

**UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO**

**ALINE DOMINGUES CAMILOTI**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO  
ASSOCIADO A *Bambusa textilis* USADO COMO  
CURATIVO DE DEMORA**

BAURU  
2014

**ALINE DOMINGUES CAMILOTI**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO  
ASSOCIADO A *Bambusa textilis* USADO COMO  
CURATIVO DE DEMORA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião Dentista, sob orientação da Profa. Dra. Sara Nader Marta.

BAURU  
2014

Camiloti, Aline Domingues.

C183a

Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio associado a Bambusa Textilis usado como curativo de demora / Aline Domingues Camiloti -- 2014.

21f.

Orientadora: Profa. Dra. Sara Nader Marta.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Hidróxido de cálcio. 2. Bambusa Textilis. 3. Atividade antimicrobiana. I. Marta, Sara Nader. II. Vivan, Rodrigo Ricci. III. Título.

**ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Ata de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Aline Domingues Camiloti.

Ao dia dez de novembro de dois mil e quatorze, reuniu-se a banca examinadora do trabalho apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de ALINE DOMINGUES CAMILOTI: **“Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio associado a Bambusa Textelis usado como curativo de demora.”** Compuseram a banca examinadora os professores Dra. Sara Nader Marta (orientadora), Dr. Rodrigo Ricci Vivan e Dra. Danieli Colaço Ribeiro Siqueira. Após a exposição oral, a candidata foi arguida pelos componentes da banca que se reuniram, e decidiram, aprovada, com a nota 10,0 a monografia. Para constar, fica redigida a presente Ata, que aprovada por todos os presentes, segue assinada pela Orientadora e pelos demais membros da banca.

\_\_\_\_\_  
Dra. Sara Nader Marta (Orientadora)

\_\_\_\_\_  
Dr. Rodrigo Ricci Vivan (Avaliador 1)

\_\_\_\_\_  
Dra. Danieli Colaço Ribeiro Siqueira (Avaliador 2)

**ALINE DOMINGUES CAMILOTI**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO ASSOCIADO A *Bambusa textilis* USADO COMO CURATIVO DE DEMORA**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado ao Centro da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião Dentista, sob orientação da Profa. Dra. Sara Nader Marta.

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Sara Nader Marta  
Universidade do Sagrado Coração

---

Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan  
Universidade de São Paulo

---

Profa. Dra. Danieli Colaço Ribeiro Siqueira  
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 11 de novembro de 2014.

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais Ivone e Antônio, nos quais não mediram esforços para fazer com que chegasse onde cheguei, agradeço à Deus por tê-los como pais, por tê-los como exemplo, pessoas nas quais devo minha vida e toda minha gratidão. Amo vocês eternamente.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter feito na minha vida sempre o que foi melhor pra mim. Na minha caminhada ate chegar aqui esteve sempre comigo, me mostrando os melhores caminhos pra seguir.

Aos meus pais Ivone e Antônio que me apoiaram desde o principio, se esforçaram para que o meu sonho de me formar se realizasse. A todo momento estiveram comigo me apoiando e me fazendo cada dia mais forte e mais madura.

Ao meu namorado Alex pelo seu companheirismo e fidelidade, me acompanhando no meu final de faculdade e espero pra vida toda. Orgulho-me da pessoa que vem se tornando e agradeço a deus por isso. Quero continuar crescendo como pessoa e profissionalmente junto com ele, que Deus nos torne cada dia mais capaz de enfrentar as dificuldades juntos, que possamos nos servir de alicerce um para outro. Agradeço a Deus por tê-lo colocado na minha vida.

E claro não poderia me esquecer das pessoas que fizeram dos meus 4 anos de faculdade os melhores anos. Anos nos quais nunca deixara de existir no meu coração, sempre serão lembrados com maior alegria. Meu Deus, como foi bom! Aos meus amigos Alana, Mylena, Tatiane, Jessica, Luana, Flavia, Gilberto, Maria Eduarda. A cada um de vocês que foram minha família, amigos, companheiros. Hoje peço a Deus que abençoe o futuro de vocês, a caminhada a partir de agora, afinal não estaremos tão juntos mais, nossa rotina nos afastará, mas espero do fundo do meu coração que nossa amizade continue, pois vocês são muito importante pra mim. Que vocês se tornem ótimos profissionais, que amem o que façam e ajam sempre com honestidade, responsabilidade e dedicação em todos os momentos e eu sei que farão! Porque são meus amigos e eu conheço cada um de vocês, cada defeito, qualidade, e sei que serão os melhores. Vocês me faram muita falta. Estarão com certeza guardados na melhor parte do meu coração e nas melhores lembranças. Amo cada de vocês.

Aos professores Rodrigo pela sua dedicação, esforço e carinho para a realização desse trabalho, a professora Sara pelo a sua atenção, prontidão e a enorme admiração que tenho da grande profissional que é e me espelho, ao professor Paulo que nos acompanhou e ajudou a realizar o trabalho, a professora Daniela que desde já agradeço por fazer parte da minha banca e admiro sua experiência e dedicação como profissional e companheira da nossa turma.

E a todos os professores, nas quais sem eles hoje com certeza não estaria aqui, pela dedicação, empenho, esforço, pelas broncas, enfim por tudo que nos foi apresentado ate hoje devo a todos vocês nossos professores. Agradeço por tudo, estarão sempre guardados meu coração.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

Leonardo da Vinci

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de pastas de hidróxido de cálcio associado a *Bambusa textilis*. Foi utilizada a técnica de difusão radial. As bactérias testadas foram de linhagens de campo e 1 ATCC, sendo uma estirpe de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. As estirpes foram ativadas sobre a superfície de placas de Brucella agar suplementado com 5% de sangue de carneiro incubadas a 36°C por 24 horas. A partir dessas placas, 5 colônias foram transferidas para um tubo contendo 5 mL de caldo BHI que foi incubado a 36°C “overnight”. Placas de Petri foram escavadas em poços com 5 mm de diâmetro por 3 mm de profundidade. Uma vez ajustada a densidade do inóculo, a semeadura foi feita. As placas foram colocadas em estufa por 30 minutos para secagem da superfície do meio de cultura antes da colocação das pastas, sendo: G1: hidróxido de cálcio + 20% de *Bambusa textilis*; G2: hidróxido de cálcio + 10% de *Bambusa textilis*; G3: hidróxido de cálcio; G4: *Bambusa textilis*; G5: clorexidina 2%. Os poços foram preenchidos com as pastas por meio de seringas tipo Luer-Look e as placas foram deixadas 2 horas em temperatura ambiente para pré-incubação. Após, foram incubadas em estufa bacteriológica a 36°C, sob condições atmosféricas adequadas por 24 horas. Os halos de inibição foram mensurados com auxílio de um paquímetro digital. Os resultados demonstraram que nenhuma substância apresentou atividade antimicrobiana, com exceção do grupo controle (clorexidina 2%). Com base na metodologia empregada, pode-se concluir que nenhuma substância apresentou atividade antimicrobiana frente ao *Enterococcus faecalis*.

**Palavras-chaves:** Hidróxido de cálcio. *Bambusa textilis*. Atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the antimicrobial activity in vitro of calcium hydroxide paste associated with *Bambusa textilis*. . It was used the technique of radial diffusion. The bacteria tested were of field strains and 1 ATCC, being a strain of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Strains have been activated on the surface of plates of Brucella agar supplemented with 5 sheep blood incubated at 36oC by 12:0 am. From these plates, 5 colonies were transferred to a tube containing 5 mL of BHI broth which was incubated at 36oC "overnight". Petri dishes were excavated in wells with 5 mm diameter by 3 mm deep. Once adjusted the inoculum density, sowing was made. The plates were placed in an oven for 30 minutes to dry the surface of the culture medium prior to placement of the folders, being: G1: calcium hydroxide 20 of *Bambusa textilis*; G2: calcium hydroxide 10% of *Bambusa textilis*; G3: calcium hydroxide; G4: *Bambusa textilis*; G5: chlorhexidine 2. The wells were filled with the folders through syringes Luer-type Look and the plates were left 2:0 at room temperature for preincubation. After, were incubated in an oven under the bacteriological 36oC weather conditions suitable for 12:0 am. The halos of inhibition were measured with the aid of a digital caliper. The results showed that no substance presented antimicrobial activity, with the exception of the control group (chlorhexidine 2). Based on the methodology used, it can be concluded that no substance presented antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*.

**Keywords:** Calcium hydroxide. *Bambusa textilis*. Antimicrobial activity.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO/REVISAO DE LITERATURA</b>	9
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	16
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	17
3.1	MATERIAL	17
3.2	PREPARAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL	17
3.3	MÉTODO EXTRATIVO	17
3.4	FRACIONAMENTO LÍQUIDO-LÍQUIDO	18
3.5	CONCENTRAÇÃO/SECAGEM	18
3.6	DIFUSÃO RADIAL	18
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	20
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	21
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	23
	<b>REFERÊNCIAS</b>	24

## 1 INTRODUÇÃO/REVISÃO DE LITERATURA

A endodontia vem sofrendo um processo de evolução muito grande nos últimos anos. Assim, procedimentos que eram realizados de forma empírica, hoje estão alicerçados em bases científicas, procurando apoiar-se nas respostas biológicas e no conhecimento de como os materiais utilizados nos tratamentos interagem com os tecidos apicais e periapicais. (LEONARDO, 2005).

O hidróxido de cálcio  $\text{Ca(OH)}_2$  caracteriza-se como um pó branco, alcalino (pH 12,8), pouco solúvel em água (solubilidade de  $1,2 \text{ g L}^{-1}$  de água, à  $25^\circ\text{C}$ ). É obtido pela calcinação do carbonato de cálcio, até sua transformação em óxido de cálcio que, após hidratação resulta em hidróxido de cálcio. (ESTRELA et al., 1995). Baseado no peso molecular da substância, a porcentagem de íons hidroxila e íons cálcio encontrados no  $\text{Ca(OH)}_2$  corresponde a 45,89% e 54,11%, respectivamente. (ESTRELA, PESCE, 1996).

Em Endodontia o hidróxido de cálcio tem sido utilizado em pulpotomias, tratamento de perfurações radiculares, como componente de cimentos obturadores e como medicação intracanal, sendo que quando utilizado nesta última situação, é associado a um veículo com a finalidade de se obter a consistência de pasta. Assim, diferentes veículos têm sido propostos para associação ao  $\text{Ca(OH)}_2$ . (ESTRELA et al., 2001).

O emprego do  $\text{Ca(OH)}_2$  em casos de necrose pulpar tem o propósito de promover ação anti-séptica sobre micro-organismos, além da ação biológica, atributos que são conseguidos pelo elevado pH através da liberação de íons hidroxila e liberação de íons cálcio, respectivamente.

A atividade antimicrobiana do  $\text{Ca(OH)}_2$  está relacionada a liberação de íons hidroxila. Estes íons hidroxila são radicais livres altamente oxidantes que reagem com inúmeras biomoléculas.

Siqueira e Lopes (1999) revelaram que os mecanismos de atividade antimicrobiana do  $\text{Ca(OH)}_2$  são caracterizados pelos danos diretos a membrana citoplasmática bacteriana, desnaturação protéica e danos ao DNA bacteriano.

Recentes estudos revelaram a classificação e indicações clínicas de várias formulações de pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$ . (ESTRELA et al., 1999; FAVA et al., 1999).

Gomes et al. (2002), revelaram que a atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  foi influenciada pelo tipo de veículo utilizado, sendo que a melhor atividade antimicrobiana foi obtida com veículos oleosos.

Evans et al. (2003), avaliando a atividade antimicrobiana de duas pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  em dentina bovina contaminada com *Enterococcus faecalis*, revelaram a melhor eficiência da pasta com veículo clorexidina a 2%.

Sirénet et al. (2004), avaliaram o efeito antibacteriano do  $\text{Ca(OH)}_2$  combinado com clorexidina e com iodo-iodeto de potássio sobre uma linhagem padrão de *E. faecalis*. Os resultados deste estudo revelaram a efetividade na desinfecção de dentina bovina contaminada quando o  $\text{Ca(OH)}_2$  foi adicionado de clorexidina ou iodo-iodeto de potássio.

Pacioset et al. (2004), avaliando a influência de seis diferentes veículos (água destilada, clorexidina, propilenoglicol, solução anestésica, paramonoclorofenol canforado e paramonoclorofenol canforado + propilenoglicol) sobre o pH de pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  *in vivo* e *in vitro*, revelaram que em ambas condições o pH manteve-se constante durante todas as variáveis de tempo analisadas, sendo que a pasta cujo veículo foi água destilada mostrou-se com pH superior em condição clínica.

Schäfer e Bössmann (2004) compararam a atividade antimicrobiana da clorexidina pura com duas diferentes pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$ : uma comercial e outra cujo veículo foi clorexidina em proporção igual peso:peso, sobre dentina humana contaminada com *E. faecalis* ATCC 6057. Neste estudo os pesquisadores revelaram que clorexidina pura mostrou-se mais eficiente quando comparada a pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  com veículo clorexidina na desinfecção da dentina contaminada. Pesquisa semelhante realizada por Ercanet al., 2006, revelou que a clorexidina gel a 2% foi mais efetiva na eliminação de *E. faecalis* e *Candida albicans* quando comparado com as pastas de com veículo água estéril e clorexidina 2%.

A desinfecção de túbulos dentinários humanos infectados com *E. faecalis* ATCC 29212 por três diferentes pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  (veículo água, veículo iodo-iodeto de potássio e pasta Metapex, esta última contendo iodofórmio e óleo de silicone) foi avaliada por Cwikla et al. (2005). Este estudo demonstrou que a pasta Metapex revelou melhor atividade antibacteriana quando comparado às outras pastas.

A avaliação *in vitro* da susceptibilidade de patógenos endodônticos a pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  combinadas com diferentes veículos foi demonstrada por Vianna et al. (2005). Neste estudo as pastas foram preparadas com veículo água estéril, glicerina, paramonoclorofenol canforado, paramonoclorofenol canforado + glicerina, polietilenoglicol e paramonoclorofenol canforado + polietilenoglicol. Bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas foram mais resistentes ao  $\text{Ca(OH)}_2$  e o tempo necessário para a eliminação dos micro-organismos variou de 4 a 24 horas. Bactérias anaeróbias foram eliminadas dentro de 5 minutos ou menos. *E. faecalis* e *C.albicans* foram os micro-organismos mais resistentes frente as pastas utilizadas.

Avaliando a influência do iodofórmio no potencial antimicrobiano de pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$ , Estrela et al. (2006), revelaram que as pastas com solução salina e com iodofórmio e salina mostraram significativa atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis*, *Pseudomonasaeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *C. albicans* pelos métodos do contato direto e difusão da substância sobre placas de ágar.

Com o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana residual de várias pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  após permanecerem 21 dias em canais radiculares de cães com lesões periapicais, Soares et al. (2007), utilizaram o método da difusão sobre placas de agar Mueller-Hinton contaminadas com *Micrococcus luteus* ATCC 9341a partir das pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  com veículo solução anestésica e clorexidina a 2% e as pastas Calen<sup>®</sup> e Calen<sup>®</sup> + paramonoclorofenol canforado. A pasta de melhor atividade antibacteriana residual foi aquela cujo veículo foi digluconato de clorexidina a 2%.

Rezende et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana de duas pastas de hidróxido de cálcio associadas a extrato etanólico e não etanólico de própolis. Submeteram culturas polimicrobianas de molares decíduos necrosados ao teste de difusão sobre placas de ágar cérebro e coração em atmosfera anaeróbica. Ambas pastas apresentaram zonas de inibição maiores quando comparadas ao grupo controle com pasta de veículo propilenoglicol.

A atividade antimicrobiana de diferentes pastas de hidróxido de cálcio frente a *C. albicans*, *Streptococcus mutans*, *E. faecalis*, *St. sobrinus*, *St. sanguis*, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* foi avaliada pelo método da difusão por Souza-Filho et al., 2008. Os autores utilizaram no estudo as pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$ + clorexidina gel 2%,  $\text{Ca(OH)}_2$  + clorexidina gel 2% + iodofórmio,  $\text{Ca(OH)}_2$  + clorexidina gel 2% + óxido de zinco e  $\text{Ca(OH)}_2$  + água. Os resultados revelaram que todas as pastas demonstraram alguma atividade antimicrobiana sobre os micro-organismos testados. *C. albicans*, *E. faecalis* e *St. sanguis* foram os micro-organismos mais resistentes. *St. mutans* revelou grandes zonas de inibição no experimento.

Silveira et al. (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana da pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  combinada com clorexidina e outras substâncias contra *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *St. mutans*. Os autores utilizaram pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  + clorexidina gel 2%,  $\text{Ca(OH)}_2$  + paramonoclorofenol canforado + propilenoglicol,  $\text{Ca(OH)}_2$  + propilenoglicol e  $\text{Ca(OH)}_2$  + solução salina. Utilizaram o teste de diluição em caldo de cultura e quantificaram o tempo necessário para as pastas inibirem o crescimento bacteriano. Os resultados revelaram que as pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  + paramonoclorofenol canforado + propilenoglicol e  $\text{Ca(OH)}_2$  + propilenoglicol eliminaram todas as células bacterianas em 15 segundos. A pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  +

clorexidina gel 2% necessitou de 45 segundos para eliminar *S. aureus* e *E. faecalis*. A pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  + solução salina necessitou de 45 segundos para eliminar *E. faecalis*. Assim, pode-se concluir que *E. faecalis* foi a bactéria mais resistente, seguido pelo *S. aureus*.

A susceptibilidade do *E. faecalis* frente a pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  e aos antibióticos amoxicilina + clavulanato de potássio, ciprofloxacina, clindamicina e doxiciclina foi avaliada *in vitro* em dentes humanos por Saber et al. (2012). Dentes pré-molares mandibulares humanos foram instrumentados, autoclavados e contaminados com um isolado clínico de *E. faecalis* para que houvesse a formação de biofilme, revelado por microscopia eletrônica de varredura nos intervalos de três, dez, vinte e trinta dias. Os medicamentos foram preparados pela concentração inibitória mínima para *E. faecalis* na forma de pastas e introduzidos nos canais infectados. Após uma semana, cones absorventes foram utilizados para coleta dos espécimes e contagem através de cultura bacteriológica. Os resultados revelaram que nenhum dos antibióticos e nem a pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  foram eficazes na eliminação do biofilme. Porém, todos os antibióticos foram mais eficazes na redução do número de Unidades Formadoras de Colônias  $\text{mL}^{-1}$  quando comparados a pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$ . O efeito antimicrobiano da amoxicilina + clavulanato de potássio, ciprofloxacina e clindamicina foi, estatisticamente melhor, em relação ao efeito da doxiciclina.

Outros estudos comparando a atividade do  $\text{Ca(OH)}_2$  com antibióticos são encontrados na literatura, como o estudo de Pavaskar et al. (2012) onde os pesquisadores compararam a efetividade da linezolida em relação ao  $\text{Ca(OH)}_2$ . Num estudo *in vitro* utilizando dentes humanos pré-molares, instrumentados e contaminados com células planctônicas de *E. faecalis* ATCC 29212, os pesquisadores revelaram que após o tratamento dos espécimes por três, oito e quatorze dias com  $\text{Ca(OH)}_2$ , Vitapex, linezolida e  $\text{Ca(OH)}_2$  + linezolida, somente linezolida mostrou-se eficaz na eliminação do *E. faecalis*, seguida pela associação de  $\text{Ca(OH)}_2$  + linezolida.

A atividade antimicrobiana do  $\text{Ca(OH)}_2$  se dá pela liberação de íons hidroxila e consequente 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). Esta atividade também é resultante da presença de cálcio que remove gás carbônico, fonte respiratória de bactérias anaeróbias. (KONTAKIOTIS et al., 1995). Outro importante fator está no fato do  $\text{Ca(OH)}_2$  inibir o lipopolissacarídeo, componente agressor presente na membrana externa da parede de bactérias Gram negativas. (SAFAVI, NICHOLS, [1995?]; TANOMARU-FILHO et al., 2003).

Para ser efetivo contra bactérias localizadas dentro do túbulo dentinário, os íons hidroxila do  $\text{Ca(OH)}_2$  devem difundir-se na dentina em concentrações suficientes para sobrepular seu efeito tampão e conseqüentemente, aumentar drasticamente o pH local.

As pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  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, esta substância não tem demonstrado eficácia sobre algumas cepas de micro-organismos “*in vivo*”. Um desses micro-organismos é o *E. faecalis*.

O *E. faecalis* é um coco Gram positivo presente principalmente em casos de insucesso endodôntico que tem mostrado elevada resistência ao  $\text{Ca(OH)}_2$ . (SANDQVIST et al., 1998; ROÇAS et al., 2004).

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; ORSTAVIK, 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; ORSTAVIK, 2004).

A recuperação frequente 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).

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  $\text{Ca(OH)}_2$ . (WEIGER et al., 1995; EVANS et al., 2002).

Evans et al. (2002), verificaram que a resistência desse microrganismo ao  $\text{Ca(OH)}_2$  está relacionada a uma bomba de próton.

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

Há uma busca incessante pela busca de agentes fitoterápicos na medicina e odontologia. Dentro da endodontia, busca-se uma substancia que potencialize os efeitos

biológicos e antimicrobianos do hidróxido de cálcio como curativo de demora. Outras plantas já foram testadas, como a *Artium lappa* (GENTIL et al., 2006), *Pothomorphe umbellata* (GARCIA et al., 2011; MARQUES et al., 2011) e a *Casearia sylvestris* Sw. (WECKWERTH et al., 2008; DUARTE et al., 2009).

Algumas espécies de bambus, conforme recente pesquisa científica realizada na China, apresentam propriedades farmacológicas encontradas nas folhas. Além de ação antioxidante, há relatos de efeitos anticarcinogênicos. A referida atividade antioxidante foi atribuída principalmente aos flavonóides e ácidos fenólicos, os quais protegem as células da peroxidação, sendo que esta atividade ocorre principalmente em células mais velhas e/ou células injuriadas. Outra propriedade medicinal dos flavonóides refere-se ao fato de reduzir a inflamação, promover a circulação e inibir reações alérgicas. (CUSACK, 1999; DHARMANANDA, 2004). Tem sido relatado, que diferentemente dos outros vegetais, o bambu apresenta elevados níveis de acetilcolina, que consiste em um neurotransmissor de animais e humanos, porém sua ação em vegetais ainda é desconhecida. (DHARMANANDA, 2004). Há pesquisas investigando a atividade anti-tumoral de frações de polissacarídeos preparados a partir das folhas do bambu. (HIDALGO-LOPEZ, 2003).

No Brasil, algumas espécies de bambus são de ocorrência muito comum, como é o caso da *Bambusa vulgaris*, cujos brotos são considerados estomáquicos, depurativos e antidesintéricos (CORRÊA, 1984), e da *Bambusa bambos*, a qual é utilizada no tratamento de algumas doenças sob forma de extratos fitoterápicos. (MASUD RANA; KHANAM; ASAD-UD-DAULA, 2004).

Recentemente, estudos envolvendo a atividade de alguns componentes biológicos presentes nas folhas de bambu e seus potenciais benefícios foram avaliados, verificando assim que os extratos de folhas, ricos em polissacarídeos, possuem a capacidade de inibir tumor em murinos, além de estimular a atividade fagocítica dos macrófagos peritoneais. (LU et al., 2005).

Estudos que vêm sendo relatados e que podem futuramente significar avanço no meio científico são com relação ao poder anti-tumoral desta planta medicinal. Através de estudos “in vivo”, utilizando camundongos albinos inoculados com o tumor ascítico de Ehrlich, foi comprovada a inibição do crescimento tumoral na faixa de 81,9%. Neste referido estudo foram empregadas doses diárias de 20 mg.kg<sup>-1</sup> i.p., obtidas a partir do extrato das raízes do vegetal *Bambusa bambos*. (MASUD RANA; KHANAM; ASAD-UD-DAULA, 2004).

A espécie vegetal *Bambusa textilis* é nativo da China e caracteriza-se por ser um bambu de médio porte, com colmos que crescem acima de 15 metros de altura, e seu diâmetro

pode chegar até os 5 metros, são eretos e desprovidos de ramificações, com diâmetro que varia de 3 a 5 cm, e folhas lanceoladas. As folhas podem ser observadas como pequenas e delicadas, porém são capazes de resistir à ação do tempo. Existe ainda pouca informação sobre florescência e frutificação de tal espécie. No país o vegetal é empregado como planta ornamental e utensílios de cozinha, (DRANSFIELD; WIDJAJA; RENUKA, 1995) e também na elaboração de medicamentos, pois se trata de uma fonte importante de resinas, sendo, portanto utilizadas por seu poder antiinflamatório, anticatarral, anticonvulsivante e antitérmico. As fibras da planta são consideradas fortes e flexíveis, sendo esta planta utilizada para fins de tecelagem. O vegetal descrito possui ainda 8 variedades, Albostriata, Anão, Glabra, Gracilis, Kanapaha, Maculata, Mutabilis e Scranton. (AZZINI, CIARAMELLO, 1971; LIESE, 1992; DHARMANANDA, 2004; MEREDITH, 2009).

Sabe-se, também, que as respostas biológicas e antimicrobianas de um material estão na dependência de algumas de suas propriedades físico-químicas. Uma vez que o material apresente um pH compatível com o organismo, liberação de íons cálcio e hidroxila, solubilidade e tempo de presa satisfatórios, e um bom selamento marginal, esse material apresentará boas propriedades biológicas. Diante disso, torna-se necessário a realização de testes físico-químicos para esclarecer e corroborar com os resultados biológicos.

O pH e a liberação de íons cálcio são propriedades importantes, uma vez que estão diretamente relacionadas com os processos de mineralização e atividade antimicrobiana (SEUX et al., 1991; ESTRELA et al., 1994; PARIROKH et al., 2010), além da atividade antimicrobiana. (KONTAKIOTIS et al., 1995).

Não há relatos na literatura sobre a utilização da *Bambusa textilis* como curativo de demora em endodontia, assim como da associação com o hidróxido de cálcio. Diante do exposto sobre as propriedades da *Bambusa textilis*, e das ótimas propriedades biológicas e antimicrobianas do hidróxido de cálcio, já relatadas na literatura, fica a dúvida sobre a associação dos materiais, na tentativa de potencializar as propriedades antimicrobianas do hidróxido de cálcio frente ao *Enterococcus faecalis*.

O propósito da presente pesquisa foi avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio associado a *Bambusa textilis* em diferentes proporções, para possibilitar alternativas ao clínico que exerce a Endodontia em potencializar a ação biológica e antimicrobiana do hidróxido de cálcio.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana, pelos métodos de difusão radial de pastas de hidróxido de cálcio associado a *Bambusa textilis* em diferentes proporções, para possibilitar alternativas ao clínico que exerce a Endodontia em potencializar a ação biológica e antimicrobiana do hidróxido de cálcio.

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana, pelos métodos de difusão radial e contato direto de pastas de hidróxido de cálcio associado a *Bambusa textilis* em diferentes proporções, - Hidróxido de cálcio + 20% de *Bambusa textilis* (experimental); - Hidróxido de calico + 10% de *Bambusa textilis* (experimental); - Hidróxido de calico (controle); - *Bambusa textilis* (controle); - Clorexidina 2%;

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MATERIAL

Os materiais testados foram pastas de hidróxido de cálcio associado à *Bambusa textilis*, os quais foram associados em massa, conforme a tabela 1. Todos os grupos foram manipulados com o propilenoglicol como veículo.

Figura 1 - Grupos experimentais

Grupos	Cimentos
Grupo 1	Hidróxido de cálcio + 20% de <i>Bambusa textilis</i>
Grupo 2	Hidróxido de cálcio + 10% de <i>Bambusa textilis</i>
Grupo 3	Hidróxido de cálcio
Grupo 4	<i>Bambusa textilis</i>
Grupo 5	Clorexidina 2%

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL

O material coletado fresco do campus da UNESP de Bauru, gentilmente cedidas pelo professor Prof. Dr. Marco Antônio Pereira, foi submetido aos processos de secagem e subsequente moagem. A secagem foi realizada em estufa de bandejas com circulação de ar e temperatura controladas (inferior à 60°C) para permitir maior evaporação de umidade residual responsável pela contaminação do material. A moagem foi realizada por meio do uso de moinho de facas (WHILEY) com malha de 1,5 mm.

#### 3.3 MÉTODO EXTRATIVO

Foram extraídos através do método de Soxhelt, 250 g do pó moído, utilizando metanol como solvente extrator (temperatura de 60 a 80°C) durante 4 horas. Após este procedimento a solução resultante foi filtrada a vácuo com o auxílio do funil de Buchner para a obtenção de um líquido mais clarificado. A solução filtrada foi utilizada no processo de fracionamento

líquido-líquido com outros solventes. (MASUD RANA; KHANAM; ASAD-UD-DAULA, 2004).

### **3.4 FRACIONAMENTOS LÍQUIDO-LÍQUIDO**

Com o auxílio de um funil de separação a solução obtida anteriormente foi fracionada em duas partes com o auxílio dos seguintes solventes: acetato de etila e clorofórmio. Volumes iguais de soluções foram adicionados ao funil de separação, realizando-se o processo de partição. Este método foi repetido por duas vezes com a mesma quantidade de solvente tendo por finalidade permitir maior extração dos constituintes ativos. (MASUD RANA; KHANAM; ASAD-UD-DAULA, 2004).

### **3.5 CONCENTRAÇÃO/SECAGEM**

As soluções obtidas na etapa anterior foram concentradas com o auxílio de um rotaevaporador a vácuo, sendo posteriormente submetidas ao processo de secagem com circulação de ar forçada (à temperatura inferior à 60° C) para obter um resíduo sólido. (MASUD RANA; KHANAM; ASAD-UD-DAULA, 2004).

### **3.6 DIFUSÃO RADIAL**

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foram avaliadas estirpes de *Enterococcus faecalis*, sendo 1 de campo e 1 ATCC pertencentes à bacterioteca do laboratório de Microbiologia da Universidade do Sagrado Coração – USC, previamente recuperadas por cultura bacteriológica de amostras da cavidade oral de pacientes atendidos no serviço de Endodontia da Clínica de Odontologia da USC – Bauru – SP. Todas as estirpes encontram-se congeladas a – 20°C e foram isoladas em meio M-Enterococcus ágar (Difco®) e identificadas conforme fluxograma de identificação segundo Koneman et al. (2001).

As estirpes foram ativadas em placas de M-Enterococcus ágar (Difco®) que foram incubadas em estufa bacteriológica a 36°C por 18-24 horas. A partir das placas, colônias foram repicadas para o caldo BHI (Oxoid®) até turvação total do meio.

Para se avaliar a sensibilidade bacteriana aos cimentos estudados, foi utilizada a técnica de difusão radial da substância sobre a superfície de placas de Mueller-Hinton agar.

As bactérias testadas foram de linhagens de campo e 1 ATCC (American Type Culture Collection), sendo uma estirpe de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. As estirpes foram retiradas da bacterioteca e ativadas sobre a superfície de placas de Brucella agar suplementado com 5% de sangue de carneiro incubadas a 36°C por 24 horas. A partir dessas placas, 5 colônias foram transferidas para um tubo contendo 5 mL de caldo BHI que foi incubado a 36°C “overnight”. A partir do crescimento, foi preparado em salina estéril o ajuste para a densidade ótica do padrão de turbidez da escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colônias /mL). Placas de Petri de 100 x 10 mm previamente preparadas com Mueller-Hinton agar (Merck®) na espessura de 6 mm foram escavadas em poços com 5 mm de diâmetro por 3 mm de profundidade. Uma vez ajustada a densidade do inóculo, a semeadura foi feita através de zaragatoa de algodão estéril na superfície das placas, tomando-se o cuidado de não semear o interior das escavações. As placas foram colocadas em estufa por 30 minutos para secagem da superfície do meio de cultura antes da colocação das pastas. As seguintes pastas foram utilizadas no teste G1: hidróxido de cálcio + 20% de *Bambusa textilis*; G2: hidróxido de cálcio + 10% de *Bambusa textilis*; G3: hidróxido de cálcio; G4: *Bambusa textilis*; G5: clorexidina 2%.

Os poços foram preenchidos com as pastas através de seringas tipo Luer-Look e as placas foram deixadas 2 horas em temperatura ambiente para pré-incubação. Após, foram incubadas em estufa bacteriológica a 36°C, sob condições atmosféricas adequadas por 24 horas. Os halos de inibição foram mensurados com auxílio de um paquímetro digital, sob intensa luminosidade.

#### 4 RESULTADOS

Dentre os grupos experimentais, nenhum apresentou atividade antimicrobiana frente ao *Enterococcus faecalis*. Somente o grupo controle (clorexidina 2%) apresentou atividade antimicrobiana frente ao *Enterococcus faecalis* (quadro 2).

Figura 2 - Resultados da atividade antimicrobiana dos grupos experimentais e controle frente ao *Enterococcus faecalis*.

<i>Comprimento do halo em 24 horas em meio de cultura (mm)</i>			
	<i>Recipiente</i>	<i>Recipiente</i>	<i>Recipiente</i>
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
<i>Clorexidina 2%</i>	<i>26</i>	<i>27</i>	<i>26</i>
<i>Hidróxido de cálcio com propilenoglicol</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>Hidróxido de cálcio com propilenoglicol + 10% de bambusa</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>Hidróxido de cálcio com propilenoglicol + 20% de bambusa</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>Bambusa pura</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>

Fonte: Elaborada pela autora.

## 5 DISCUSSÃO

Quanto à análise antimicrobiana no presente trabalho, utilizou-se o método de difusão radial, que é um método amplamente utilizado, embora tenha a limitação de oferecer apenas se a substância testada inibe ou não o crescimento microbiano, sem determinar atividade bactericida ou bacteriostática. No entanto é uma metodologia que favorece informações para verificar se deve realizar estudos de concentração inibitória ou bactericida mínimas para se verificar este feito. Outra limitação desta metodologia é o fato das substâncias testadas apresentarem diferentes graus de solubilização, influenciando na atividade antimicrobiana. No entanto, uma forma de diminuir este problema é realizar a pré-incubação das placas, ou seja, deixar 1 (uma) hora em temperatura ambiente com o ágar para baixo para solubilização do material.

No presente trabalho, por utilizar microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos, optou-se por essa metodologia. Outro fator que se optou por essa metodologia é sua facilidade de realização e ser uma metodologia amplamente citada na literatura. (CANALDA et al., 1989; PUMAROLA et al., 1991; PUMAROLA et al., 1992).

Quanto à escolha do material hidróxido de cálcio foram motivadas pelas diversas pesquisas que já comprovam sua atividade antimicrobiana, inclusive do *Enterococcus faecalis*. Devido a isso, o objetivo era correlaciona-lo com a *bambusa textilis* para avaliarmos seu efeito.

Um de muitos estudos que foram realizados sobre a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio procurou identificar nos canais de dentes com polpa necrótica e lesão periapical, a sua microflora com emprego ou não de medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio. Seus resultados mostrou que os dentes que receberam a medicação com hidróxido de cálcio houve uma redução de 77,8 por cento da população microbiana após 1 semana e após 2 semanas apenas uma bactéria foi identificada, o *Enterococcus faecalis*.

Outro estudo observou que o hidróxido de cálcio teve atividade contra o *Enterococcus faecalis*, o que faz crer que fatores locais, como a smear layer, por exemplo e fatores que impedem o contato entre as substancias podem interferir no resultado. Diante desde estudo, constatou que a clorexidina foi a mais efetiva contra o *Enterococcus faecalis*, mostrando logo a seguir o hidróxido de cálcio como mais efetivo, o extrato de própolis e por ultimo o hipoclorito de sódio a 5%. (FILHO et al., 2008)

Alguns outros estudos que também testaram a efetividade do hidróxido de cálcio contra o *Enterococcus faecalis* foram utilizadas diversas associações como: hidróxido de

cálcio com propilenoglicol, hidróxido de cálcio associado com paramonoclorofenol canforado e propilenoglicol, a pasta Calen , a pasta Calen associada ao PMCC e por ultimo o hidróxido associado com anestésico e os resultados relatam que apenas teve halos de inibição para o iodofórmio e propilenoglicol e para a associação de hidróxido de cálcio, PMCC e propilenoglicol. (DOTTO et al., 2006).

## **6 CONCLUSÃO**

Nenhuma das substancias testadas apresentou atividade frente ao *Enterococcus faecalis*.

## REFERÊNCIAS

- AZZINI, A.; CIARAMELLO, D. Bambu como matéria-prima para papel IV: Estudos sobre o emprego de cinco espécies de *Bambusa*, na produção de celulose-sulfato. **Bragantia**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 305-319, maio 1971. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v30n2/15.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2013.
- CALDWELL, D. R. **Microbial physiology and metabolism**. Oxford: Wm C Brown Publishers, 1995.
- CORRÊA, P. M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Editora República dos Estados Unidos do Brasil, 1984. 1v.
- CUSACK, V. **Bamboo World: The Growing and use of clumping Bamboos**. Australia: Kangaroo Press, 1999. p. 208-209. cap. 23.
- CWIKLA, S. J. et al. Dentinal tubule disinfection using three calcium hydroxide formulations. **Journal of endodontics**, Chicago, v. 31, n. 1, p. 50-52, jan. 2005.
- DHARMANANDA S. **Bamboo as Medicine** Director, Institute for Traditional Medicine, Portland, Oregon, 2004.
- DRANSFIELD, S.; WIDJAJA, E. A. **Plant Resources of South-East Asia**. Bamboos, n. 07, p. 56-58, 1995.
- DUARTE, M.A.H. et al. Evaluation of pH and calcium ion release of calcium hydroxide pastes containing different substances. **Journal of endodontics**, Baltimore, v. 35, n. 9, p. 1274-77, Sep, 2009.
- ERCAN,E.; DALLI, M.; DÜLGERGIL, C. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 102, n. 2, p. 27-31, 2006.
- ESTRELA, C. et al Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Brazilian dental journal**., Ribeirão Preto, v. 6, n. 2, p. 85-90, 1995.
- ESTRELA, C. et al Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide pastes. **Brazilian dental journal**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 2, p. 63-72, 1999.
- ESTRELA, C et al Influence of iodoform on antimicrobial potential of calcium hydroxide **Journal of applied oral science**, v. 14, n. 1, p. 33-37, 2006.
- ESTRELA, C.; PESCE, H.F. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions from calcium hydroxide pastes in connective tissue in the dog--Part I. **Brazilian dental journal**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 1, p. 41-46, 1994.
- ESTRELA, C.; SYDNEY, G. B.; BAMMANN, L. L.; FELIPPE Jr., O. Mechanism of the action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Brazilian dental journal**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 2, p. 85-90, 1995.

EVANS, M. D.; BAUMGARTNER, J. C.; KHEMALEELAKUL, S.; XIA, T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. **Journal of endodontics**, v. 29, n. 5, p. 338-339, 2003.

EVANS, M. et al. Mechanism involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **International endodontic journal**, Oxford, v. 35, p. 221-28, mar. 2002.

EVANS, M.D. et al. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. **Journal of endodontics**, v.29, p.338-39, 2003.

FAVA, L. R. G.; SAUNDERS, W. P. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. **International endodontic journal**, Oxford, v. 32, p. 267-282, Jun 1999.

GARCIA, L. et al. Biocompatibility assessment of pastes containing Copaiba oilresin, propolis, and calcium hydroxide in the subcutaneous tissue of rats. **Journal of conservative dentistry**, v.14, n.2, p.108-12, Apr, 2011.

GENTIL, M. et al *In vitro* evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressings. **Phytotherapy research**, v.20, p.184-6, 2006.

GOMES, B. P. F. de A et al. *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. **Brazilian dental journal**, v. 13, n. 3, p. 155-161, 2002.

HIDALGO-LOPES, O. **Bamboo: The gift of the gods**. Colômbia: D'Vinni LTDA, 2003. p. 522-526.

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

KOMAYASHI, T. et al.. Particle size and shape of calcium hydroxide. **Journal of endodontics**, v. 35, n. 6, p. 284-7, 2009.

KONTAKIOTIS, G.; NAKOU, M.; GEORGOPOULOU, M. *in vitro* studies of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. **International endodontic journal**, Oxford, v.28, n.6, p.285-9, Nov. 1995.

LEONARDO, M.R. **Endodontia: tratamento de canais radiculares**. 4 ed. São Paulo. Artes Médicas, 2005.

LEONARDO, M.R. **Endodontia: tratamento de canais radiculares**. 4 ed. São Paulo. Artes Médicas, 2005.

LU, B.; WU, X.; TIE, X. et al. Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part 1: Acute and subchronic toxicity studies on anti-oxidant of bamboo leaves. **Food and Chemical Toxicology**, n.43, p.783-792, 2005.

MARQUES, A.A. et al. Morphological analysis of tissue reaction caused by a new endodontic paste in subcutaneous tissue of rats. **Journal of conservative dentistry**, v.14, n.3,

p.309-13, Jul, 2011.

MASUD RANA, A. Y. K. ; KHANAM, J. A.; ASAD-UD-DAULA, M.; Antineoplastic Screening of Some Medicinal Plants Against Ehrlich Ascites Carcinoma in Mice. **J. Med. Sci.**, p. 142-145, apr./jun. 2004.

MCHUGH PC et al. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. **Journal of endodontics**, 2004;30:218-219.

MEREDITH, T. J. **Timber Press Pocket Guide to: bamboos**. 1<sup>a</sup> edição China, 2009.

PACIOS, M. G. et al. Influence of different vehicles on the pH of calcium hydroxide pastes. **Journal of Oral Science**, v. 46, n. 2, p. 107-111, 2004.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties. **Journal of endodontics**, Baltimore, v. 36, n.1, p. 16-27, Jan 2010.

PAVASKAR, R. et al. An *in vitro* study comparing the intracanal effectiveness of calcium hydroxide- and linezolid-based medicaments against *Enterococcus faecalis*. **Journal of endodontics**, v. 38, n. 1, p. 95-100, 2012.

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.

REZENDE, G. P. da S. R. de et al *In vitro* antimicrobial activity of endodontic pastes with propolis extracts and calcium hydroxide: a preliminary study. **Brazilian dental journal**, v. 19, n. 4, p. 301-305, 2008.

RÔÇAS, I.N., SIQUEIRA-JÚNIOR, J.F., SANTOS, K.R.N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **Journal of endodontics** 2004;30:315-320.

SABER, S. E. M.; EL-HADY, S. A. Development of na intracanal mature *Enterococcus faecalis* biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; an *in vitro* study. **European Journal of Dentistry**, v. 6, p. 43-50, 2012.

SAFAVI, K.E.; NICHOLS, F.C. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. **Journal of endodontics**, Baltimore, v. 19, n. 2, p. 76-8, Feb,1993.

SAFAVI, K.E.;NICHOLS F.C. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. **Journal of endodontics**, Baltimore, v. 20, n. 3, p. 127-9, Mar,1994.

SAIF, S. et al. Effect of irrigants and cementum injury on diffusion of hydroxyl ions through the dentinal tubules. **Journal of endodontics**, Baltimore, v. 34, n. 1, p. 50-2, 2008.

SCHÄFER, E.; BÖSSMANN, K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. **Journal of endodontics**, v. 31, n. 1, p. 53-56, 2004.

SILVEIRA, C. F. de M. et al. Assessment of the antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine paste and other intracanal medications against bacterial pathogens. **European Journal of Dentistry**, v. 5, p. 1-7, 2011.

SIQUEIRA Jr., J. F.; LOPES, H. P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **International endodontic journal**, v. 32, p. 361-369, 1999.

SIRÉN, E. K.; HAAPASALO, M. P. P.; WALTIMO, T. M. T.; ØRSTAVIK, D. *In vitro* antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 112, p. 326-331, 2004.

SOARES, J. A. et al. Residual antibacterial activity of chlorhexidine digluconate and camphorated P-monochlorophenol in calcium hydroxide-based root canal dressings. **Brazilian dental journal**, v. 18, n. 1, p. 8-15, 2007.

SOUZA-FILHO, F. J. de; SOARES, A. de J.; VIANNA, M. E.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; GOMES, B. P. F. de A. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. **Brazilian dental journal**, v. 19, n. 1, p. 28-33, 2008.

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** 1998; 85:85-93.

TANOMARU, J.M. et al. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.36, n.11, p.733-9, Nov, 2003.

VIANNA, M. E.; GOMES, B. P. F. de A.; SENA, N. T.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUZA-FILHO, F. J. de. *In vitro* evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. **Brazilian dental journal**, v. 16, n. 3, p. 175-180, 2005.

WECKWERTH, P. H. et al. Comparação da atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes antibióticos extratos hidroalcoólicos e infusão de *Casearia sylvestris* Swart (Guaçatonga) frente a linhagens de *Enterococcus faecalis* isolados da cavidade oral. **Salusvita**, Bauru, v. 27, n. 2, p. 119- 134, 2008.

WEIGER, R. et al. Microbial flora of sinus tracts and root canals of non-vital teeth. **Endod Dent Traumatol**, v.11, p.15-19, 1995.

DOTTO, S. et al. Avaliação da ação antimicrobiana de diferentes medicações usadas em endodontia. **Journal of dental Science**, v. 21, n. 53, jul./set. 2006.