

EFEITO ANTIBACTERIANO DE PASTAS DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO SOBRE BACTÉRIAS AERÓBIAS FACULTATIVAS

ANTIBACTERIAL EFFECT OF CALCIUM HYDROXIDE PASTES ON FACULTATIVE AEROBIC BACTERIA

Carlos ESTRELA

Professor Titular de Endodontia da F.O./UFG.

Doutor em Endodontia pela F.O./USP

Lili Luschke BAMMANN

Professora Titular de Microbiologia da UFPel - RS.

Doutora em Microbiologia

Gilson Blitzkow SYDNEY

Professor Adjunto de Endodontia da F.O./UFPR.

Doutorando em Endodontia, F.O./USP

Jackeline MOURA

Bioquímica e Especialista em Bacteriologia - IPT/UFG

Estudo do efeito antibacteriano de duas pastas de hidróxido de cálcio, uma associada ao soro fisiológico, e outra ao paramonoclorofenol canforado, sobre culturas puras de três bactérias aeróbias facultativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Streptococcus faecalis*. Os resultados demonstraram que as duas pastas de hidróxido de cálcio foram efetivas sobre as bactérias analisadas, tanto em 24 como 48 horas, proporcionando diferentes halos de inibição de crescimento bacteriano.

Unitermos: Hidróxido de cálcio; Bactéria aeróbia, Paramonoclorofenol canforado.

INTRODUÇÃO

O metabolismo energético das bactérias encontradas nas infecções mistas do canal radicular pode ser realizado graças a respiração ou a fermentação. O efeito do oxigênio sobre estas bactérias permite classificá-las em aeróbias, anaeróbias e microaerófilas.

A potencialização de infecções presentes no canal radicular e no periápice ocorre comumente em decorrência do predomínio de bactérias anaeróbias^{2,10,31}. As bactérias aeróbias facultativas, capazes de crescer tanto na presença como na ausência de oxigênio, também tem sido associadas às infecções periapicais. TRONSTAD³² relata que em canais radiculares, repetidamente abertos e fechados devido

à presença de dor, de pacientes submetidos a tratamentos inadequados, incluindo antibioticoterapia incorreta, foram encontradas enterobactérias, como a *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Proteus* e *Klebsiella*. Outras bactérias aeróbias facultativas são evidenciadas nas infecções endodônticas persistentes, como a *Pseudomonas aeruginosa* e o *Streptococcus faecalis*.^{4, 15, 17, 23, 26, 27, 31, 32}

É de interesse salientar que um ótimo controle das infecções observadas no canal radicular e no periápice, é obtido durante a sanificação proporcionada pela fase do preparo biomecânico.

No intuito de potencializar a ação antimicrobiana obtida durante o preparo biomecânico, o hidróxido de cálcio tem sido a medicação intracanal mais utilizada. ESTRELA et al.¹³ acreditam que essa consagração deve-se à sua dissociação química em íons de cálcio e hidroxila, o que caracteriza propriedades enzimáticas, como a inativação de enzimas bacterianas que conduz ao efeito antibacteriano, e à ativação de enzimas teciduais que proporciona o efeito mineralizador.

BYSTROM et al.⁸ e QUACKENBUSH²⁵ demonstraram, para bactérias anaeróbias, a superioridade antimicrobiana do hidróxido de cálcio sobre o p-monoclorofenol canforado.

No entanto, existem controvérsias quanto à sua efetividade sobre certas bactérias aeróbias facultativas. Alguns trabalhos relataram que o hidróxido de cálcio é pouco efetivo sobre o *Streptococcus faecalis*.^{17, 27, 30} enquanto que outros mostraram sua eficácia tanto para esta bactéria, como para a *Pseudomonas aeruginosa*.^{1, 19, 26, 28}

Em decorrência destes questionamentos, alguns autores^{11, 16, 20, 22, 24} sugerem o acréscimo do p-monoclorofenol canforado ao hidróxido de cálcio, no intuito de melhorar a ação sobre as bactérias aeróbias facultativas.

As bactérias aeróbias facultativas podem ser subdivididas em dois grupos: as facultativas verdadeiras, que respiram quando crescem aerobicamente e, em anaerobiose realizam a fermentação, como a *Pseudomonas aeruginosa* e a *Escherichia coli*; e as facultativas indiferentes, que realizam a fermentação independente do crescimento em aerobiose ou anaerobiose, como o *Streptococcus faecalis*.²¹

Frete ao exposto, é objetivo desta pesquisa analisar o efeito antimicrobiano de pastas de hidróxido de cálcio, associadas ao soro fisiológico e ao paramonoclorofenol canforado, sobre culturas puras de 3 bactérias aeróbias facultativas: a *Pseudomonas aeruginosa*, a *Escherichia coli* e o *Streptococcus faecalis*.

MATERIAL E MÉTODO

Foram preparados 60 cilindros, com 4 mm de diâmetro por 6 mm de comprimento, a partir de sonda gástrica nº 16 (Embramed), e divididos em 3 grupos de 20, para a análise dos microorganismos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*.

Para cada grupo distribuíram-se 20 cilindros em duas placas de Petri, contendo meio de cultura apropriado, sendo 10 completamente preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio (Quimis) associada ao soro fisiológico, e os 10 restantes preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio associada ao paramonoclorofenol canforado (SSW), na consistência de creme dental.

A ação antimicrobiana das pastas foi analisada pelo contato direto com as suspensões-padrão dos microorganismos em estudo.

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizadas na superfície do ágar Müeller-Hinton para a *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, e neste mesmo meio acrescido de sangue desfibrinado de carneiro a 5% para o *Streptococcus faecalis*. Desta forma, 0,1 ml da suspensão bacteriana diluída foi transportado para o meio de cultura e, de imediato, semeado em toda superfície das placas de Petri com auxílio de swab estéril, de modo a se obter um crescimento conflúente.

A diluição das bactérias foi feita em solução salina (8,5g/1000 ml) com grau de diluição 5 na escala de turvação (McFarland).

Posteriormente, as 6 placas de Petri contendo os 60 corpos de prova, foram mantidas em estufa bacteriológica a 35° Celsius atendendo-se às exigências respiratórias dos microorganismos.

Decorrido o período de incubação de 24 e 48 horas, realizaram-se as leituras dos halos de inibição do crescimento bacteriano, quando presentes, indicativos do poder antimicrobiano das referidas pastas, e a mensuração dos diâmetros desses, utilizando-se de duas medidas de forma perpendicular entre si, sendo obtido a média de seus tamanhos, valendo-se de régua milimetrada, com adequada fonte natural de luminosidade.

RESULTADOS

A tabela 1 expressa as médias em milímetros (mm) dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano, obtidos com pastas de hidróxido de cálcio para as bactérias aeróbias facultativas em estudo.

Os resultados, após tabulados, foram submetidos ao teste "t" Student, paramétrico em nível de significância de 0,01.

TABELA I - Médias (mm) dos diâmetros dos halos de inibição de pastas de Ca(OH)_2 sobre bactérias aeróbias facultativas

Pastas Bactérias	Tempo(hs)	Ca(OH)_2 + soro Fisiológico	Ca(OH)_2 + PMCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	6,9	17,4
	48	7,4	17,8
<i>Escherichia coli</i>	24	7,0	17,4
	48	7,4	18,0
<i>Enterococcus faecalis</i>	24	7,1	17,8
	48	7,1	18,1

DISCUSSÃO

O conhecimento do mecanismo de ação da medicação intracanal é essencial para sua seleção. O elevado pH do hidróxido de cálcio (12,6) confere a este medicamento, a partir da liberação dos íons hidroxila, uma ação antimicrobiana.

Alguns trabalhos^{17,27,30} questionaram a efetividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio sobre bactérias aeróbias facultativas, como o *Streptococcus faecalis*, enquanto que outros^{11,16,20,22,24} mostraram-se mais satisfatórios particularmente quando da associação com o paramonoclorofenol canforado.

ANTHONY et al.³, ao analisarem o efeito de três veículos (PMCC, cresatina e solução salina) sobre o pH do hidróxido de cálcio, relataram que o PMCC adicionado ao hidróxido de cálcio produz o clorofenolato de cálcio, o qual é um sal fraco, e que em solução aquosa recebe íons hidrogênio e repõe o p-clorofenol, que dá um excesso de íons hidroxila para a água. Os autores acreditam que a solução salina é uma alternativa lógica como veículo para a pasta de hidróxido de cálcio.

BIRAL et al.⁶, estudando comparativamente a atividade antimicrobiana do PMCC, do iodeto de potássio Iodetado a 2% e do Formocresol, observaram que nos testes de ação indireta através de vapores, em condições clínicas simuladas, sobre algumas bactérias (entre elas o *Streptococcus faecalis*), o PMCC foi inefetivo, sendo sua efetividade evidenciada apenas perante a *Pseudomonas aeruginosa*. O teste de difusibilidade pela dentina mostrou que o PMCC não registrou qualquer capacidade de penetração. Estes resultados estão concordes com os

obtidos por MIRANDA²³, quando relatou que os *enterococos* (*Streptococcus faecalis* e outros) mostraram-se resistentes a agentes medicamentosos (antibióticos, detergentes e o PMCC).

Outros trabalhos afirmaram que o PMCC mostrou-se inefetivo por ação indireta por meio de vapores, com ausência de ação à distância, atuando mais por contato^{5,6,7,9,29}.

De outra parte, ESTRELA¹² mediante análise química de pastas de hidróxido de cálcio frente a liberação de íons cálcio, de íons hidroxila e formação de carbonato de cálcio, na presença de tecido conjuntivo de cão, advoga que a velocidade de liberação de íons hidroxila é influenciada pelo veículo utilizado na composição desta pasta. O autor demonstrou que ao considerar o peso molecular do hidróxido de cálcio, a partir da liberação de íons cálcio, obtido por análise condutimétrica de cálcio em solução, e tomando como parâmetro o cálculo estequiométrico, em 1 mol de hidróxido de cálcio obtém-se 45,89% de íons hidroxila e 54,11% de íons cálcio.

A concentração dos íons hidroxila pode inativar enzimas da membrana citoplasmática, influenciando o transporte químico, o que altera a disponibilidade de nutrientes e induz inibição e efeitos tóxicos sobre a célula bacteriana. Na tentativa de explicar o mecanismo de ação dos íons hidroxila do hidróxido de cálcio sobre bactérias anaeróbias, ESTRELA et al.¹³ levantaram a hipótese de que o hidróxido de cálcio pode gerar um efeito enzimático irreversível, quando mantiver um alto pH por longo tempo, e reversível, quando este pH retornar a valores ideais para a atuação enzimática.

É prudente enfatizar que as bactérias analisadas neste experimento, são viáveis em pH elevado, como a

Escherichia coli e a *Pseudomonas aeruginosa*, que resiste a um pH 8,0 a 9,0 e o *Streptococcus faecalis* que suporta um pH 9,0¹⁸. Isto posto, possibilidade o raciocínio de que quanto maior a liberação de íons hidroxila, maior ataque às enzimas da membrana citoplasmática das bactérias, as quais não resistiriam a um pH 12,6 que é encontrado na pasta de hidróxido de cálcio com soro fisiológico.

ESTRELA et al.¹⁴, analisando a difusão dentinária de íons hidroxila de várias pastas de hidróxido de cálcio, observaram mudanças no pH da superfície externa apical somente após 30 dias, quando os veículos foram o anestésico e o soro fisiológico, passando de um pH de 6 a 7 para 7 a 8, enquanto o polietileno glicol 400 mostrou alteração somente aos 45 dias. O pH na luz do canal radicular permaneceu elevado e acima de 12 em todo período de observação, de 7 aos 60 dias.

O paramonoclorofenol canforado está classificado entre os veículos oleosos (não hidrossolúveis), o que lhe confere uma característica de lenta liberação de íons hidroxila e íons cálcio, associados à pasta de hidróxido de cálcio, quando comparado com veículos hidrossolúveis como o soro fisiológico, o anestésico e o polietileno glicol 400.

Além disso, sabe-se que a sanificação do sistema de canais radiculares deve ser delegada ao preparo biomecânico, e que o completo preenchimento do canal radicular pela pasta de hidróxido de cálcio é importante, como são suas propriedades específicas.

Os resultados obtidos na presente pesquisa, demonstraram que, a pasta de hidróxido de cálcio associada ao soro fisiológico e ao PMCC, é efetiva sobre as bactérias analisadas em cultura pura, em 24 e 48 horas, proporcionando halos de inibição de crescimento de 3 a 4 mm e de 12 a 13 mm, respectivamente, além do diâmetro do cilindro que a continha. Frente a comparação destes resultados, pelo teste "t" Student, observa-se diferença estatisticamente significativa, no nível de 1%.

DIFIORE et al.¹¹, estudando o efeito antimicrobiano de pastas de hidróxido de cálcio empregadas em apixificação, esclarece que o tamanho do halo de inibição de crescimento bacteriano não reflete seu poder antimicrobiano, uma vez que este tamanho pode sofrer influência do tamanho da molécula da substância e de sua constante de difusão, podendo se difundir adequadamente no meio de cultura utilizado.

A velocidade de liberação iônica em conjunto com a situação clínica influencia diretamente na seleção do veículo a ser empregado na pasta de hidróxido de cálcio¹². Assim, quanto maior a concentração dos íons hidroxila, maior a inativação de enzimas bacterianas, o que promove alteração no transporte químico de nutrientes e de seu

estado de ionização, gerando efeitos tóxicos e lesivos à célula bacteriana¹³. No emprego de rotina da medicação intracanal, em situações de mortificações pulparem com ou sem rarefação óssea periapical, a preferência recai na pasta de hidróxido de cálcio associada ao soro fisiológico, uma vez que este veículo é hidrossolúvel e apresenta maior velocidade na liberação iônica quando comparado a veículo viscoso (como o polietileno glicol 400) ou oleoso (como o PMCC)¹². Em relação ao maior halo de inibição de crescimento bacteriano encontrado na pasta de hidróxido de cálcio associada ao PMCC, deve-se considerar que seu tamanho não reflete seu poder microbiano e que este pode sofrer influência de sua constante de difusão, como bem salienta DIFIORI et al.¹¹.

CONCLUSÕES

1. As pastas de hidróxido de cálcio cujos veículos foram o soro fisiológico e o PMCC, mostraram-se efetivas, em 24 e 48 horas, sobre as bactérias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Streptococcus faecalis*.

2. A pasta de hidróxido de cálcio associada ao PMCC mostrou um maior halo de inibição do crescimento bacteriano, estatisticamente significativo, quando comparada com a pasta que continha o soro fisiológico como veículo.

ABSTRACT

The authors have studied the antibacterial effect of two calcium hydroxide pastes, one associated with saline solution and the other with camphorated paramonochlorophenol, on pure cultures of facultative aerobic bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis*. The results show that the two calcium hydroxide pastes were effective on the analyzed bacteria, in 24 and 48 hours, establishing different growth inhibition areas.

UNITERMS: Calcium hydroxide; Aerobic bacteria; Camphorated paramonochlorophenol

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLARD, V et al. Endodontic treatment of experimentally induced apical periodontitis in dogs. *Endod. dent. Traumatol.*, v.3, q. 5, p. 240-4, 1987.
2. ANDO, N.; HOSHINO, E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. *Int. Endod. J.*, v. 23, p. 20-7, 1990.
3. ANTHONY, D.R. et al. The effect of three vehicles on the pH of calcium hydroxide. *Oral Surg.*, v. 54, n. 5, p. 560-5, 1982.
4. BARNETT, F et al. Ciprofloxacin treatment of periapical *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Endod. dent. Traumatol.*, v. 4, n. 3, p. 132-7, 1988.
5. BIRAL, R.R.; PUPO, J.; VALDRIGUI, L. Estudo comparativo do potencial antimicrobiano do paramonoclorofenol associado a cânfora, acetato de metacresila e cânfora e ao furacil. *Odont. Mod.*, v. 9, n. 6, p. 13-20, 1982.
6. BIRAL, R.R.; PUPO, J.; VALDRIGUI, L. Estudo comparativo da atividade: antimicrobiana do paramonoclorofenol canforado, do iodeto de potássio iodetado a 2% e do formocresol. *Rev. paul. Endod.*, v. 3, n. 3, p. 51-6, 1982.
7. BIRAL, R.R.; PUPO, J.; VALDRIGUI, L. Atividade antimicrobiana do paramonoclorofenol nas concentrações de 1 e 2%. *Rev. Ass. paul. Cir. Dent.*, v. 36, n. 5, p. 476-85, 1982.
8. BYSTROM, A.; CLAESSEON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod. dent. Traumat.*, v. 1, n. 5, p. 170-5, 1985.
9. CWIKLA, J.R. The vaporization and capillarity effect of endodontic medicaments. *Oral Surg.*, v. 34, n. 1, p. 117-21, 1972.
10. DAHLÉN, H.; BERGENHOLTZ, G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J. dent. Res.*, v. 59, n. 6, p. 1033-40, 1980.
11. DIFIORE, P. M. et al. The antibacterial effects of calcium hydroxide apexification pastes on *Streptococcus sanguis*. *Oral Surg.*, v. 55, n. 1, p. 91-4, 1983.
12. ESTRELA, C. *Análise química de pastas de hidróxido de cálcio, frente à liberação de íons cálcio, de íons hidroxila e formação de carbonato de cálcio, na presença de tecido conjuntivo de cão*. São Paulo, 1994, 140p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
13. ESTRELA, C. et al. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. *Rev. FOB*, v. 2, n. 4, p. 29-36, 1994.
14. ESTRELA, C. et al. Dentinal diffusion of hydroxyl ions on various calcium hydroxides pastes. *Braz. dent. J.* v. 6, n. 1, 1995. in press.
15. FABRICIUS, L. et al. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand. J. dent. Res.*, v. 90, n. 3, p. 200-6, 1982.
16. FRANK, A.L. Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation. *J. Amer. dent. Ass.*, v. 72, p. 87-93, 1966.
17. HAAPASALO, M.; ORSTAVIK, D. "In vitro" infection and desinfection of dentinal tubules. *J. dent. Res.*, v. 66, n. 8, p. 1375-796, 1987.
18. KODUKULA, P.S. et al. Role of pH in biological wastewater treatment process. In: BAZIN, M. J.; PROSSER, J. I. *Physiological models in microbiology*. Florida, CRC Press Boca Ratas, 1988, p. 113-34.
19. LAGE MARQUES, J. L. et al. Análise da ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio P.A. sobre algumas espécies de microorganismos. Contribuição ao estudo. *Rev. Fac. Odontol. F. Z. L.*, v. 4, n. 2, p. 75-80, 1992.
20. LEONARDO, M. R. et al. Determinação de íons Ca^{+2} , pH e solubilidade de pastas à base de hidróxido de cálcio contendo PMC e PMCC. *Rev. bras. Odont.*, v. 50, n. 1, p. 5-9, 1993.

21. LOESCHE, W.J. *Cárie Dental: Uma infecção tratável*. Rio de Janeiro, Cultura Médica, 1993, p. 17-31.
22. MARTINS, J.B. et al. Efeitos da biomecânica e de curativos de demora com hidróxido de cálcio, paramonoclorofenol a 1% ou associação de ambos na redução da flora microbiana de canais radiculares infectados. *Ars curandi Odont.*, v. 6, n. 7, p. 44-57, 1979.
23. MIRANDA, V.C. Identificação de microorganismos resistentes ao tratamento endodôntico, com especial referência aos *Streptococos*. *Rev. Fac. Farm. Odont. Araraquara*, v. 3, n. 1, p. 73-95, 1969.
24. OLETO, E. M. O.; MELO, G. R. Do emprego do hipoclorito de sódio, paramonoclorofenol e hidróxido de cálcio em necrose pulpar - Estudo clínico em dentes humanos. *Arg. Cent. Est. Curso. Odont.*, v. 21/22, n. 1/2, p. 113-26, 1984/85.
25. QUACKENBUSH, L. "In vitro" testing of three types of endodontic medicaments against anaerobic bacteria. *J. Endod.*, v. 12, p. 132, 1986.
26. RANTA, K.; HAAPASALO, M.; RANTA, H. Monoinfection of root canal with *Pseudomonas aeruginosa*. *Endod. dent. Traumat.*, v. 4, n. 6, p. 269-72, 1988.
27. SAFAVI, K. E. et al. Root canal dentinal tubule disinfection. *J. Endod.*, v. 16, p. 207-10, 1990.
28. SMITH, J. W.; LEEB, I. J.; TORNEY, D. L. A comparison of calcium hydroxide and barium hydroxide as agent for inducing apical closure. *J. Endod.* v. 10, n. 2, p. 64-70, 1984.
29. SOUZA, V. et al. Emprego de medicamentos no interior dos canais radiculares. Ação tóxica e à distância de algumas drogas. *Ars curandi*, v. 5, n. 6, p. 4-15, 1978.
30. STEVENS, R. H.; GROSSMAN, L. I. Evaluation of the antimicrobial potential of calcium hydroxide as an intracanal medicament. *J. Endod.*, v. 9, n. 9; p. 372-4, 1983.
31. SUNDQVIST, G. et al. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect. Immun.*, v. 25, n. 2, p. 685-93, 1979.
32. TRONSTAD, L. Recent development in endodontic research. *Scand. J. dent. Res.*, v. 100, p. 52-9, 1992.
33. ZEBRAL, A. A.; PINTO, E. C. Streptococos do grupo Enterococos em canais dentários infectados e sua sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos. *Odont. Mod.* v. 21, n. 2, p. 18-23, 1994.