

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

ALDELANY RAMALHO FREIRE

**COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PASTAS ANTIBIÓTICAS
FRENTE AO *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

João Pessoa

2017

ALDELANY RAMALHO FREIRE

**COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PASTAS ANTIBIÓTICAS
FRENTE AO *ENTEROCOCUS FAECALIS***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Odontologia, da Universidade
Federal da Paraíba em cumprimento
às exigências para conclusão.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Alves de Sousa

João Pessoa

2017

F866c Freire, Aldelany Ramalho.

Comparação da atividade antibacteriana de pastas antibióticas frente ao *enterococcus faecalis* / Aldelany Ramalho Freire. -- João Pessoa, 2017.

49f. : il. -

Orientadora: Simone Alves de Sousa.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS, 2018.

1. Produtos com ação antimicrobiana. 2. Extratos vegetais. 3. Agentes de capeamento da polpa dentária e pulpectomia. 4. *Enterococcus faecalis*.
5. Odontopediatria.


BS/CCS/UFPB

CDU: 616.314-76(043.2)

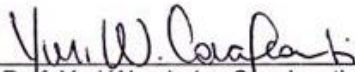
ALDELANY RAMALHO FREIRE

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Odontologia, da Universidade
Federal da Paraíba em cumprimento às
exigências para conclusão.

Monografia aprovada em 20 / 11 / 17



Profª. Simone Alves de Sousa
(Orientadora – UFPB)



Prof. Yuri Wanderley Cavalcanti
(Examinador – UFPB)



Profª. Eliane Batista de Medeiros Serpa
(Examinadora – UFPB)

Profª. Leopoldina F. Dantas Almeida
(Examinadora – UFPB)

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Marieuda e José Josino, por todo amor e proteção dedicados a mim até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas oportunidades e pelas bênçãos diárias, por guiar-me até aqui, possibilitando que as dificuldades fossem superadas, e fortalecendo-me a cada dia.

Aos meus pais, Josineuda e Aldenir, pelos ensinamentos de vida, pela dedicação, proteção e por todo o amor. Obrigada por estarem sempre presentes, apesar da distância física, compartilhando esse sonho comigo.

Aos meus irmãos, Aldeliny e Aldenir, pelo companheirismo, carinho, incentivo e apoio transmitidos.

Ao meu namorado, Leonardo, pela cumplicidade e por estar sempre do meu lado, jamais hesitando em fazer-me feliz e dar-me forças para continuar.

A minha querida orientadora, Prof.^a Simone Alves de Sousa, por toda ajuda, paciência e carinho. Obrigada por ser uma fonte de incentivo e um espelho como pessoa e profissional.

Ao Prof. Yuri Cavalcanti, a quem tenho grande admiração, pela imensa ajuda na condução desta pesquisa e por apresentar-me o vasto mundo da microbiologia.

As companheiras de curso, Maria Eliza, Laís Dutra, Nayanna Fernandes, Kauanne Fonseca e Thamires Araújo, que compartilharam esse sonho em conjunto. Obrigada pela amizade consolidada e pela presença nos momentos felizes e difíceis.

Aos professores e pacientes da UFPB, pelos ensinamentos e por contribuírem com nossa formação ao longo do curso.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi comparar a atividade antibacteriana de pastas antibióticas contendo os fitoconstituintes terpineol e cinamaldeído com a pasta CTZ, uma pasta triplo-antibiótica utilizada em pulpotomias de dentes decíduos, frente ao *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fitoconstituintes, por meio da técnica de microdiluição em caldo, com análise visual dos resultados. Constituiu-se 5 grupos de pastas experimentais: óxido de zinco + terpineol (GT); óxido de zinco + cinamaldeído (GC); óxido de zinco + terpineol + cinamaldeído (GTC); óxido de zinco + clorexidina (GCHX); óxido de zinco + eugenol + cloranfenicol + tetraciclina (CTZ). A solubilidade das pastas foi avaliada após 48 e 144 h, mediante avaliação da turbidez da água destilada na qual os corpos de prova ficaram imersos. Os dados de solubilidade foram avaliados por meio de Análise de Variância (ANOVA) a dois fatores com pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0,05$. A atividade antibacteriana das pastas foi avaliada por meio do teste de contato direto, e após 24 e 72h verificou-se a viabilidade dos microrganismos. As CIMs obtidas foram de 2000 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$, para o terpineol e o cinamaldeído, respectivamente. Após 48h e 144h, a maior solubilidade foi encontrada na pasta GT ($p < 0,05$). A solubilidade das pastas CTZ, GC, GTC e GCHX no tempo 48 h não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$). Em 144 h, a pasta CTZ apresentou maior solubilidade que os grupos GC, GTC e GCHX ($p < 0,05$). Após 24h, apenas a pasta GT não inibiu o crescimento de *E. faecalis*. Após 72h, todas inibiram seu crescimento. Conclui-se que a pasta GTC apresentou atividade antibacteriana semelhante à da pasta CTZ, frente ao *E. faecalis*. A maior solubilidade foi encontrada na pasta GT em ambos períodos de observação; apenas a pasta CTZ diferiu estatisticamente dos grupos restantes após 144 h, representando a segunda maior solubilidade. Ressalta-se a necessidade de novos estudos para maior entendimento acerca das propriedades das pastas discutidas neste trabalho, verificando a viabilidade de sua inserção na prática clínica.

Palavras-chave: Produtos com ação antimicrobiana. Extratos vegetais. Agentes de Capeamento da Polpa Dentária e Pulpectomia. *Enterococcus faecalis*. Odontopediatria.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the antibacterial activity of an antibiotic paste containing the phytoconstituents terpineol and cinnamaldehyde with the CTZ paste, a triple-antibiotic paste used in pulpotomies of deciduous teeth, against *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). The Minimum Inhibitory Concentration (CIM) of phytoconstituents was determined by the microdilution technique in broth with visual analysis of the results. Five groups of experimental pastes were constituted: zinc oxide + terpineol (GT); zinc oxide + cinnamaldehyde (GC); zinc oxide + terpineol + cinnamaldehyde (GTC); zinc oxide + chlorhexidine (GCHX); zinc oxide + eugenol + chloramphenicol + tetracycline (CTZ). The solubility of the pastes was evaluated after 48 and 144 h, by evaluation of the turbidity of the distilled water in which the specimens were immersed. The solubility data were evaluated by Analysis of Variance (ANOVA) at two factors with Tukey post-test, considering $p < 0.05$. The antibacterial activity of the pastes was evaluated by the direct contact test and after 24 and 72 h, the viability of the microorganisms was verified. The MICs obtained were 2000 $\mu\text{g/mL}$ and 500 $\mu\text{g/mL}$ for terpineol and cinnamaldehyde, respectively. After 48h and 144h, the highest solubility was found in the GT paste ($p < 0.05$). The solubility of the CTZ, GC, GTC and GCHX pastes after 48 h did not differ statistically ($p > 0.05$). However, after 144 h, the CTZ paste showed higher solubility than the GC, GTC and GCHX groups ($p < 0.05$). After 24h, only the GT paste was not able to inhibit the growth of *E. faecalis*. After 72h, all inhibited the growth of the bacteria. It was concluded that the antibiotic paste GTC presented antibacterial activity similar of the CTZ paste, against *E. faecalis*. The higher solubility was found in the GT paste in both observation periods; only the CTZ paste differed statistically from the remaining groups after 144 h, representing the second higher solubility. The need for further studies for a better understanding of the properties of the pastes discussed in this study is verified, analyzing the feasibility of its insertion in clinical practice.

Keywords: Products with Antimicrobial Action. Plant Extracts. Pulp Capping and Pulpectomy Agents. *Enterococcus faecalis*. Pediatric Dentistry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – Micrograma (s)

µL – Microlitro (s)

ANOVA – Análise de Variância

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CC – Controle de crescimento

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GC – Óxido de zinco + cinamaldeído

GCHX – Óxido de zinco + clorexidina

GCTZ – Óxido de zinco + CTZ

GT – Óxido de zinco + terpineol

GTC – Óxido de zinco + terpineol + cinamaldeído

h – Hora (s)

mg – Miligrama (s)

MHA – Agar Muller Hinton

mL – Mililitro (s)

mm – Milímetros (m)

NaOCl – Hipoclorito de sódio

NUMETROP – Núcleo de Medicina Tropical

OE – Óleo essencial

SPSS – Statistical Package for Social Sciences

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema da determinação da CIM do terpineol e cinamaldeído para o *E. faecalis* 29
- Figura 2** – Alça bacteriológica de 10 µL utilizada como matriz para obtenção dos corpos de prova utilizados neste estudo 30
- Figura 3** – Comparações múltiplas dos dados de absorbância obtidos para os grupos GCTZ, GT, GC, GTC e GCHX, nos tempos 48h e 144h 33
- Figura 4** – Teste de solubilidade das pastas após 48 h 34
- Figura 5** – Atividade antibacteriana das pastas antibióticas frente ao *E. faecalis* por contato direto após 24 h 35
- Figura 6** – Atividade antibacteriana das pastas antibióticas frente ao *E. faecalis* por contato direto após 72 h 35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Diluições seriadas dos fitoconstituintes e da substância controle para a determinação da CIM 28
- Tabela 2** – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) obtidas para Terpineol, Cinamaldeído e Clorexidina, de acordo com a norma M7-A9 (CLSI, 2012) 32
- Tabela 3** – Valores de absorvância a 600nm obtidos para o teste de solubilidade das pastas antibióticas estudadas, no período de 48 e 144 horas 32
- Tabela 4** – Médias e Desvio padrão da solubilidade dos diferentes grupos após 48 e 144 horas 33
- Tabela 5** – Viabilidade da suspensão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) após teste de contato direto, de acordo com os grupos estudados 35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Microbiologia das infecções endodônticas em dentes decíduos	14
2.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	15
2.3 Pasta obturadora CTZ	16
2.3.1 Cloranfenicol	18
2.3.2 Tetraciclina	19
2.3.2 Óxido de Zinco e Eugenol	20
2.4 Fitoterapia e Óleos essenciais	21
2.5 Terpineol e Cinamaldeído	23
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODO	27
4.1 Delineamento do estudo	27
4.2 Local de realização da pesquisa	27
4.3 Microrganismos utilizados	27
4.4 Substâncias utilizadas	27
4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fitoconstituintes	28
4.6 Constituição das pastas antibióticas	29
4.7 Avaliação da solubilidade das pastas	30
4.8 Avaliação da atividade antimicrobiana das pastas	30
4.9 Análise de dados	31
5. RESULTADOS	32
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos são os principais fatores capazes de induzir e perpetuar patologias pulpares e perirradiculares (LOPES; SIQUEIRA, 2015). Cerca de 150 espécies bacterianas são encontradas em canais radiculares de dentes infectados (GOMES, 2004). Certas espécies são capazes de constituir biofilmes densos, representando uma causa comum de infecções persistentes. Dentre essas bactérias, o *Enterococcus faecalis* tem papel de destaque, o qual é considerado como o microrganismo dominante em periodontites apicais pós-tratamento endodôntico (ESTRELA et al., 2009).

O *E. faecalis* tem capacidade de penetrar profundamente nos túbulos dentinários, aderir-se ao colágeno presente na dentina, e sobreviver sob condições não favoráveis e em ambientes com escassez nutricional. Dessa forma, esse microrganismo apresenta patogenicidade, e pode sobreviver e multiplicar-se no interior dos túbulos dentinários, causando persistência das infecções (PARADELLA; KOGA-ITO; JORGE, 2007). A formação de biofilme, a presença de fatores de virulência importantes e a capacidade de resistir à terapia endodôntica reiteram seu papel relevante nas infecções endodônticas (ESTRELA et al., 2009).

A terapia pulpar aplicada aos dentes decíduos apresenta particularidades relacionadas à anatomia e topografia complexas do sistema de canais radiculares nesses dentes, exibindo diversos canais acessórios e curvaturas acentuadas. Tais características dificultam sua instrumentação, o que exige a utilização de meios que reduzam ou eliminem os microrganismos presentes nos locais inacessíveis ao preparo químico-mecânico. O emprego de pastas obturadoras com atividade antimicrobiana é, portanto, uma estratégia de suma importância para que o sucesso pós-tratamento seja alcançado (PIVA et al., 2009; GONZÁLEZ-NÚÑEZ et al., 2010).

Dentre as pastas obturadoras indicadas na literatura, a CTZ (cloranfenicol, tetraciclina, óxido de zinco e eugenol) apresenta resultados clínicos satisfatórios, além de ser uma técnica simples e de fácil execução (GONZÁLEZ-NÚÑEZ et al., 2010). Entretanto, apesar das evidências clínicas do sucesso com o emprego desta pasta, sua utilização ainda não acontece de forma ampla, devido ao receio dos profissionais em relação aos efeitos adversos de seus componentes antibióticos, como a tetraciclina e o cloranfenicol (ARGOLO, 2014).

Novos estudos ainda devem ser realizados para que as propriedades essenciais do CTZ possam ser identificadas e consolidadas (MOURA et al., 2016), como a biocompatibilidade com os tecidos periapicais e a proporção ideal de seus componentes, de modo que não apresente citotoxicidade, sem afetar sua capacidade antimicrobiana (PIVA; JÚNIOR; ESTRELA, 2008). Ademais, os escassos estudos presentes na literatura sobre o tema utilizaram amostras pequenas e verificaram sucesso a médio prazo, cujo acompanhamento não supera 36 meses (MUÑOZ; TORRES; VASQUEZ, 2017).

Tal carência de estudos ressalta a necessidade de se pesquisar novos produtos terapêuticos com ação antimicrobiana, capazes de substituir os componentes das pastas obturadoras utilizadas no tratamento endodôntico de dentes decíduos. Nesta perspectiva, considera-se o uso de fitoconstituintes presentes em óleos essenciais, que são misturas complexas de compostos de baixo peso molecular extraídos de plantas medicinais (RAUT; KARUPPAYIL, 2014) e muitos apresentam propriedades biocidas contra uma ampla gama de organismos, como bactérias, fungos e vírus (KALEMBA; KUNICKA, 2003).

Dentre tais fitoconstituintes, o terpineol e o cinamaldeído apresentam relevante papel antimicrobiano (CALCABRINI et al., 2004; SHARIFI-RAD et al., 2017; BHINGE et al., 2017). O terpineol (terpinen-4-ol) é o principal constituinte do óleo essencial TTO (*tea tree oil*) destilado da *Melaleuca alternifolia* (SHARIFI-RAD et al., 2017). O cinamaldeído (trans-cinamaldeído) é um aldeído obtido da *Cinnamomum zeylandicum*, presente no extrato da casca de canela (UPADHYAY; VENKITANARAYANAN, 2016).

Diante do exposto, buscando novas alternativas de tratamento, este estudo tem como objetivo comparar a atividade antibacteriana de pasta obturadora contendo os fitoconstituintes terpineol e cinamaldeído com a pasta CTZ, frente ao *Enterococcus faecalis*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Microbiologia das infecções endodônticas em dentes decíduos

Fatores químicos, físicos e biológicos podem induzir uma patologia pulpar e perirradicular. Entretanto, apenas os fatores biológicos – mais precisamente os microrganismos e seus produtos – representam uma fonte de agressão persistente, a qual é capaz de induzir e perpetuar tais patologias. As infecções endodônticas têm natureza polimicrobiana, com participação de fungos, vírus e *Archaea*. Contudo, as bactérias e produtos bacterianos são os microrganismos com papel principal nestas infecções (SOUSA; TORINO; MARTINS, 2014; LOPES; SIQUEIRA, 2015).

Segundo estes últimos autores, as bactérias obtêm acesso à polpa dentária através dos túbulos dentinários, exposição pulpar, periodonto ou anacorese hematogênica. A cárie dentária é a via de acesso mais frequente à cavidade pulpar. Os microrganismos propagam-se através dos túbulos dentinários, atingindo ramificações, istmos e deltas apicais do sistema de canais radiculares, podendo atingir também a região periapical e induzir patologias perirradiculares.

A microbiota das infecções endodônticas em dentes decíduos é semelhante àquela presente nos dentes permanentes. A natureza também é polimicrobiana, e há predomínio de Gram-negativos e anaeróbios em canais com polpa necrosada e lesões perirradiculares (CHANDWANI; CHANDAK, 2017).

Brook (2003), após análise da literatura, concluiu que os gêneros mais prevalentes em pulpites e abscessos em pacientes infantis são *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, e *Streptococcus* spp.

Tavares et al. (2011) avaliaram a microbiota presente em 32 amostras de infecções endodônticas em dentes decíduos. Encontraram como espécies mais prevalentes: *Prevotella intermedia* (96.9%), *Neisseria mucosa* (65.6%), *Prevotella nigrescens* (56.2%) e *Tannerella forsythia* (56.2%).

Fabris (2011) realizou uma análise bacteriológica de infecções pulpares em dentes decíduos, sendo coletadas 103 amostras de tecido pulpar necrosado e 7 amostras de fístulas gengivais. Os microrganismos encontrados com maior frequência foram: *Enterococcus* spp., *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. nigrescens* e *D. pneumosintes*. Concluiu que a microbiota presente em infecções de dentes decíduos é similar à dos dentes permanentes, em termos qualitativos.

Chandwani e Chandak (2017) buscaram avaliar a prevalência de anaeróbios facultativos isolados dos canais de molares decíduos em 60 crianças. *Enterococcus faecalis* foram os mais prevalentes, seguidos de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O estudo confirmou a natureza polimicrobiana dessas infecções, além do predomínio de anaeróbios facultativos.

2.2. *Enterococcus faecalis*

As bactérias do gênero *Enterococcus* são Gram-positivas, possuem forma de cocos e são frequentes colonizadores do trato gastrointestinal e geniturinário humano. São microrganismos oportunistas e causam diversas infecções em humanos, dentre elas: infecções no trato urinário, na corrente sanguínea, no endocárdio, em feridas cirúrgicas, no trato biliar, e em cateteres e outros dispositivos médicos implantados (LINS et al., 2013; JORGENSEN et al., 2015).

Os *Enterococcus* são capazes de crescer em temperatura de 10 a 45 °C, pH 9,6 em 6,5% de solução salina, e de sobreviver a 60°C por 30 minutos. Não necessitam, portanto, de grandes exigências para seu crescimento. Podem formar biofilmes, que os protegem contra agentes antimicrobianos e da ação de células do sistema imune (PARADELLA; KOGA-ITO; JORGE, 2007; ESTRELA et al., 2009).

Dentro deste grupo, o *Enterococcus faecalis* é considerada a espécie mais significativa, tanto em termos de frequência com que é encontrada em sítios de infecções, quanto em relação à resistência bacteriana (LINS et al., 2013; JORGENSEN et al., 2015).

O *Enterococcus faecalis* possui genes codificados que determinam diversos fatores de virulência: conseguem evadir-se dos mecanismos de defesa do hospedeiro, competir com outras espécies bacterianas através da produção de toxinas, além de gerar mecanismos de imunomodulação, induzindo inflamação. Há, ainda, a capacidade de penetrar nos túbulos dentinários, aderindo-se ao colágeno dentinário, habilidade esta não demonstrada por todas as espécies bacterianas. Além disso, apresentam resistência a certos antimicrobianos, como hidróxido de cálcio e clorexidina (PARADELLA; KOGA-ITO; JORGE, 2007; NACIF; ALVES, 2010; SILVA, 2013).

O *E. faecalis* é a principal espécie encontrada em canais radiculares que apresentam fracasso na terapia endodôntica. Portanto, tem presença marcante nas

infecções persistentes, pois podem sobreviver aos procedimentos do preparo químico-mecânico e à medicação intracanal (ZHANG; DU; PENG, 2015; CANCIO et al., 2017).

Ozbek, Ozbek e Erdogan (2009) analisaram a frequência do *E. faecalis* em 79 amostras de infecções primárias e tratamentos endodônticos considerados fracassados, e objetivaram determinar a importância estatística da presença da bactéria em infecções endodônticas de uma população turca. Observaram que o microrganismo estava presente em não menos que 61% de todas as infecções, segundo o teste de proporção. Além disso, verificaram que o *E. faecalis* estava mais associado aos casos de insucesso do tratamento endodôntico do que às infecções primárias.

Nacif e Alves (2010), após revisarem a literatura, concluíram que a alta prevalência do *E. faecalis* nos casos de fracasso do tratamento endodôntico deve-se à: resistência aos agentes antimicrobianos e antibióticos, capacidade de sobrevivência e de rápida recuperação quando submetido a condições ambientais não favoráveis, privação nutricional e aos seus fatores de virulência.

Lins et al. (2013) avaliaram as características moleculares e fenotípicas do *E. faecalis* isolados de infecções pulpares primárias em 43 pacientes brasileiros. Verificou-se que o microrganismo apresentou alto nível de resistência à tetraciclina. Foram encontrados genes de resistência a este antimicrobiano, os quais podem contribuir para a patogenicidade da bactéria na cavidade pulpar.

Cancio et al. (2017) investigaram a presença de *Enterococcus faecalis* em 25 amostras de dentes decíduos com infecção endodôntica primária, relacionando com a possível falha em resultados de pulpectomias após 36 meses. Observaram que tal microrganismo estava presente em apenas um dente que apresentou insucesso na terapia, concluindo que o *E. faecalis* não pôde ser relacionado à falha do procedimento. Entretanto, os autores afirmaram que novos estudos são necessários para investigar o papel deste patógeno quanto a infecções primárias e resultados de insucesso no tratamento endodôntico em dentes decíduos.

2.3. Pasta obturadora CTZ

Capiello e Soller, em 1959, na Argentina, deram início ao emprego de uma terapia endodôntica em dentes decíduos com ou sem necrose pulpar, empregando

uma pasta baseada em uma associação de antibióticos, sem a realização de instrumentação nos canais radiculares. Capiello (1964) descreveu a composição desta pasta, tratando-se de cloranfenicol (500 mg), tetraciclina (500 mg) e óxido de zinco (1000 mg) e eugenol. A técnica deveria ser realizada em sessão única, e consistia na remoção da polpa coronária e inserção do material na entrada dos condutos radiculares e assoalho da câmara pulpar, seguida de selamento coronário com material restaurador.

Capiello (1967) obteve sucesso clínico e radiográfico em seu estudo com o emprego da técnica não instrumentada com CTZ, tanto em polpas vitais quanto não vitais, indicando-a, inclusive, na terapia de dentes com mobilidade e fístula. Propôs ainda, a substituição do emprego da pasta de hidróxido de cálcio pelo CTZ em pré-escolares, pois verificou um menor número de casos de reabsorção interna ao empregar o CTZ.

Pelo uso da técnica não instrumentada, o CTZ apresenta protocolo de execução simples, tempo clínico reduzido e baixo custo (GONÇALVES, 2010). Dessa forma, sua utilização no serviço público apresenta-se bastante viável para retardar a perda do elemento dentário decíduo, frente à impossibilidade do emprego da técnica endodôntica convencional e de mantenedores de espaço (OLIVEIRA; COSTA, 2006). Além disso, pode ser indicado independentemente do diagnóstico pulpar, e representa uma grande vantagem no tratamento de pacientes não colaborativos (PASSOS; MELO; MOREIRA, 2008; MOURA, et al., 2016).

Oliveira e Costa (2006) realizaram um estudo retrospectivo, avaliando o desempenho clínico de pulpotomias com CTZ em 24 molares decíduos de crianças de 4 a 11 anos, atendidas em um Programa Saúde da Família. Considerando parâmetros físicos e radiográficos, concluíram que a efetividade da pulpotomia com CTZ foi de 29,1%, estando presente em 7 dos 24 casos. Os autores sugeriram que novos ensaios clínicos controlados fossem realizados.

Sousa, Duarte e Souza (2014) buscaram avaliar os resultados clínicos e radiográficos de tratamentos endodônticos com CTZ em 36 dentes decíduos, realizados numa clínica escola de uma universidade brasileira, com um acompanhamento de até 2 anos ou mais. Foi encontrado um índice de insucesso clínico e/ou radiográfico de 41,6%, e os autores consideraram que a pasta CTZ possibilitou que os elementos decíduos fossem mantidos até sua esfoliação, sem causar danos aos sucessores.

Moura et al. (2016) apresentaram 38 casos de molares decíduos com polpa necrosada, tratados endodonticamente com pasta CTZ. O sucesso clínico foi considerado como 100%, e o radiográfico, 93%. Para os autores, os resultados sugeriram que o CTZ é uma opção na terapia pulpar em molares decíduos.

Ferreira et al. (2016) objetivaram avaliar clínica e radiograficamente a efetividade da pasta CTZ em pulpotomias realizadas em molares decíduos de pré-escolares, após três e seis meses, comparando com os resultados obtidos com o uso de formocresol. Após três meses, foi observado 75% de sucesso clínico no grupo tratado com formocresol e 70% no grupo tratado com CTZ. Após seis meses, o formocresol apresentou êxito de 85% e o CTZ, de 80%. Radiograficamente, o sucesso foi de 65% para o formocresol e 100% para a pasta CTZ. Não se observaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Os autores concluíram que o CTZ é uma alternativa nas pulpotomias, tem efeito antimicrobiano e estabiliza o processo de reabsorção radicular, sem causar danos à formação do dente permanente.

Ferreira et al. (2017) avaliaram a efetividade clínica e radiográfica de pulpotomias com pasta CTZ em 43 molares decíduos com vitalidade. Encontraram que, após 6 meses, 93% dos casos apresentaram excelente comportamento clínico (7% dos casos exibiam gengiva eritematosa). Após 12 meses, o sucesso foi de 88,4%, com falha em quatro casos de eritema gengival e uma fístula. Radiograficamente, após 6 meses, o sucesso foi visto em 97,7% dos casos (apenas um molar apresentou espessamento do ligamento periodontal). Após 12 meses, houve apenas dois casos de falha semelhantes, e um de radiolucidez na área de furca (93% de sucesso).

Muñoz, Torres e Vásquez (2017) realizaram uma revisão da literatura acerca do uso da pasta CTZ no tratamento de dentes decíduos com necrose pulpar numa só sessão clínica. Após o levantamento de estudos, consideraram que a pasta CTZ apresenta bons resultados a médio prazo em elementos dentários decíduos sem vitalidade pulpar.

2.3.1. Cloranfenicol

O cloranfenicol é um antibiótico de amplo espectro, o qual atua sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Possui efeito bacteriostático, cujo

mecanismo de ação baseia-se na inibição da síntese de proteínas da bactéria. Tal inibição ocorre devido a sua ligação de caráter reversível à subunidade 50S do ribossomo bacteriano, inibindo a enzima peptidil transferase, que é responsável pela síntese protéica (YAGIELA et al., 2011).

Além da clássica ação bacteriostática, o cloranfenicol pode atuar como bactericida em altas concentrações. Apresenta excelente efetividade antibacteriana sobre anaeróbios, e devido a sua grande solubilidade, exhibe ampla distribuição pelos tecidos e fluidos corporais, o que aumenta seu poder de ação. É bastante efetivo no tratamento de infecções não-responsivas a antibióticos menos tóxicos (ARGOLO, 2014; FERREIRA et al., 2017).

Apresenta efeito citotóxico, pois inibe a síntese protéica das mitocôndrias, conseqüentemente, interferindo na respiração mitocondrial, o que compromete os processos de síntese e proliferação celular. Seu uso é considerado restrito, por exhibir efeitos tóxicos significativos, que incluem: depressão reversível da medula óssea, anemia aplástica, distúrbios gastrointestinais e toxicidade em recém-nascidos. Tais efeitos dependem da dose e do tempo de uso do medicamento (TAVARES, 2009; STEFFENS et al., 2010; MUÑOZ; TORRES; VÁSQUEZ, 2017).

A indicação deste fármaco para o tratamento de infecções orais têm se tornado cada vez mais obsoleta, devido ao seu elevado potencial de toxicidade e efeitos colaterais, aumento da resistência bacteriana e surgimento de alternativas medicamentosas mais eficazes e seguras (ANDRADE, 2008).

2.3.2. Tetraciclina

A tetraciclina é um bacteriostático que apresenta amplo espectro de ação e efetividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas aeróbias e anaeróbias, além de certos protozoários, espiroquetas, riquetsias, micoplasma e clamídias. Liga-se à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo a ligação do RNA-t ao sítio A, o que inibe a síntese de proteínas (MORETHSON, 2015).

Cavalcanti (2013) avaliou *in vitro* a atividade antimicrobiana dos componentes da pasta obturadora CTZ, concluindo que a tetraciclina foi o componente que apresentou maior ação antibiótica frente ao *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, possuindo efeito semelhante ao do cloranfenicol contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O fármaco apresenta efeitos adversos, que incluem irritação do trato gastrointestinal e prolongamento do tempo de coagulação, podendo desencadear, ainda, efeitos tóxicos no fígado. O emprego terapêutico das tetraciclinas na Odontologia é considerado limitado, pois, por apresentar amplo espectro de ação, há possibilidade de o fármaco induzir infecções oportunistas. Está contraindicado para gestantes e crianças de até 8 anos de idade, pois pode afetar os dentes em formação e exibir toxicidade sobre o tecido ósseo (TAVARES, 2009; MORETHSON, 2015).

Seu uso durante o período de mineralização dos dentes pode promover descoloração dentária e hipoplasia do esmalte e da dentina. O surgimento de manchas amarronzadas permanentes nos elementos dentários provavelmente ocorre devido à ligação da tetraciclina aos íons cálcio, e sua posterior oxidação com a erupção do dente, devido à exposição deste à luz (GOOD; HUSSEY, 2003; MORETHSON, 2015).

2.3.3. Óxido de zinco e Eugenol

O óxido de zinco e eugenol é um material de baixo custo, citado pela Associação Americana de Odontopediatria no protocolo de terapia pulpar em dentes decíduos (ANDRADE, 2008; BARJA-FIDALGO et al., 2011; ARGOLO, 2014).

Enquanto o óxido de zinco apresenta baixa ação antimicrobiana, o eugenol (composto fenólico derivado do cravo-da-índia) possui amplo efeito antibacteriano, atuando sobre a membrana celular. Em altas concentrações, é bactericida. Ademais, possui efeito anti-inflamatório e anestésico, pois inibe de maneira reversível a atividade nervosa, além de bloquear sobre a síntese de prostaglandinas. Pode apresentar citotoxicidade, inibindo a respiração e divisão celular (ESCOBAR, 2002; LOPES; SIQUEIRA, 2015).

O material possui reabsorção lenta, podendo não acompanhar a rizólise do elemento decíduo, o que pode prejudicar o germe do dente sucessor através, por exemplo, da mudança de sua trajetória de erupção. O extravasamento do material através do ápice dentário pode desencadear necrose óssea e cementária (BAHROLOLOOMI; ZAMANINEJAD, 2015).

Lacativa, Loyola e Sousa (2012) compararam a biocompatibilidade do hidróxido de cálcio, pasta Guedes Pinto e pasta CTZ com e sem eugenol, através da

técnica de implantes intra-ósseos. Trinta roedores *guinea-pigs*, dez para cada material, receberam implantes intra-ósseos de cada lado da sínfise mandibular, em períodos de 4 a 12 semanas. Posteriormente, na avaliação histológica dos espécimes, observou-se que a pasta CTZ com eugenol desencadeou reação inflamatória severa, necrose tecidual, presença de linfócitos, células de corpo estranho e reabsorção óssea. Já a pasta sem eugenol em sua composição, possuiu menores reações inflamatórias. A pasta Guedes Pinto apresentou níveis aceitáveis de biocompatibilidade após 4 e 12 semanas, enquanto o hidróxido de cálcio, somente no período de 12 semanas; já a pasta CTZ não demonstrou biocompatibilidade em nenhum dos períodos.

2.4. Fitoterapia e Óleos essenciais

A fitoterapia é uma forma de tratamento que tem se afirmado no mercado e na ciência, visto que a quantidade de publicações científicas sobre o tema vem crescendo constantemente. Isto se deve a fatores como: busca por novas alternativas de tratamento frente à redução da eficácia de antibióticos convencionais, bem como sua dificuldade de comercialização; presença de características únicas dos fitoterápicos, como a de formar fitocomplexos, consistindo uma defesa química desenvolvida pelos vegetais em milhões de anos e que não pode ser mimetizada por nenhuma molécula isolada; além da relativa menor toxicidade exibida por alguns fitoterápicos quando comparado a dose terapêutica, corroborando as novas necessidades do mercado (SAAD et al., 2016).

A vasta biodiversidade encontrada no Brasil oportuniza que o conhecimento popular impulse a utilização terapêutica de produtos naturais. O poder público, inclusive, recomenda tal prática (CASTRO, 2010). A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), lançada em 2007 pelo Ministério da Saúde do Brasil, defende o uso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos, buscando a sua inserção no Sistema Único de Saúde, o desenvolvimento de pesquisas e novas tecnologias na área, além do estabelecimento de uma política intersetorial para seu desenvolvimento socioeconômico (BRASIL, 2007).

Os fitoterápicos são medicamentos obtidos exclusivamente de matérias-primas naturais, podendo ser tão eficientes quanto os medicamentos sintéticos,

desde que a integridade química e ação farmacológica de seus princípios ativos sejam preservadas (TOLEDO et al., 2003; BRASIL, 2004a).

Os óleos essenciais (OE) são produtos de origem natural, extraídos de plantas aromáticas, caracterizados pelo forte odor e volatilidade. São constituídos por misturas complexas de substâncias simples, e cada constituinte contribui para o efeito biológico da mistura como um todo. Os grupamentos funcionais presentes em sua constituição incluem: hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos, cetonas, fenóis, óxidos, éteres e ésteres. Podem ser sintetizados em diferentes órgãos vegetais, e protegem as plantas contra microrganismos e herbívoros, além de atrair insetos polinizadores e dispersores de sementes (NEGREIROS, 2014; SAAD et al., 2016).

Devido a suas propriedades, os OE são empregados na indústria alimentícia como agentes aromatizantes e conservantes. Também têm sido usados na medicina, após a descoberta de seus efeitos farmacológicos, pois demonstram ação anti-inflamatória, antioxidante e anticancerígena, além de importante ação antimicrobiana contra bactérias, fungos, vírus e protozoários (KALEMBA; KUNICKA, 2003; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais contra microrganismos é complexo, e estudos apontam que eles podem inativar enzimas envolvidas na produção de energia e na síntese de componentes estruturais, além de provocar modificações na parede celular e membrana plasmática do microrganismo (CASTRO, 2010; SARTO; JUNIOR, 2014; BORZINI et al., 2016).

Jadhav et al. (2013) encontraram ação antibacteriana em óleos essenciais. Cavalcanti et al. (2011) verificaram seu efeito antifúngico, enquanto Pérez et al. (2012) e Dunkic et al. (2013) observaram ação antiprotozoária e antiviral dos OE, respectivamente.

Benbelaid et al. (2014) avaliaram o efeito de alguns óleos essenciais contra o *Enterococcus faecalis*, tanto na forma planctônica quanto formando biofilmes. Os resultados mostraram que a alta atividade antimicrobiana de três OEs provenientes de plantas medicinais argelinas (*T. capitata*, *O. glandulosum*, *A. verticillata*) pode contribuir para o tratamento de infecções orais causadas por esse microrganismo.

2.5. Terpeneol e Cinamaldeído

O terpeneol (terpine-4-ol) é o principal fitoconstituente do óleo essencial *tea tree oil* (TTO), o qual é extraído da *Melaleuca alternifolia*, espécie nativa da Austrália (SHARIFI-RAD et al., 2017). Tal componente possui atividade antimicrobiana de amplo espectro, exibindo efeito contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de apresentar ação antifúngica (HART et al., 2000). Ademais, o terpeneol possui propriedades anti-inflamatórias, pois suprime a produção de mediadores inflamatórios por monócitos humanos ativados (CALCABRINI et al., 2004).

Oyedemi et al. (2009) estudaram os efeitos bactericidas dos fitoconstituintes terpeneol, eugenol e γ -terpineno sobre a membrana celular das bactérias: *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* e *Escherichia coli*. Verificou-se grande efetividade das propriedades antibacterianas desses componentes sobre as bactérias estudadas, nas quais, tanto as paredes quanto as membranas celulares foram significativamente danificadas.

Park et al. (2012) buscaram verificar a ação antimicrobiana do terpeneol e do linanol sobre bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas, além de analisar a citotoxicidade de diferentes concentrações dos fitoconstituintes sobre células KB, uma linhagem celular derivada de carcinomas orais. Os resultados mostraram grande poder antibacteriano e significativa toxicidade sobre a linhagem celular em ambas as substâncias. Os autores concluíram que o terpeneol e o linanol não devem ser usados em altas concentrações em produtos de higiene oral.

Li et al. (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana do terpeneol frente à *Escherichia coli*, e investigaram, através do microscópio eletrônico de transmissão, as alterações morfológicas que ocorreram na bactéria após ser exposta ao fitoconstituente. Os autores consideraram que o terpeneol apresentou excelente efeito contra a *E. coli*, a qual, ao ser exposta à Concentração Inibitória Mínima da substância, apresentou as seguintes alterações estruturais: diminuição no tamanho da célula, formato celular irregular, rompimento da parede e da membrana celular, diminuição do núcleo e do citoplasma, vacuolização celular e divisão celular alterada.

O cinamaldeído (trans-cinamaldeído) é o principal constituinte ativo do óleo essencial da *Cinnamomum zeylandicum* – planta popularmente conhecida como

canela –, o qual é extraído de suas cascas. O óleo essencial da *C. zeylandicum* possui atividade antibacteriana e antifúngica. Há diversas teorias para explicar o mecanismo da ação antimicrobiana do cinamaldeído, as quais incluem: destruição da superfície bacteriana e interação com a enzima bacteriana Acetil-CoA Carboxilase, o que desencadearia a morte do microrganismo (KIM; PARK; PARK, 2004; CASTRO, 2010; MEADES, et al., 2010; GUPTA et al., 2013).

Gupta et al. (2013) compararam a eficácia antimicrobiana dos óleos essenciais *Cinnamomum zeylanicum* (contendo 89.6% de cinamaldeído em sua constituição), *Ocimum sanctum*, *Syzygium aromaticum* com o Hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% contra o *Enterococcus faecalis*, na forma de biofilme e na forma planctônica. Foi observado que o *C. zeylanicum* juntamente com o *S. aromaticum* foram os óleos essenciais que apresentaram maior eficácia contra a bactéria. Entretanto, o NaOCl mostrou efeito superior a todos os OEs estudados.

Liu et al. (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana do cinamaldeído, além de outros fitoconstituintes de óleos essenciais frente à *S. typhimurium* e *L. monocytogenes*, verificando também seus efeitos quando associados a estreptomicina. O cinamaldeído foi o componente mais ativo contra *L. monocytogenes*, além de apresentar efeito de sinergismo com a estreptomicina.

Upadhyay e Venkitanarayanan (2016) investigaram a eficácia do cinamaldeído, carvacrol e timol em reduzir a virulência da *L. monocytogenes* no invertebrado *Galleria mellonella*. Avaliaram ainda, o efeito de tais fitoconstituintes sobre a transcrição de genes responsáveis pela resposta do hospedeiro. Os resultados mostraram que as substâncias reduziram significativamente a virulência do microrganismo, além de aumentar a expressão de genes que contribuíram para a sobrevivência do hospedeiro invertebrado.

Abbaszadegan et al. (2016) utilizaram em seu estudo o óleo essencial *C. zeylanicum*, buscando definir sua constituição química, comparar sua atividade antimicrobiana com a de uma pasta triplo-antibiótica (composta por ciprofloxacino, metronidazol e minociclina) e do hidróxido de cálcio contra o *Enterococcus faecalis*, além de comparar a citotoxicidade desses medicamentos em fibroblastos L929. Observaram que: o cinamaldeído foi o principal componente deste OE (77,19%); a pasta triplo-antibiótica e o óleo essencial erradicaram a forma planctônica e o biofilme de *E. faecalis* em todos os períodos analisados, enquanto o hidróxido de cálcio não conseguiu eliminar a forma planctônica após 24 h, nem o biofilme após 14

dias; quanto à biocompatibilidade, o *C. zeylanicum* foi a substância mais biocompatível.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Comparar a atividade antibacteriana de pastas antibióticas contendo os fitoconstituintes terpineol e cinamaldeído com a pasta CTZ, frente ao *Enterococcus faecalis*.

3.2. Objetivos específicos

I. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do terpineol e do cinamaldeído frente ao *Enterococcus faecalis*.

II. Avaliar a solubilidade das pastas compostas pelos fitoconstituintes isolados e combinados, e da pasta CTZ.

III. Avaliar a atividade antibacteriana das pastas compostas pelos fitoconstituintes isolados e combinados, e da pasta CTZ.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Delineamento do estudo

No presente estudo, foi realizada uma abordagem indutiva, com procedimento comparativo-descritivo e técnica de pesquisa por documentação direta em laboratório (LAKATOS; MARCONI, 2010).

4.2. Local de realização da pesquisa

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Oral, situado no Núcleo de Medicina Tropical (NUMETROP) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.

4.3. Microrganismos utilizados

Foi utilizado o microrganismo de referência *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), obtido da coleção de microrganismos do Laboratório de Materiais de Referência FIOCRUZ. A cepa em questão foi mantida em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) ou Muller Hinton enriquecido com 5% de sangue desfibrinado (ágar sangue).

Soluções padronizadas de microrganismos foram utilizadas na concentração de 1×10^8 UFC/mL determinadas em espectrofotômetro, na absorbância de 0,1, no comprimento de onda de 600 nm. Essa concentração é equivalente ao tubo 0.5 da escala de MacFarland.

A concentração de microrganismos estabelecida para os ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi de 1×10^5 UFC/mL, a qual foi obtida pela diluição de 1000x do inóculo previamente padronizado.

4.4. Substâncias avaliadas

Foram avaliados os fitoconstituintes terpineol e cinamaldeído, obtidos da empresa SigmaAldrich®, que forneceu o laudo técnico das substâncias, contendo as informações de peso molecular, pureza, densidade e outras características

químicas. As informações sobre a origem, obtenção e características dos produtos podem ser consultadas *online*: terpineol¹ e cinamaldeído². A partir desses dados, foram preparadas soluções padronizadas de cada fitoconstituente na concentração de 8 mg/mL (8000 µg/mL).

A solução de clorexidina a 2% (20 mg/mL) foi utilizada como controle em todos os ensaios microbiológicos.

4.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fitoconstituintes

A CIM foi considerada a menor concentração das substâncias capaz de inibir o crescimento visível dos microrganismos avaliados, sendo o presente ensaio realizado em três experimentos independentes.

A CIM foi determinada segundo normatização M7-A9 do Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI), por meio da técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2012). Inicialmente, as soluções de trabalho dos fitoconstituintes foram preparadas na concentração de 8 mg/mL (8.000 µg/mL) utilizando-se meio de cultura RPMI 1640. Para esse cálculo, foi levada em consideração a massa molecular dos fitoconstituintes. De modo semelhante, soluções de trabalho de clorexidina foram preparadas na concentração de 2 mg/mL (2.000 µg/mL).

Para realização da técnica (Figura 1), poços de uma placa de cultura de 96 poços foram preenchidos com 100 µL do meio de cultura RPMI 1640. Em seguida, 100 µL das soluções de trabalho dos fitoconstituintes foram inseridas na primeira fileira de poços da placa de microdiluição. Após, realizou-se a diluição seriada dos compostos pela transferência de 100 µL do poço mais concentrado ao menos concentrado, o que fez com que as substâncias passassem por diluições seriadas de 1:2 (v/v), conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Diluições seriadas dos fitoconstituintes e da substância controle para a determinação da CIM.

Poço	Concentração do Fitoconstituente (µg/mL)	Concentração controle (Clorexidina) (µg/mL)
1	2000	500
2	1000	250

¹ Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/04899?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 01/11/17, 13h25min.

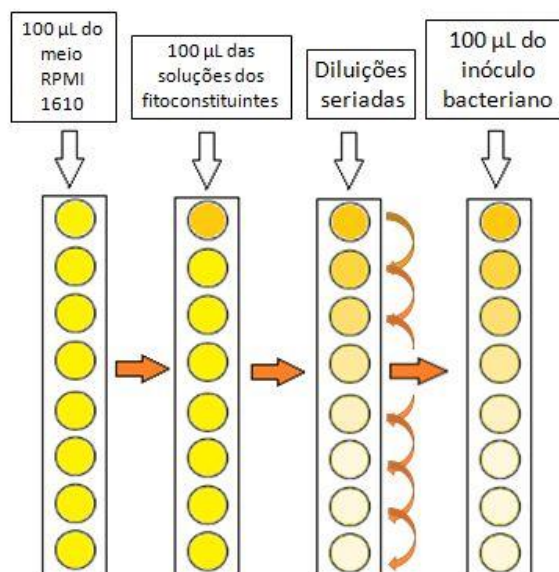
² Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/subst/cinnamaldehyde13255211?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 01/11/17, 13h50min.

3	500	125
4	250	62.5
5	125	31.25
6	62.5	15.625
7	31.25	7.8125
8	15.625	3.90625

Por fim, inseriu-se em todos os poços da placa de cultura 100 μ L do inóculo bacteriano na concentração de 1×10^5 UFC/mL. As amostras foram, então, incubadas a 37° C, por 24 horas, em microaerofilia. Controle de viabilidade dos microrganismos (ausência de antimicrobiano), bem como controle de esterilidade do meio de cultura (ausência de inoculação de microrganismos nos poços) foram realizados para garantir acurácia do método.

Os resultados foram analisados visualmente, considerando a inibição do crescimento microbiano no fundo dos poços.

Figura 1 – Esquema da determinação da CIM do terpineol e cinamaldeído para o *E. faecalis*.



4.6. Constituição das pastas antibióticas

Para constituição das pastas, os fitoconstituintes e controles foram misturados por espatulação ao pó de óxido de zinco (p.a.) até sua saturação, de modo a obter uma consistência pastosa compatível com o material utilizado como medicação intracanal de dentes decíduos.

Foram obtidos quatro grupos de pastas experimentais: terpineol + óxido de zinco (GT), cinamaldeído + óxido de zinco (GC), terpineol + cinamaldeído + óxido de zinco (GTC), clorexidina + óxido de zinco (GCHX). A pasta CTZ (500 mg de cloranfenicol, 500 mg de tetraciclina e 1000 mg de óxido de zinco, saturados em 1 gota de eugenol) foi utilizada como padrão de comparação, constituindo o quinto grupo estudado (GCTZ).

4.7. Avaliação da solubilidade das pastas

Para análise da solubilidade, corpos de prova dos grupos em teste foram obtidos (n=5) por espatulação e acondicionados em matrizes de plástico, obtidas a partir de alças bacteriológicas estéreis de 10 μ L (Figura 2).

Figura 2 – Alça bacteriológica de 10 μ L utilizada como matriz para obtenção dos corpos de prova utilizados neste estudo. Disponível em: <<http://equipolab.com.br/p-1191232-18288-10.-Alca-Bacteriologica-Esteril-10%B5l.>> Acesso em: 01/11/2017, 14h35min.



Os corpos de prova foram inseridos nos poços de uma placa de cultura de 24 poços, e em cada poço foi pipetado 1 ml de água destilada. A placa foi mantida em estufa a 37° C. A solubilidade das pastas foi identificada visualmente após 48 e 144 h, através da observação de resíduos nos recipientes e pela turbidez da água destilada, verificada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 600 nm.

4.8. Avaliação da atividade antibacteriana das pastas

O efeito antibacteriano das pastas constituídas no presente estudo foi avaliado por meio do teste de contato direto. Para isso, corpos de prova (n=5/grupo) da pasta CTZ (GCTZ) e das pastas experimentais preparadas com óxido de zinco e terpineol (GT), ou cinamaldeído (GC), ou terpineol + cinamaldeído (GTC) ou

clorexidina (GCHX) foram imersas em 2 mL de meio de cultura contendo inóculo bacteriano de *E. faecalis* (ATCC 29212) na concentração 1×10^8 UFC/mL.

Após o período de 24 e 72 horas, amostras (10 μ L) do meio de cultura inoculado por microrganismos foram semeadas em placas de ágar Muller Hinton com o objetivo de verificar a viabilidade dos microrganismos. A semeadura foi realizada com alça bacteriológica estéril, utilizando-se a técnica do espalhamento. As placas ágar Muller Hinton foram incubadas a 37^o C, por 24 h e após esse período, o número de microrganismos viáveis foi quantificado.

4.9. Análise de dados

Os dados foram tabulados e analisados estatisticamente no programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, v. 21, IBM, Chicago, IL). Realizou-se inicialmente uma análise descritiva e de distribuição de dados. Os dados obtidos dos testes de Concentração Inibitória Mínima e Contato Direto foram analisados descritivamente utilizando-se a moda dos resultados. Os dados de absorbância obtidos para o teste de solubilidade foram avaliados por meio de Análise de Variância (ANOVA) a dois fatores (Grupo e Tempo) com pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0,05$ e poder estatístico de 80%.

5. RESULTADOS

A CIM obtida para o terpineol frente ao *Enterococcus faecalis* foi de 2000 µg/mL, obtida no poço A da placa de cultura. Para o cinamaldeído, foi obtida a CIM de 500µg/mL frente ao *Enterococcus faecalis*, verificada no poço C. Ambos os resultados coincidiram com a CBM (Concentração Bactericida Mínima) de cada fitoconstituente (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) obtidas para Terpineol, Cinamaldeído e Clorexidina, de acordo com a norma M7-A9 (CLSI, 2012). Valores expressos em µg/mL.

Parâmetros	Substâncias		
	Terpineol	Cinamaldeído	Clorexidina
CIM	2000,0	500,0	7,8125
CBM	2000,0	500,0	7,8125

Os resultados obtidos na análise da solubilidade das pastas, bem como as médias e desvio padrão para os diferentes grupos, após 48 e 144 horas, estão apresentados nas Tabelas 3 e Tabela 4, respectivamente. Comparações estatísticas entre os grupos nos tempos 48 h e 144 h são ilustradas na tabela 4 e Figura 3.

Tabela 3 – Valores de absorvância a 600 nm obtidos para o teste de solubilidade das pastas antibióticas estudadas, no período de 48 e 144 horas.

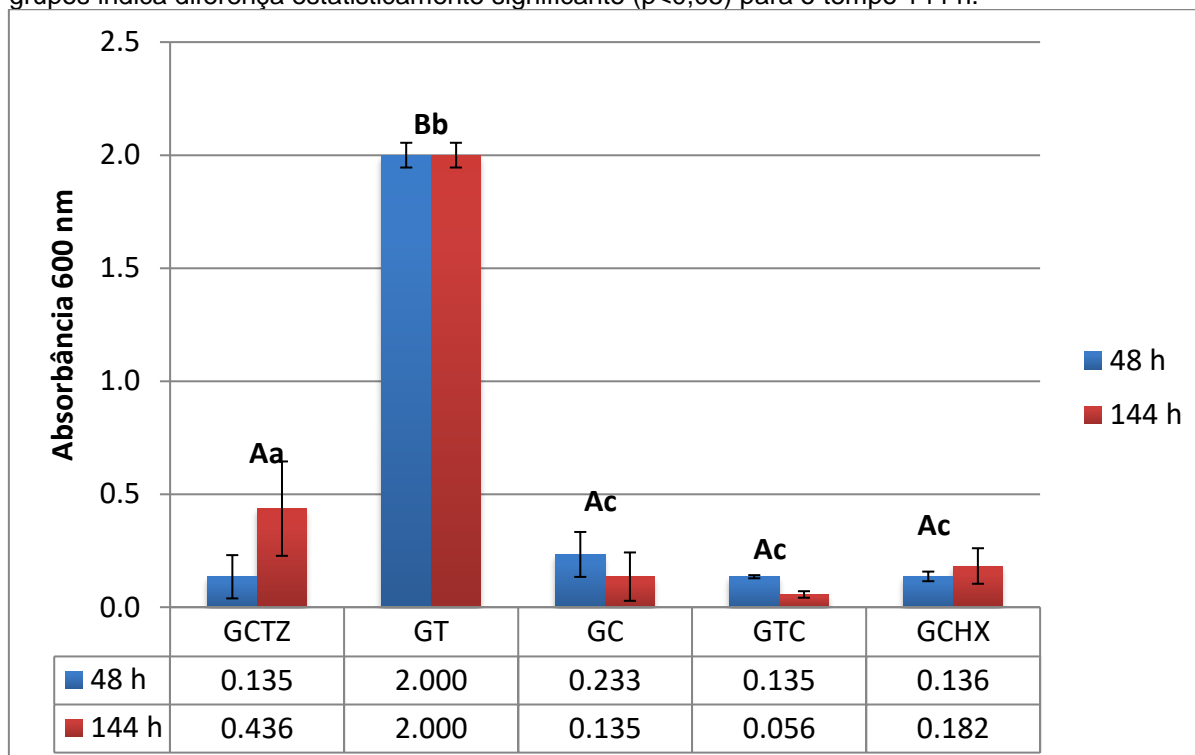
Tempo	Grupos				
	GCTZ	GT	GC	GTC	GCHX
48 h	0,123	>2,0	0,385	0,130	0,151
	0,291	>2,0	0,275	0,140	0,148
	0,086	>2,0	0,207	0,141	0,141
	0,137	>2,0	0,160	0,125	0,105
	0,036	>2,0	0,140	0,138	-
144 h	0,490	>2,0	0,325	0,081	0,125
	0,630	>2,0	0,110	0,055	0,115
	0,335	>2,0	0,086	0,047	0,283
	0,600	>2,0	0,072	0,053	0,206
	0,125	>2,0	0,083	0,045	-

Tabela 4 – Médias e Desvio padrão da solubilidade dos diferentes grupos após 48 e 144 horas.

Tempo	Grupo					
	GCTZ	GT	GC	GTC	GCHX	
48 h	Média	0,1346	2,0*	0,2334	0,1348	0,13625
	Desvio padrão	0,0958	-	0,0994	0,0070	0,2125
144 h	Média	0,4360*	2,0*	0,1352	0,0562	0,1823
	Desvio padrão	0,2087	-	0,1070	0,1450	0,0786

* Indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dos demais grupos estudados.

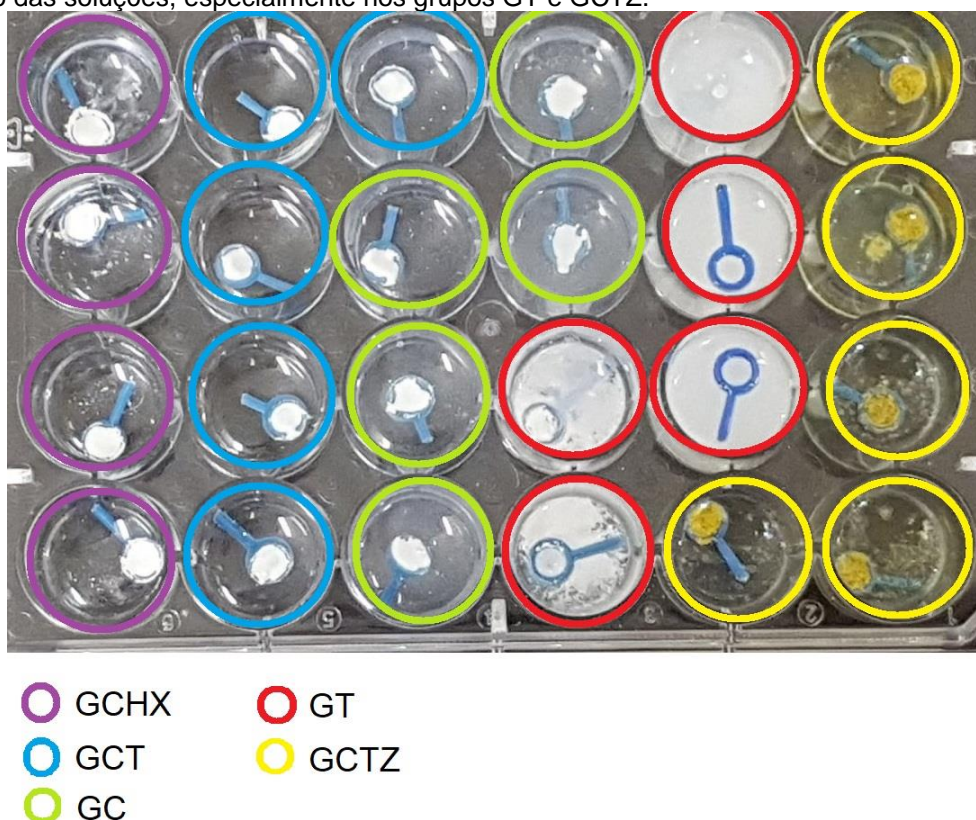
Figura 3 – Comparações múltiplas dos dados de absorvância obtidos para os grupos GCTZ, GT, GC, GTC e GCHX, nos tempos 48h e 144h. Letras maiúsculas diferentes entre os grupos indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para o tempo 48 h. Letras minúsculas diferentes entre os grupos indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para o tempo 144 h.



A análise estatística revela que, dentro do tempo de 48 h, apenas o grupo GT diferenciou dos demais, não sendo observadas diferenças estatisticamente significantes entre GCTZ, GC, GCT e GCHX (Tabela 4, Figura 3). Considerando-se o tempo de 144 h, verificou-se que o grupo GT diferiu estatisticamente dos demais grupos ($p < 0,05$). Além disso, ainda considerando-se 144 h, observou-se aumento significativo dos valores de absorvância para o grupo GCTZ, o qual diferiu estatisticamente dos grupos GC, GTC e GCHX (Tabela 4, Figura 3).

Conforme pode ser observado na Figura 4, o teste de solubilidade demonstrou clara diferença de coloração nas soluções entre os grupos estudados. Foi observada a presença de um tom amarelado na solução contendo os espécimes do GCTZ. Já no GT, foi possível verificar uma total solubilização da pasta.

Figura 4 – Teste de solubilidade das pastas após 48 h. Observa-se diferenças qualitativas quanto à coloração das soluções, especialmente nos grupos GT e GCTZ.



Na análise da atividade antibacteriana das pastas antibióticas frente ao *E. faecalis* através de contato direto, apenas o grupo constituído por terpineol e óxido de zinco (GT) não foi capaz de inibir o crescimento do microrganismo após 24 h (Figura 5). Após 72 horas, todas as pastas analisadas apresentaram áreas de inibição livres de microrganismos viáveis (Figura 6). Os resultados do teste do contato direto estão expressos na Tabela 5.

Figura 5 – Atividade antibacteriana das pastas antibióticas frente ao *E. faecalis* por contato direto após 24 h.

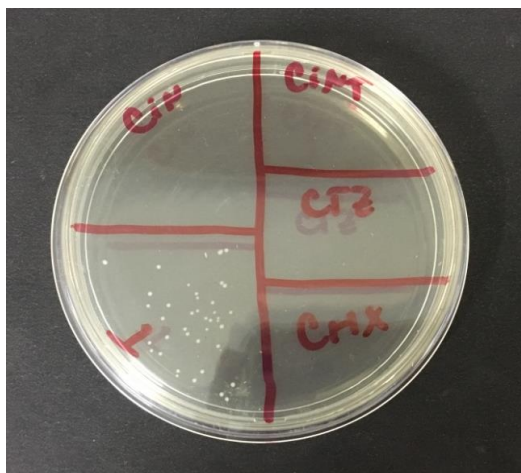


Figura 6 – Atividade antibacteriana das pastas antibióticas frente ao *E. faecalis* por contato direto após 72 h.

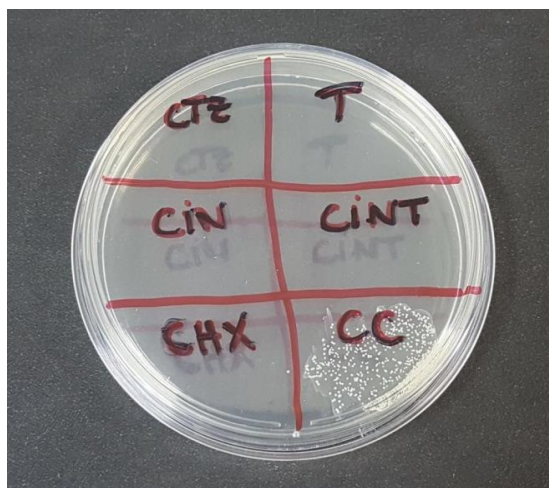


Tabela 5 – Viabilidade da suspensão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) após teste de contato direto, de acordo com os grupos estudados.

Tempo	Grupos				
	GCTZ	GT	GC	GTC	GCHX
24 h	0	+++	0	0	0
72 h	0	0	0	0	0

+++ - Viável

0 - Não-Viável

6. DISCUSSÃO

As infecções endodônticas em dentes decíduos com necrose pulpar e lesão periapical são semelhantes às aquelas encontradas nos dentes permanentes, caracterizando-se como polimicrobianas e por apresentarem predomínio de bactérias Gram-negativas e anaeróbias. Principalmente em casos de infecções persistentes, o *Enterococcus faecalis* é um microrganismo de destaque (ZHANG; DU; PENG, 2015, CHANDWANI; CHANDAK, 2017). São encontrados poucos estudos na literatura que se propõem a avaliar a microbiota de dentes decíduos, existindo um predomínio de tais pesquisas em adultos.

A terapia endodôntica aplicada a Odontopediatria é um tema complexo e controverso. A complexidade anatômica do sistema de canais radiculares e as irregularidades geradas pelo processo de reabsorção radicular fisiológica nos dentes decíduos aumentam o nível de dificuldade desse tipo de tratamento. Além disso, não há um protocolo definido e padronizado a ser empregado em casos de necrose pulpar nesses elementos dentários (FABRIS, 2011; ARGOLO, 2014).

Devido a essas limitações, diversas técnicas endodônticas e materiais obturadores têm sido estudados. O que se entende é que, frente a dificuldade de acesso completo ao conduto radicular, gerando a possibilidade de persistência de microrganismos no canal e conseqüente falha no tratamento, o emprego de materiais com propriedades antibióticas torna-se essencial para o alcance do sucesso na terapia. Assim, o dente poderá ser mantido na cavidade bucal até que o processo de reabsorção fisiológica ocorra.

A pasta CTZ corresponde a uma associação de antibióticos, possui técnica de fácil execução (por não exigir instrumentação dos canais radiculares), além de baixo custo (FEREIRA, 2017). Apesar das vantagens citadas e de diversos estudos *in vitro* comprovarem a eficácia antimicrobiana do CTZ frente aos microrganismos presentes em infecções endodônticas de dentes decíduos, ainda existe resistência por parte dos clínicos quanto ao emprego desse material. Pode-se inferir que tal fato deve-se aos efeitos adversos que seus componentes podem provocar, que incluem, principalmente: a toxicidade por parte do cloranfenicol e o manchamento dentário por parte da tetraciclina. Esses efeitos ainda não estão bem esclarecidos na literatura nas doses utilizadas na técnica endodôntica.

Também existe receio quanto à padronização da manipulação de seus componentes. A dificuldade de obtenção desses fármacos também é fator limitante para seu uso na clínica. Além disso, os estudos de acompanhamento clínico e radiográfico de terapias com CTZ possuem amostras pequenas e preservação dos casos apenas a curto e médio prazo. Assim, surge a necessidade da realização de mais pesquisas sobre esse material, garantindo uma maior consistência científica quanto ao seu emprego.

Diante desse contexto, a busca por materiais alternativos que possam ser empregados na terapia endodôntica tem se destacado. A fitoterapia surge como uma possibilidade bastante viável e promissora (SAAD et al., 2016), já que diversas substâncias extraídas de plantas medicinais aliam dois fatores que poderiam ser considerados como os mais importantes em um material utilizado no tratamento de infecções endodônticas, especialmente em dentes decíduos: um potente efeito antimicrobiano e uma possível menor toxicidade aos tecidos perirradiculares, conseqüentemente, ao germe do dente permanente.

Os fitoconstituintes alvo deste estudo, terpineol e cinamaldeído, tiveram sua eficácia comprovada contra diferentes patógenos humanos (CASTRO, 2010; SHARIFI-RAD et al., 2017). Entretanto, não foram encontradas pesquisas na literatura que avaliaram suas atividades antimicrobianas, como fitoconstituintes isolados, frente ao *E. faecalis*.

Gupta et al. (2013), Martos et al. (2013), Benbelaid et al. (2014), Smolarek et al. (2015), Abbaszadegan et al. (2016) e Borzini et al. (2016) encontraram um potente efeito de óleos essenciais contendo tais fitoconstituintes em sua composição contra o *E. faecalis*. Entretanto, esses resultados não podem ser comparados aos resultados encontrados neste estudo, uma vez que os OEs são misturas complexas de diversos compostos com diferentes propriedades. Assim, a eficácia antimicrobiana encontrada para os OEs nessas pesquisas não pode ser atribuída especificamente ao terpineol ou ao cinamaldeído.

Os resultados encontrados neste trabalho comprovam a atividade antimicrobiana do terpineol e do cinamaldeído frente ao *E. faecalis*. Os valores de CIM obtidos coincidiram com os de CBM, o que indica que, nas concentrações de 2000 µg/mL e 500µg/mL, o terpineol e o cinamaldeído, respectivamente, são capazes de inibir o crescimento do patógeno e ainda, ter ação bactericida, levando a sua destruição. Comparando-se os dois valores, é possível inferir que o terpineol

necessita de uma concentração mais elevada para ser eficaz contra a bactéria do que o cinamaldeído, o que sugere uma maior potência deste último contra o *E. faecalis*.

Quanto à solubilidade das pastas estudadas, pôde-se observar que a pasta composta pela associação entre terpineol e cinamaldeído apresentou resultados semelhantes ao CTZ e ao grupo com clorexidina após 48 h. Já quando isolados, os fitoconstituintes apresentaram maiores níveis de solubilidade. Este achado sugere, portanto, que o terpineol e o cinamaldeído, quando combinados, apresentam certa interação que desencadeia uma menor solubilização da pasta. Após 144 horas, esta interação promoveu uma solubilidade estatisticamente menor do que na pasta CTZ.

A maior solubilidade foi vista no grupo contendo terpineol, superando o limiar de absorvância do espectrofotômetro. Durante a manipulação dessa pasta, foi possível verificar certa dificuldade em se atingir uma consistência compatível com a de uma pasta obturadora, pois os componentes pareciam não conseguir tomar presa. A alta solubilidade de um material empregado na terapia pulpar de dentes decíduos pode representar uma vantagem, mas também uma limitação. Ao mesmo tempo em que possibilita a rápida eliminação do material da região perirradicular caso ocorra seu extravasamento, evitando o risco de danos ao germe do dente sucessor (NURKO; GARCIA-GODOY, 1999), pode desencadear o esvaziamento da cavidade pulpar antes do período de esfoliação fisiológica do dente decíduo, gerando insucesso no tratamento e necessitando novas intervenções (OZALP; SAROĞLU; SÖNMEZ, 2005).

O CTZ desencadeou uma coloração amarelada na solução, a qual não foi observada nas demais pastas. Após 144 h, esta coloração tornou-se ainda mais intensa. Isto se deve provavelmente à presença da tetraciclina, a qual confere tal coloração à pasta CTZ. A liberação de pigmentos em meio aquoso pelo CTZ, observada neste estudo *in vitro*, pode fortalecer a teoria descrita na literatura de que o material representa um fator de risco para alteração de cor nos dentes permanentes sucessores, causando o surgimento de manchas amareladas ou acastanhadas, devido à impregnação de tetraciclina aos tecidos dentários. Todavia, não existem evidências de que esse efeito realmente ocorra, e estudos como Junior et al. (2013) e Sousa (2016) apontam que o manchamento dentário em sucessores cujos dentes decíduos foram tratados com CTZ deve-se à infecção/inflamação apresentada, e não à terapia pulpar especificamente.

Na análise da atividade antibacteriana das pastas antibióticas, foram obtidos resultados distintos nos dois períodos de observação. Após 24 h de contato direto do inóculo bacteriano com as pastas, a pasta composta por óxido de zinco e terpineol não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, e sua semeadura apresentou microrganismos viáveis. Já após 72 h, todas foram eficazes contra o *E. faecalis*. Esses resultados concordam com os resultados de CIM e CBM também verificados neste estudo, uma vez que, o terpineol necessitou de uma maior concentração para inibir o crescimento e destruir o microrganismo, da mesma forma que se observou que o terpineol necessita de um maior período de ação contra a bactéria para apresentar eficácia. Logo, é possível inferir que o terpineol é menos potente contra o *Enterococcus faecalis* do que o cinamaldeído.

A pasta composta pelos fitoconstituintes combinados apresentou excelente efeito antibacteriano, não apresentando microrganismos viáveis em sua semeadura nos dois períodos de observação. Dessa forma, o terpineol e cinamaldeído podem apresentar certa aditividade entre si quanto a suas propriedades antibacterianas. Entretanto, pelo fato de que a pasta composta pelo cinamaldeído sozinho também inibiu o crescimento da bactéria após 24 e 72 h, os resultados positivos obtidos com a pasta constituída pelos dois fitoconstituintes poderiam ser atribuídos apenas ao cinamaldeído. Por isso, são necessários mais estudos possibilitando melhor compreensão acerca da interação entre esses fitoconstituintes.

Comparando-se os resultados do efeito antibacteriano das pastas compostas pelos fitoconstituintes com a pasta CTZ, verifica-se que, aquelas compostas pelo cinamaldeído sozinho e pelos fitoconstituintes combinados, apresentaram resultados semelhantes ao CTZ. Portanto, considerando o *Enterococcus faecalis*, o efeito antibacteriano do cinamaldeído sozinho e combinado com o terpineol equipara-se ao do cloranfenicol, tetraciclina e óxido de zinco e eugenol combinados, considerando seus efeitos após 24 e 72 h. São necessários outros estudos que utilizem maiores períodos de observação, para verificar se tais efeitos se mantêm constantes ao longo do tempo.

Na análise dos resultados deste estudo, observa-se que a pasta composta pela combinação dos dois fitoconstituintes apresentou bons resultados em relação à solubilidade e à atividade antibacteriana frente ao *E. faecalis*. Assim, sua utilização na terapia pulpar em dentes decíduos representaria, numa análise superficial, uma alternativa viável. Entretanto, este se trata de um estudo preliminar *in vitro*, e a

inserção dessa pasta na prática clínica da odontopediatria necessitaria de estudos *in vitro* e *in vivo* que considerassem diversas outras variáveis, frente à complexidade de microrganismos presentes nas infecções endodônticas e os diversos desafios encontrados na terapia pulpar de dentes decíduos.

7. CONCLUSÃO

Baseado na metodologia empregada no presente trabalho, concluiu-se que:

I. As pastas antibióticas compostas pelos fitoconstituintes terpineol e cinamaldeído combinados e pelo cinamaldeído isolado apresentaram atividade antibacteriana semelhante à da pasta CTZ, frente ao *Enterococcus faecalis*.

II. A Concentração Inibitória Mínima do terpineol frente ao *Enterococcus faecalis* foi de 2000 µg/mL e do cinamaldeído foi de 500 µg/mL.

III. A maior solubilidade após 48 h foi encontrada na pasta composta por terpineol isolado. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os demais grupos.

IV. A maior solubilidade após 144 h foi encontrada na pasta composta por terpineol isolado. A pasta CTZ diferiu estatisticamente dos demais grupos, apresentando a segunda maior solubilidade. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos contendo clorexidina, cinamaldeído isolado e terpineol e cinamaldeído combinados.

V. Na análise da atividade antibacteriana das pastas antibióticas frente ao *E. faecalis* através de contato direto após 24 h, apenas a pasta composta por terpineol isolado não foi capaz de inibir o crescimento do microrganismo.

VII. Na análise da atividade antibacteriana das pastas antibióticas frente ao *E. faecalis* através de contato direto após 72 h, todas foram capazes de inibir o crescimento do microrganismo.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEGAN, A. et al. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of *Cinnamomum zeylanicum*, Calcium Hydroxide, and Triple Antibiotic Paste as Root Canal Dressing Materials. **J. Contemp. Dent. Pract.**, v. 17, n. 1, p. 105-113, 2016.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY. Guideline on Pulp Therapy for Primary and Immature Permanent Teeth. **Reference manual**, v. 37, n. 6, p. 244-252, 2014.
- ANDRADE, E. M. M. de. **Ação antimicrobiana de pastas obturadoras de canais radiculares de dentes decíduos**. 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina. 2014.
- ANDRADE, F. B. F. S. **Avaliação “in vitro” e “in vivo” de uma pasta antibiótica empregada no tratamento endodôntico de dentes decíduos**. 2008. 100 f. Tese (Mestrado em Odontologia) – Universidade do estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008.
- ANTONIAZZI, B. F. et al. Antimicrobial activity of different filling pastes for deciduous tooth treatment. **Braz. Oral. Res.**, v. 29, n. 1, p. 1-6, 2015.
- ARGOLO, I. F. T. de. **Avaliação do sinergismo entre os componentes da pasta CTZ e o citrônio frente ao *Enterococcus faecalis***. 2014. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.
- BAHROLOLOOMI, Z.; ZAMANINEJAD, S. Success Rate of Zinc Oxide Eugenol in Pulpotomy of Necrotic Primary Molars: A Retrospective Study. **JDMT**, v. 4, n. 2, p. 89-94, 2015.
- BARJA-FIDALGO, F. et al. A Systematic Review of Root Canal Filling Materials for Deciduous Teeth: Is There an Alternative for Zinc Oxide-Eugenol? **ISRN Dentistry**, p. 1-7, jan., 2011.
- BENBELAID, F. et al. Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug resistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm state. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.**, v. 4, n. 6, p. 463-472, 2014.
- BHINGE, S. D. et al. Formulation development and evaluation of antimicrobial polyherbal gel. **Ann. Pharm. Fr.**, p. 1-10, 2017.
- BORZINI, L. et al. Root Canal Irrigation: Chemical Agents and Plant Extracts Against *Enterococcus faecalis*. **The Open Dentistry Journal**, v. 10, p. 692-703, 2016.
- BRASIL 2004a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004**. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de

Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Brasília, 2007.

BROOK, I. Microbiology and management of endodontic infections in children. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 28, n. 1, p. 13-17, 2003.

CALCABRINI, A. et al. Terpinen-4-ol, The Main Component of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil Inhibits the In Vitro Growth of Human Melanoma Cells. **J. Invest. Dermatol.**, v. 122, n. 2, p. 349–360, 2004.

CANCIO, V. et al. Can the *Enterococcus faecalis* identified in the root canals of primary teeth be a cause of failure of endodontic treatment? **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 75, n. 6, p. 423-428, 2017.

CAPIELLO, J. Tratamientos pulpares em incisivos primarios. **Rev. Assoc. Odont. Argentina**, v. 52, n.4, p. 139-145, 1964.

CAPPIELLO, J. Nuevos enfoques em odontología infantil. **Odontol. Uruguai**, v. 23, p. 20-30, 1967.

CASTRO, R.D. **Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela) e de sua Associação com Antifúngicos Sintéticos sobre Espécies de *Candida***. 2010. 170f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. 2010.

CAVALCANTI, S. L. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos componentes da pasta obturadora CTZ**. 2013. 53f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2013.

CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais sobre Cepas de *Candida*. **Rev. Odontol. Bras. Central**, v. 20, n. 52, p. 68-73, 2011.

CHANDWANI, M.; CHANDAK, S. Assessment of facultative anaerobes from the root canals of deciduous molars: An in vivo study. **J. Dent. Res. Dent. Clin. Dent. Prospects**, v. 11, n. 2, p. 96-100, 2017.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**, ed. 9, v. M7-A9, 2012.

DUQUE, C. et al. **Odontopediatria: uma visão contemporânea**. 1ª Ed. São Paulo: Santos, 2013. 698 p.

- DUNKIC, V. et al. Composition and antiviral activity of the essential oils of *Eryngium alpinum* and *E. amethystinum*. **Chemistry&biodiversity**, v. 10, p. 1894-1902, 2013.
- ESCOBAR, R. G. Eugenol: Propriedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. **Rev. Cubana Estomatol.**, v. 39, 2002.
- ESTRELA, C. et al. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. **J. Appl. Oral Sci.**, v 17, n. 2, p. 87-91, 2009.
- FABRIS, A. S. **Análise bacteriológica de infecções pulpares em dentes decíduos**. 2011. 92 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.
- FEREIRA, J. L. et al. Clinical and Radiographic Evaluation of CTZ (Chloramphenicol-Tetracycline-Zinc Eugenol Oxide) Antibiotic Paste in Pulp Treatment of Primary Molars. **J. Dent. Health Oral Disord. Ther.**, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2017.
- FEREIRA, J. L. et al. Efectividad clínica y radiográfica de la pasta antibiótica CTZ em pulpotomías de molares primarios. Ensayo clinico aleatorio controlado. **Int. J. Odontostomat.**,v. 10, n. 3, p. 425-431, 2016.
- GOMES, B.P. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.19, n.2, p.71-76, apr., 2004.
- GONÇALVES, S. S. **Análise da atividade antimicrobiana de quatro pastas endodônticas sobre microrganismos removidos da cavidade pulpar de molares decíduos necrosados**. 2010. 87f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2010.
- GONZÁLEZ-NÚÑEZ, D. et al. Técnica de endodoncia no instrumentada mediante el uso de la pasta CTZ. **Revista de Estomatologia**, v.18, n. 2, p. 27-32, 2010.
- GOOD, M. L.; HUSSEY, D. L. Minocycline: stain devil? **Br. J. Dermatol.**, v. 149, n. 2, p. 237-239, 2003.
- GUPTA, A. et al. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of *Syzygium aromaticum*, *Ocimum sanctum* and *Cinnamomum zeylanicum* plant extracts against *Enterococcus faecalis*: a preliminary study. **International Endodontic Journal**, v. 46, p. 775–783, 2013.
- HART, P. H. et al. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflamm. Res.**, v. 49, p. 619–626, 2000.
- JADHAV, S. et al. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. **Food Control**, v. 29, p. 125-130, 2013.
- JORGENSEN, J. H. et al. **Manual of clinical microbiology**. 11^a Ed. American Society for Microbiology Press, 2015. 892 p.

JUNIOR, V. E. dos S. et al. Existe Associação entre Manchas de Esmalte em Pré-Molares e Tratamento Endodôntico nos seus Antecessores Decíduos? **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.**, v. 13, n. 1, p. 17-21, jun./mar., 2013.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KIM, H. O., PARK, S. W., PARK, H. D. Inactivation of *Escherichia coli* by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassias* hoot. **Food Microbiology**, v. 21, p. 105–110, 2004.

LACATIVA, A. M.; LOYOLA, A. M.; SOUSA, C. J. A. Histological evaluation of bone response to pediatric endodontic pastes: an experimental study in guinea pig. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 6, p. 635-644, 2012.

LAKATOS, E.M.; MARCONI, M.A. **Fundamentos de Metodologia Científica**. 7 ed. São Paulo: Atlas, 2010.

LI, L. et al. Antibacterial activity of α -terpineol may induce morphostructural alterations in *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1409-1413, 2014.

LIMA, C. C. B. et al. Biocompatibility of root filling pastes used in primary teeth. **International Endodontic Journal**, v. 48, n. 5, p. 405-416, 2014.

LINS, R. X. et al. Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. **Journal of Dentistry**, v. 4, n.1, p. 779-789, 2013.

LIU, Q. et al. Synergy between thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and Streptomycin against planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 60, n. 5, p. 421-430, mai., 2015.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA, J. F. **Endodontia: biologia e técnica**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2015. 848 p.

MEADES, G. J. et al. Constituents of Cinnamon Inhibit Bacterial AcetylCoA Carboxylase. **Planta Medica**, v. 76, p. 1570-1575, 2010.

MOURA, L. F. A. D. et al. Endodontic Treatment of Primary Molars with Antibiotic Paste: A Report of 38 Cases. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 40, n. 3, p. 175-177, 2016.

MORETHSON, P. **Farmacologia para a clínica odontológica**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Santos, 2015. 356 p.

MUÑOZ, S. R.; TORRES, R. P.; VASQUEZ, I. D. R. R. Uso de la pasta CTZ em el tratamiento de dientes decíduos necróticos en una sola cita. Revisión de la literatura. **Rev. Acad. Mex. Odon. Ped**, v. 29, n. 1, p. 29-34, 2017.

NACIF, M.C.A.M.; ALVES, F.R.F. *Enterococcus faecalis* na Endodontia: um desafio ao sucesso. **Rev. bras. odontol.**, v.67, n.2, p.208-14, jul./dez., 2010.

NEGREIROS, M. de O. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme de Óleos essenciais de *Heterothalamus* sp. sobre *Enterococcus faecalis*.**

Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). 2014. 100 f. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

NURKO,C.; GARCIA-GODOY, F. Evaluation of a calcium hydroxide/iodoform paste (Vitapex) in root canal therapy for primary teeth. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 23, n. 4, p. 289-294, 1999.

OLIVEIRA, M. A. C; COSTA, L. R. R. S. Desempenho clínico de pulpotomias com pasta CTZ em molares decíduos: Estudo retrospectivo. **Robrac**, v.15, n.40, p. 55-63, Goiânia, 2006.

OYEDEMI, S. O. et al. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 8, n. 7, p. 1280-1286, apr., 2009.

OZALP, N.;SAROĞLU, I.; SÖNMEZ, H.Evaluation of various root canal filling materials in primary molar pulpectomies: an in vivo study. **Am. J. Dent.**, v. 18, n. 6, p. 347-350,dez., 2005.

OZBEK S.M.; OZBEK, A.; ERDOGAN, A.S. Analysis of *Enterococcus faecalis* in samples from Turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR SYBR Green method. **J. Appl. Oral Sci.** v 17, n. 5, p. 270-74, 2009.

PALMA, M. N. F. **Efecto in vitro de la pasta CTZ pura y modificada y del formocresol sobre el *Fusobacterium nucleatum*, el *Lactobacillus acidophyllus* y la *Porphyromona gingivalis* prevalentes em piezas deciduas necróticas com absceso em los laboratorios de microbiologia de la UCSM, Arequipa 2014.**

2016. 174 f. Trabajo de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidad Catolica de Santa Maria, Arequipa, Perú, 2016.

PARADELLA, T. C.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. **Rev. Odontol. UNESP.**, v. 36, n. 2, p. 163-68, 2007.

PARK, S. N. et al. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. **Anaerobe**, v. 18, p. 396-372, 2012.

PASSOS, I.A.; MELO, J.M.; MOREIRA, P.V.L. Utilização da pasta CTZ em dente decíduo com necrose pulpar – relato de caso. **Odontologia Clín-Científ.**, v.7, n.1, p.63-65, Recife, jan./mar., 2008.

PÉREZ, S. G. et al. Antiprotozoa activity of some essential oils. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, p. 2901-2908, 2012.

PIVA, F. et al. Ação Antimicrobiana de Materiais Empregados na Obturação dos Canais de Dentes Decíduos por Meio da Difusão em Ágar: Estudo in vitro. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.**, v. 9, n.1, p. 13-17, João Pessoa, 2009.

PIVA, F.; JUNIOR, I. M. F.; ESTRELA, C. Antimicrobial Activity of Different Root Canal Filling Pastes Used in Deciduous Teeth. **Materials Research**, v. 11, n. 2, p. 171-173, 2008.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

SAAD, G. de A. et al. **Fitoterapia Contemporânea - Tradição e Ciência na Prática Clínica**. 2ª Ed. Guanabara Koogan, 2016. 468 p.

SARTO, M. P. M.; JUNIOR, G. Z. Atividade antimicrobiana de oleos essenciais. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n. 1, p. 98-102, out./dez., 2014.

SHARIFI-RAD, J. et al. Plants of the *Melaleuca* Genus as Antimicrobial Agents: From Farm to Pharmacy. **Phytother. Res.**, 2017.

SIEGL, R. M. C. et al. Two endodontics techniques analysis in primary molars with fistula. **RGO**, v. 63, n. 2, p. 187-194, 2015.

SILVA, J. M. da. **Enterococcus sp.: considerações clínicas e microbiológicas em endodontia**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). 2013. 52 f. Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciências da Saúde. Porto, 2013.

SOUSA, E. L. R. de; TORINO, G. G.; MARTINS, G. B. **Antibiótico em Endodontia - Por que, Como e Quando Usá-los**. 1ª Ed. Grupo Gen, 2014. 180 p.

SOUSA, H. C. S. **Esmalte de pré-molares cujos antecessores foram submetidos à terapia pulpar com pasta antibiótica**. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

SOUSA, S. M.; DUARTE, R. C.; SOUSA, S. A. de. Acompanhamento clínico e radiográfico de dentes decíduos submetidos à terapia pulpar com a pasta CTZ. **Brazilian Research in Pediatric Dentistry and Integrated Clinic**, v. 14, n. 3, p. 56-68, 2014.

STEFFENS, H. et al. Avaliação do potencial do cloranfenicol para induzir teratogenicamente o aparecimento de fissure palatine em ratos Wistar. **Rev Sul-Bras. Odontol.**, v.7, n.2, p.154-8, jun., 2010.

TAVARES, W.L.F. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 2ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2009. 712 p.

TAVARES, W.L.F. et al. Microbiota of deciduous endodontic infections analysed by MDA and Checkerboard DNA-DNA hybridization. **Int. Endod. J.**, v. 44, n.3, p.225-35, mar, 2011.

TOLEDO, A.C.O., et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmaco técnica. **Rev. Lecta, Bragança Paulista**, v.21, n.1/2, p.7-13, 2003.

UPADHYAY, A.; VENKITANARAYANAN, K. In vivo efficacy of trans-cinnamaldehyde, carvacrol, and thymol in attenuating *Listeria monocytogenes* infection in a *Galleria mellonella* model. **J. Nat. Med.**, 2016.

YAGIELA, J. A. et al. **Farmacologia e Terapêutica Para Dentistas**. 6ª Ed. Elsevier, 2011. 944 p.

ZHANG, C.; DU, J.; PENG, Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. **J. Endod.**, p. 1-7, 2015.