corantes no espécime com ausência de luz e em temperatura de 37°C por 20 minutos, de acordo com as orientações do fabricante. Para o preparo do corante Live/Dead® BacLight foram adicionados 1,5  $\mu\text{L}$  do componente A e 1,5  $\mu\text{L}$  do componente B a 0,97 mL de solução salina a 0,85%. O marcador, que cora em verde as células viáveis, e em vermelho as células com danos na membrana, foi preparado diariamente antes do seu uso, sendo o mesmo mantido em local protegido da luz e do calor durante todos os procedimentos. As amostras foram observadas utilizando o microscópio confocal de varredura laser para observar a distribuição bacteriana nos tecidos dentinários infectados.

## 5. RESULTADOS

Para avaliar o desempenho antimicrobiano das diferentes pastas de hidróxido de cálcio sobre blocos de dentina contaminados com *E. faecalis*, ao final de sete dias de ação das pastas, os blocos foram submetidos à análise em microscopia confocal de varredura a laser, a fim de se determinar a diferenciação entre bactérias viáveis e não viáveis.

A tabela 1 representa a mediana, média e a variação de valores nas contagens de células totais e viáveis nos diferentes grupos experimentais.

A avaliação do desempenho antimicrobiano das diferentes pastas utilizadas sobre os blocos de dentina contaminados com *E. faecalis* pela técnica de microscopia eletrônica confocal a laser, está representado nas figuras 1 a 5.

Os resultados revelaram que 78% das bactérias presentes no grupo controle positivo, ou seja, sem ação de medicamento, eram viáveis (figura 6).

A aplicação das diferentes pastas proporcionou uma significativa alteração na proporção de bactérias viáveis e não viáveis encontradas no biovolume celular total dos blocos de dentina.

Para a pasta de hidróxido de cálcio com veículo clorexidina a 1% a proporção de bactérias viáveis e não viáveis foi de 36% e 64%, respectivamente (figura 1).

Para a pasta de hidróxido de cálcio com veículo clorexidina a 1% em propilenoglicol a proporção de bactérias viáveis e não viáveis foi de 42% e 58%, respectivamente (figura 2).

Para a pasta de hidróxido de cálcio associada ao extrato propilenoglicólico de guaçatonga a proporção de bactérias viáveis e não viáveis foi a mesma, ou seja, 50% (figura 3).

Para a pasta de hidróxido de cálcio cujo veículo foi o propilenoglicol puro a proporção de bactérias viáveis e não viáveis foi de 36% e 63%, respectivamente (figura 4).

A pasta que revelou melhor desempenho sobre *E. faecalis* em bloco de dentina foi aquela manipulada com hidróxido de cálcio e água estéril cuja proporção de bactérias viáveis e não viáveis foi de 14% e 86%, respectivamente (figura 5).

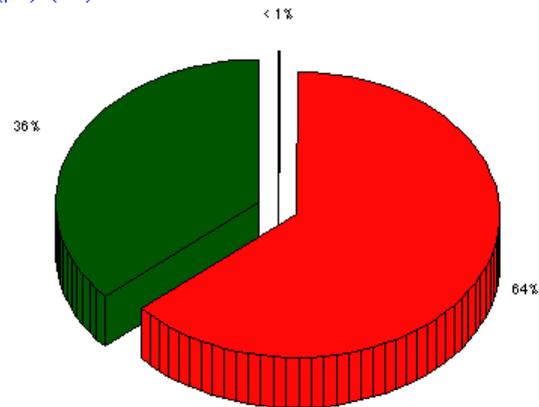
A Comparação estatística dois a dois do desempenho antimicrobiano das diferentes pastas no total de células vivas está representado na tabela 2.

Tabela 1. Mediana, média e variação de valores do biovolume total e de células vivas após o contato com as substâncias experimentais

<b>Biovolume Total (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	<b>CaOH+Clorex</b>	<b>CaOH+Clorex+Prop</b>	<b>CaOH+Guaçat</b>	<b>CaOH+Prop</b>	<b>CaOH+Água</b>	<b>Controle Positivo</b>
Mediana	$1.04 \times 10^4$	$2.07 \times 10^5$	$1.64 \times 10^6$	$2.54 \times 10^5$	$7.97 \times 10^4$	$9.82 \times 10^4$
Média	$3.16 \times 10^4$	$6.00 \times 10^5$	$1.60 \times 10^6$	$2.13 \times 10^5$	$1.57 \times 10^5$	$2.35 \times 10^5$
Variação	$2.07 \times 10^3$ – $1.45 \times 10^5$	$1.99 \times 10^4$ – $2.30 \times 10^6$	$5.32 \times 10^4$ – $3.64 \times 10^6$	$1.87 \times 10^4$ – $6.19 \times 10^5$	$2.17 \times 10^4$ – $3.55 \times 10^5$	$1.82 \times 10^4$ – $7.06 \times 10^5$
<b>Células vivas (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>						
Mediana	$3.05 \times 10^3$	$1.49 \times 10^5$	$3.07 \times 10^5$	$7.42 \times 10^4$	$1.17 \times 10^4$	$8.51 \times 10^4$
Média	$1.14 \times 10^4$	$2.50 \times 10^5$	$8.10 \times 10^5$	$8.86 \times 10^4$	$2.21 \times 10^4$	$1.83 \times 10^5$
Variação	$1.56 \times 10^2$ – $5.65 \times 10^4$	$6.29 \times 10^2$ – $9.93 \times 10^5$	$1.13 \times 10^4$ – $2.94 \times 10^6$	$2.52 \times 10^3$ – $2.57 \times 10^5$	$5.76 \times 10^0$ – $1.53 \times 10^5$	$1.70 \times 10^4$ – $5.76 \times 10^5$

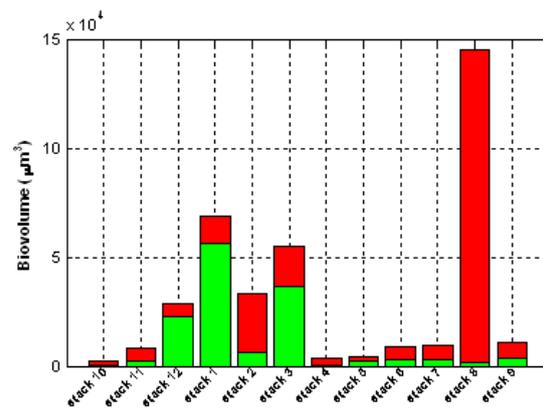
CaOH+Clorex: Pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina a 1%  
 CaOH+Clorex+Prop: Pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina a 1% em propilenoglicol  
 CaOH+Guaçat: Pasta de hidróxido de cálcio com extrato propilenoglicólico de Guaçatonga  
 CaOH+Prop: Pasta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol puro  
 CaOH+Água: Pasta de hidróxido de cálcio com água destilada estéril  
 Controle positivo: blocos de dentina infectados sem contato com as substâncias

Biofilm: STACK stack 1 - Total biovolume: 379202 ( $\mu\text{m}^3$ )  
 Green: 137699 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (36 %)  
 Red: 240836 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (64 %)  
 NS: 667 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (0 %)



bioImageL (TM) v.2 (2010)

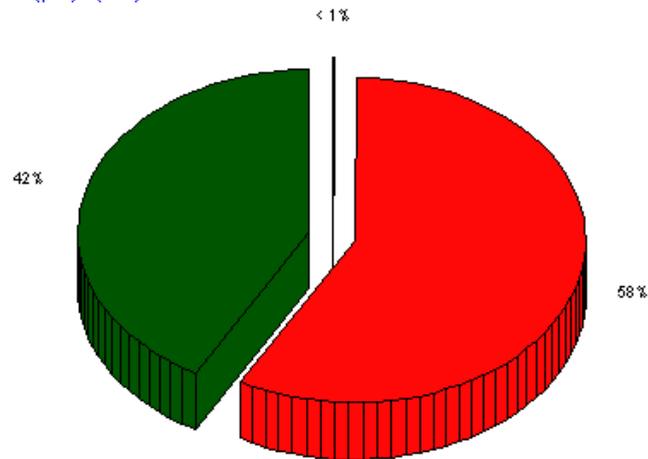
Biofilm: STACK stack 1  
 Distribution of biovolume in 12 stacks.



bioImageL (TM) v.2 (2010)

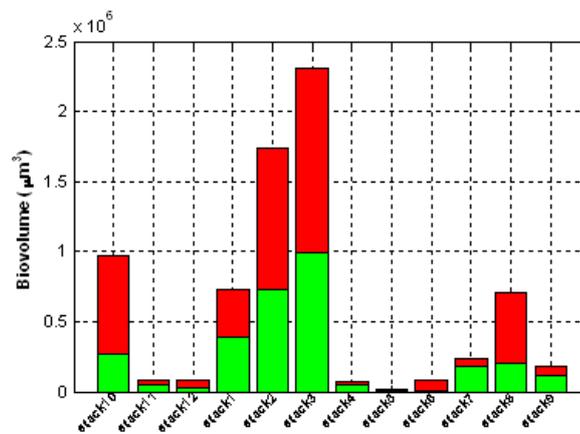
Fig. 1 Gráficos representativos da contagem de células bacterianas vivas (verde) e mortas (vermelho) presentes no grupo CaOH + Clorexidina a 1%.

Biofilm: STACK stack1 - Total biovolume: 7200439 ( $\mu\text{m}^3$ )  
 Green : 3007566 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (42 %)  
 Red : 4177279 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (58 %)  
 NS : 15594 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (0 %)



bioImageL (TM) v.2 (2010)

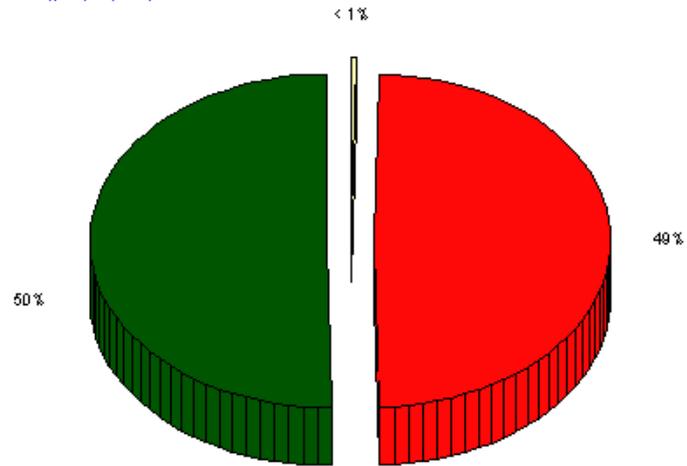
Biofilm: STACK stack1  
 Distribution of biovolume in 12 stacks.



bioImageL (TM) v.2 (2010)

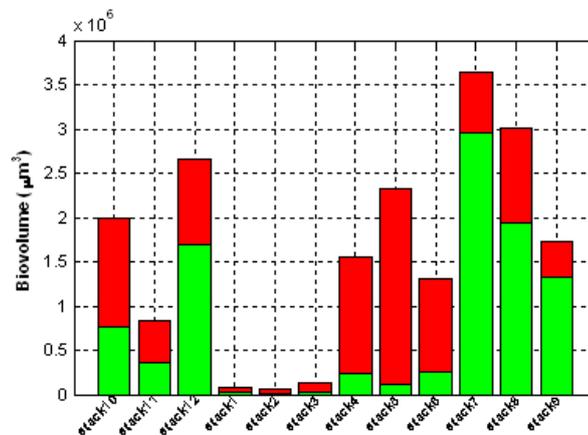
Fig. 2 Gráficos representativos da contagem de células bacterianas vivas (verdes) e mortas (vermelho) presentes no grupo CaOH + Clorexidina a 1% em propilenoglicol.

Biofilm: STACK stack1 - Total biovolume: 19303044 ( $\mu\text{m}^3$ )  
 Green: 9728884 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (50 %)  
 Red: 9508754 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (49 %)  
 NS: 65406 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (0 %)



bioImageL (TM) v.2 (2010)

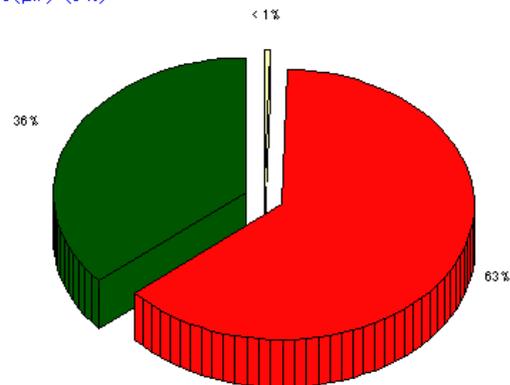
Biofilm: STACK stack1  
 Distribution of biovolume in 12 stacks.



bioImageL (TM) v.2 (2010)

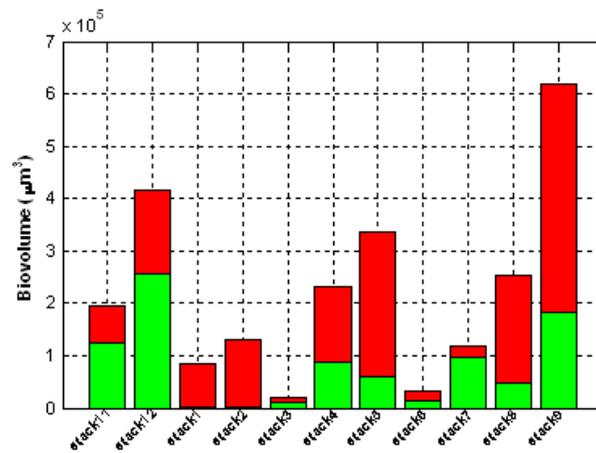
Fig. 3 Gráficos representativos da contagem de células bacterianas vivas (verde) e mortas (vermelho) presentes no grupo CaOH + Guaçatonga.

Biofilm: STACK stack1 - Total biovolume: 2434403 ( $\mu\text{m}^3$ )  
 Green: 882867 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (36 %)  
 Red: 1540278 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (63 %)  
 NS: 11258 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (0 %)



bio Image L (TM) v.2 (2010)

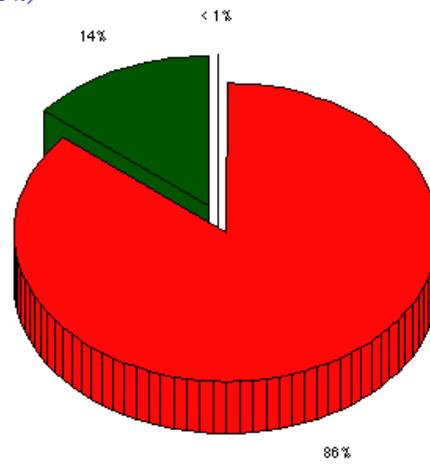
Biofilm: STACK stack1  
 Distribution of biovolume in 11 stacks.



bio Image L (TM) v.2 (2010)

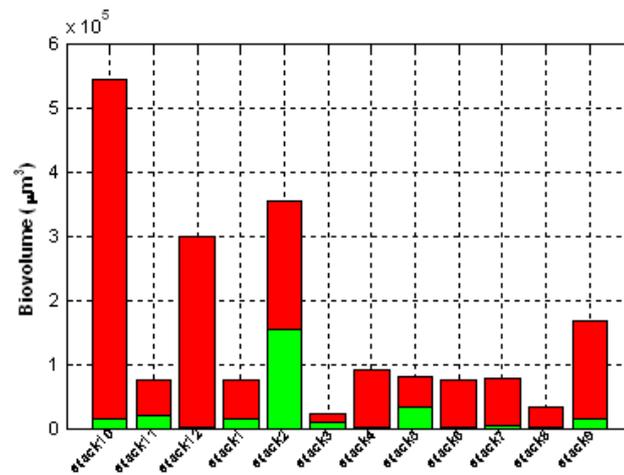
Fig. 4 Gráficos representativos da contagem de células bacterianas vivas (verde) e mortas (vermelho) presentes no grupo CaOH + Propilenoglicol.

Biofilm: STACK stack1 - Total biovolume: 1893462 ( $\mu\text{m}^3$ )  
 Green : 266081 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (14 %)  
 Red : 1625820 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (86 %)  
 NS : 1560 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (0 %)



bioImageL (TM) v.2 (2010)

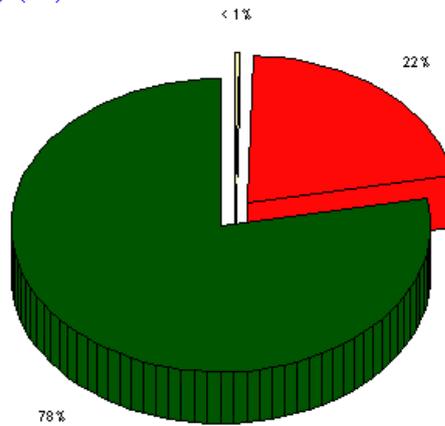
Biofilm: STACK stack1  
 Distribution of biovolume in 12 stacks.



bioImageL (TM) v.2 (2010)

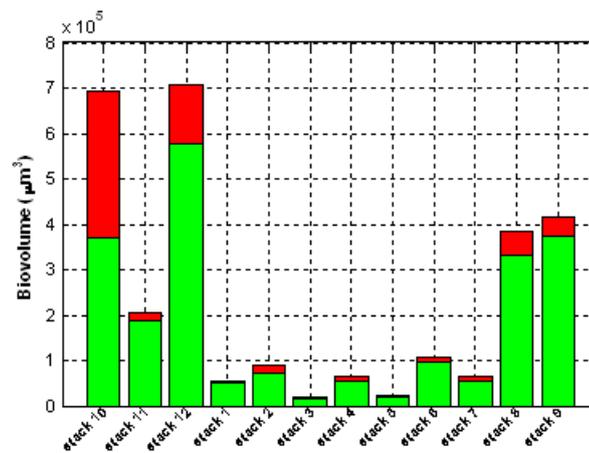
Fig. 5 Gráficos representativos da contagem de células bacterianas vivas (verde) e mortas (vermelho) presentes no grupo CaOH + Água.

Biofilm: STACK stack 1 - Total biovolume: 2831166 ( $\mu\text{m}^3$ )  
 Green: 2207469 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (78 %)  
 Red: 612403 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (22 %)  
 NS: 11294 ( $\mu\text{m}^3$ ) - (0 %)



bio ImageL (TM) v.2 (2010)

Biofilm: STACK stack 1  
 Distribution of biovolume in 12 stacks.



bio ImageL (TM) v.2 (2010)

Fig. 6 Gráficos representativos da contagem de células bacterianas vivas (verde) e mortas (vermelho) presentes no grupo controle positivo.

Tabela 2. Comparação estatística dois a dois do desempenho antimicrobiano das diferentes pastas no total de células vivas

Pastas	Diferença	Nível de significância
Controle x CaOH+Clorex	30,25	Significante
Controle x CaOH+Clorex+Prop	1,667	Não significativa
Controle x CaOH+Guaç	-7,667	Não significativa
Controle x CaOH+Prop	10	Não significativa
Controle x CaOH+Água	27,57	Significante
CaOH+Clorex x CaOH+Clorex+Prop	-28,58	Significante
CaOH+Clorex x CaOH+Guaç	-37,92	Significante
CaOH+Clorex x CaOH+Prop	-20,25	Não significativa
CaOH+Clorex x CaOH+Água	-2,5	Não significativa
CaOH+Clorex+Prop x CaOH+Guaç	-9,333	Não significativa
CaOH+Clorex+Prop x CaOH+Prop	8,333	Não significativa
CaOH+Clorex+Prop x CaOH+Água	26,08	significante
CaOH+Guaç x CaOH+Prop	17,67	Não significativa
CaOH+Guaç x CaOH+Água	35,42	Significante
CaOH+Prop x CaOH+Água	17,75	Não significativa

CaOH+Clorex: Pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina a 1%

CaOH+Clorex+Prop: Pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina a 1% em propilenoglicol

CaOH+Guaçat: Pasta de hidróxido de cálcio com extrato propilenoglicólico de Guaçatonga

CaOH+Prop: Pasta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol puro

CaOH+Água: Pasta de hidróxido de cálcio com água destilada estéril

Controle positivo: blocos de dentina infectados sem contato com as substâncias

Valor crítico:33,04

p<0,05

# Análise estatística pelo método não paramétrico de Kruskal-Wallis e comparação de significância pelo método de Dunn

## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho antimicrobiano de pastas de hidróxido de cálcio manipuladas com diferentes veículos sobre células de *E. faecalis* em blocos de dentina contaminados.

A recuperação freqüente do *E. faecalis* de canais radiculares com insucesso do tratamento endodôntico tem sido amplamente relatada (SUNDQVIST et al., 1998; PINHEIRO et al., 2003; RÖÇAS et al. 2003). Os *E. faecalis* estão presentes em canais radiculares não tratados endodônticamente e quando presentes eles usualmente compõem uma pequena porção da microbiota do canal radicular. Demonstram alta resistência a medicamentos usados durante o tratamento e este é um dos poucos microrganismos que tem mostrado *in vitro* resistir ao efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio (WEIGER et al., 1995, EVANS et al., 2002).

Evans et al. (2002), verificaram que a resistência desse microrganismo ao hidróxido de cálcio está relacionada a uma bomba de próton.

Diante da resistência do *E. faecalis* ao hidróxido de cálcio, tem sido proposta a associação de substâncias, para potencializar a ação antimicrobiana frente a esse microrganismo.

A clorexidina tem sido amplamente sugerida como material para anti-sepsia de canais radiculares entre sessões, por possuir ação antimicrobiana imediata, amplo espectro de ação sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, anaeróbias, facultativas e aeróbias, leveduras e fungos, relativa ausência de toxicidade, capacidade de adsorção pela dentina e lenta liberação de substância ativa, prolongando sua atividade antimicrobiana residual (substantividade). A eficácia da pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  contra linhagens de *E. faecalis* e outros microrganismos tem sido amplamente discutida na literatura (SCHÄFER et al., 2004; ERCAN et al., 2006; EVANS et al., 2003; GOMES et al., 2002; CWIKLA et al., 2004; NAGESHWAR et al., 2004; TANOMARU et al., 2007).

Nageshwar et al.(2004) avaliando a eficácia da pasta em clorexidina e salina em 30 dentes incisivos centrais contaminados com *E. faecalis*, demonstraram que a pasta com clorexidina foi estatisticamente mais efetiva na eliminação do microrganismo a partir do túbulo dentinário, quando comparada com a pasta em salina estéril. Estudo semelhante realizado por Evans et al.(2003) usando dentes bovinos, demonstrou a mesma eficiência da pasta em clorexidina quando comparada com a pasta em água estéril. Estes dois estudos contrariam os achados de Schäfer et al.(2004) onde demonstraram que a pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  com clorexidina não aumentou a eficiência de inibição do *E. faecalis*.

Em nosso estudo, a pasta de hidróxido de cálcio com água estéril demonstrou melhor desempenho antimicrobiano sobre o *E. faecalis* em blocos de dentina contaminados. A pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina e com propilenoglicol apresentaram desempenho semelhante, mas muito menor em relação ao veículo água estéril. A pasta com veículo extrato propilenoglicólico de guaçatonga revelou o menor desempenho sobre *E. faecalis* quando comparada às outras pastas utilizadas no experimento, sugerindo que o extrato de guaçatonga obtido em propilenoglicol não poderia servir como veículo para preparo da pasta de hidróxido de cálcio. Avaliando-se o fraco desempenho antimicrobiano da pasta com clorexidina a 1% em propilenoglicol, nos permite colocar que as pastas cujo veículos estavam o propilenoglicol, não apresentaram eficiência antimicrobiana, provavelmente pela perda de capacidade difusiva dos íons hidroxila do hidróxido de cálcio neste veículos.

Ercan et al.(2006) utilizando um modelo de experimento *in vitro* com dentes, revelaram que a clorexidina gel a 2% mostrou melhor eficiência para inibir *E. faecalis* e *Candida albicans* quando comparada com a pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  pura ou acrescida de 2% de clorexidina. Os estudos de Gomes et al., 2002, onde pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  foram avaliadas *in vitro* com diferentes veículos frente à vários microrganismos, revelaram que as pastas com paramonoclorofenol acrescido de glicerina e paramonoclorofenol puro demonstraram melhor eficiência na inibição das estirpes sendo que a linhagem que apresentou melhor zona de inibição foi a *P. endodontalis* e a menor zona de inibição foi *E. faecalis*.

A atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio se dá pela liberação de íons hidroxila e conseqüente aumento de pH, podendo atingir 11 a 12,5 (ESTRELA et al., 1998). Os efeitos letais desses íons hidroxila sobre as células bacterianas, devem-se principalmente, aos danos ocasionados na membrana citoplasmática, a

desnaturação de proteínas e danos diretos ao DNA (SIQUEIRA et al., 1999). Para ser efetivo contra bactérias localizadas dentro do túbulo dentinário, os íons hidroxila do hidróxido de cálcio devem difundir-se na dentina em concentrações suficientes para sobrepujar seu efeito tampão e conseqüentemente, aumentar drasticamente o pH local.

As pastas de hidróxido de cálcio em diferentes veículos e concentrações tem sido o material de escolha como medicação intracanal por seu alto poder alcalinizante criando um ambiente desfavorável ao crescimento bacteriano. Apesar de sua ampla utilização, o hidróxido de cálcio não tem demonstrado eficácia sobre algumas cepas de microrganismos “*in vivo*”.

Novas alternativas têm sido buscadas para o emprego na terapia endodôntica como a utilização de produtos naturais como o própolis. Novos veículos para pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$ , como por exemplo, fitoterápicos, devem ser testados com o objetivo de avaliar uma provável potencialização da pasta para eliminar *E. faecalis* de canais radiculares.

## 7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e nas condições experimentais utilizadas neste estudo, dentre as testadas em dentina bovina contaminada com *E. faecalis*: podemos concluir que:

1. A pasta de hidróxido de cálcio com veículo água destilada estéril apresentou melhor desempenho antimicrobiano sobre células de *E. faecalis* em blocos de dentina contaminados.
2. A pasta de hidróxido de cálcio com veículo de extrato propilenoglicólico de guaçatonga apresentou desempenho antimicrobiano inferior ao esperado sobre células de *E. faecalis* em blocos de dentina contaminados.

**UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO**

**CAIO MARINHO MELLO**

**COMPARING THE ANTIMICROBIAN EFFICACY OF  
DIFFERENT CALCIUM HYDROXIDE PASTES ON  
DENTINABOVINA BLOCKS INFECTED WITH  
*enterococcus faecalis*: STUDY ON CONFOCAL  
MICROSCOPE LASER SCANNING**

Bauru  
2011

## ABSTRACT

*Enterococcus faecalis* are grampositivos coccus, ellipsoid, in short chains, facultative anaerobes, inhabitants of the intestinal and genital tracts and of the human and animal oral cavity. They can cause a very large range of diseases on man such as cystitis, endocarditis and wound infections. The *E.Faecalis* has a high prevalence in persistent endodontic infections being commonly associated with asymptomatic cases. Its ability to cause periradicular disease depends on its ability to survive and persist as a pathogen in the root canal and dental tubules. It is a concern of the surgeon dentist a thorough sanitation of the root canal system by the application of antiseptic medication between sessions. Among these medications, the calcium hydroxide pastes have been widely used. Facing this issue, this study has aimed to compare the efficiency of in vitro antimicrobial activity of different calcium hydroxide pastes against *E. Faecalis*. The tests were run on 49 dentin blocks infected with *E.Faecalis* and treated with calcium hydroxide pastes in different vehicles for a week. The efficiency of the pastes was evaluated by the confocal microscope laser scanning. The test of Kruskal-Wallis was used to produce the comparison of the pastes and the test of Dunn was used to produce individual comparisons with significance level set at 5% ( $p < 0,05$ ). The paste that showed better antimicrobial performance was that whose vehicle was sterile distilled water. The calcium hydroxide paste associated to the propylene glycol extract of guacatonga has not shown any antimicrobial performance on the cells of *E.Faecalis*

**Key words:** Calcium hydroxide. Chlorhexidine. Guacatonga. Enterococcus faecalis. Confocal laser microscopy

## REFERÊNCIAS

- ABSY, M.L.; SCAVONE, O. **Sobre a morfologia e anatomia *Casearia syvestris*** **Sw. Bot. Zool. e Biol.**, São Paulo, n. 30, p. 641-676, 1973.
- CORREA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Nacional, v. 3, p. 514-516, 1984.
- CWIKLA, S.J. et al. Dentinal tubule disinfection using three calcium hydroxide formulations. **J Endodon**, v.31, n.1, p.50-2, 2004.
- ERCAN, E.; DALLI, M.; DÜLGERGIL, T. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.102, n.2, p.27-31, 2006.
- ERVA-DO-SÍTIO. **Guaçatonga**. Disponível em: <<http://www.ervadositio.com.br>>. Acesso em: 20 abr.2001.
- ESTRELA, C.; PIMENTA, F.C.; ITO, I.I.; BAUMMANN, L.L. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. **J Endodon**, v.24, p.15-7, 1998.
- EVANS, D.M. et al. Mechanism involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int Endod J**, v.35, n.3, p.221-8, Mar 2002.
- EVANS, D.M.; BAUMGARTNER, J.C.; KHEMALEELAKUL, S.; XIA, T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. **J Endodon**, v.29, n.5, p.338-9, 2003.
- FABRICIUS et al. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. **Scand J Dent Res**, v.90, p.200-206. 1982.
- GOMES, B.P.F.A. de et al. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. **J Endodon**, v.28, n.11, p.758-61, 2002.
- HARBONE, J.B.; BAXTER, H. **Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants**. London: Taylor & Francis, 1995.
- JASZCZERSKI, J.C. **Flacourtiaceae D. C. de Estado do Paraná**. 1987. Mestrado (Dissertação em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1987.

KAYAOGLU, G.; ØRSTAVIK, D. **Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease.** **Crit Rev Oral Biol Med** 15(5): p. 308-20, 2004.

KLEIN, R.M.; SLEUMER, H.O. Flacourtiaceae. In: REITZ, R. **Flora ilustrada catarinense.** Itajaí: UNIVALI, 96 p., 1984.

KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico microbiológico. Texto e atlas colorido.** 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1465 p., 2001.

MURRAY, P.R. et al. **Medical microbiology.** 3<sup>rd</sup> ed. St. Louis: Mosby-Year Book Inc., 719 p., 1998.

NAGESHWAR, R.R.; KIDIYOOR, H.K.; HEGDE, C. Efficacy of calcium hydroxide-chlorhexidine paste against *Enterococcus faecalis* – An in vitro study. **Endodontology**, v.16, p.61-4, 2004.

PINHEIRO, E.T. et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Int. Endod. J.**, v.36, n.1, p.1-11, 2003.

RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F. JR; SANTOS, K.R.N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J. Endod.**, v.30, n.5, p.315-20, 2003.

SCHÄFER, E.; BÖSSMANN, K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. **J Endodon**, v.31, n.1, p.53-6, 2004.

SILVA JR, A.A. **Plantas medicinais e aromáticas.** Itajaí: Governo de Santa Catarina/S.A.D.R./ E.C.P.A.E.R.- SC, 1997.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

SIQUEIRA, J.F. JR; LOPES, H.P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **Int Endod J**, v.32, p.361-9, 1999.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.85, n.1, p.85-93, 1998.

TANOMARU, J.M.G. et al. In vitro antimicrobial activity of different gutta-percha points and calcium hydroxide pastes. **Braz Oral Res**, v.21, n.1, p.35-9, 2007.

TESK, M.; TRENTINI, A.M.M. **Compêndio de fitoterapia**. 4. ed. Curitiba: Editora Herbarium, 2001.

TORRES, R.B.; YAMAMOTO, K. Taxonomia das espécies de *Casearia* jacq. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 9, p. 239-258, 1986.

VICKERY, M.L.; VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. Hong Kong: The Macmillan Press, 1981.

WEIGER, R. et al. Microbial flora of sinus tracts and root canals of non-vital teeth. **Endod Dent Traumatol**, v.11, p.15-19, 199